

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190729** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.31

(22) Дата подачи заявки
2016.10.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/74* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01)

**(54) ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННАЯ БАКТЕРИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ
ЭНЕРГОГЕНЕРИРУЮЩИЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПУТЬ**

(31) 62/240,850

(32) 2015.10.13

(33) US

(62) 201890952; 2016.10.13

(71) Заявитель:
**ЛАНЦАТЕК НЬЮ ЗИЛЭНД
ЛИМИТЕД (NZ)**

(72) Изобретатель:

**Кёпке Михаэль, Енсен Расмус
Овергорд, Берендорфф Джеймс
Брюс Ярнтон Хэйкок, Хилл Райан
Эдвард, Джуминага Дармави, Мюллер
Александр Пол (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к генетически сконструированной бактерии, содержащей энергогенерирующий ферментативный путь, и связанные с ними способы. В частности, в настоящем изобретении предложена бактерия, содержащая фосфатбутирилтрансферазу (Ptb) и бутираткиназу (Buk) (Ptb-Buk), действующие на ненативные субстраты, обеспечивая получение широкого спектра продуктов и промежуточных продуктов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к введению Ptb-Buk в C1-фиксирующий микроорганизм, способный продуцировать продукты из газообразного субстрата.

A1

202190729

202190729

A1

ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННАЯ БАКТЕРИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭНЕРГОГЕНЕРИРУЮЩИЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПУТЬ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка выделена из заявки № 201890952 на выдачу Евразийского патента на изобретение, поданной 13.10.2016 г., с испрашиванием приоритета по дате подачи заявки № US 62/240,850, поданной 13.10.2015 г.

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/240850, поданной 13 октября 2015 г., полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Благодаря недавним успехам в ферментативном и метаболическом конструировании (инженерии) были идентифицированы и разработаны ферментативные маршруты для получения различных продуктов (Clomburg, *Appl Microbiol Biotechnol*, 86: 419-434, 2010; Peralta-Yahya, *Biotechnol J*, 5: 147-162, 2010; Cho, *Biotechnol Adv*, pii: S0734-9750(14)00181-5, 2014. Однако все указанные ферментативные маршруты являются энерго(АТФ)-потребляющими или, в лучшем случае, энергетически (АТФ-) нейтральными, что ограничивает выход продукта в энергетически ограниченных системах и рассинхронизирует продуцирование продукта и рост микроорганизма. Согласно настоящему изобретению предложены энергогенерирующие (АТФ-генерирующие) пути, позволяющие преодолеть указанные ограничения, обеспечивая новые ферментативные маршруты и пути для получения различных продуктов, в том числе кислот, алкенов, альдегидов, спиртов и диолов. Указанные пути прямо сопряжены с ростом микроорганизма и обеспечивают высокий выход продуктов.

В частности, настоящее изобретение относится к ферментативным путям, включающим Ptb-Buk. Фосфатбутирилтрансфераза (Ptb) (ЕС 2.3.1.19) в норме катализирует реакцию бутаноил-КоА и фосфата с образованием КоА и бутаноилфосфата. Бутираткиназа (Buk) (ЕС 2.7.2.7) в норме катализирует реакцию бутаноилфосфата и АДФ с образованием бутирата (бутаноата) и АТФ. Соответственно, указанные ферменты совместно (Ptb-Buk) в норме катализируют преобразование бутаноил-КоА в бутират и генерируют одну молекулу АТФ по механизму субстратного фосфорилирования (SLP).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Ptb является неизбирательной и способна воспринимать различные ацил-КоА и эноил-КоА в качестве субстратов, таким образом, Ptb-Buk может применяться для преобразования ряда ацил-КоА и эноил-КоА в соответствующие кислоты или алкенаты, соответственно, с одновременной генерацией АТФ по механизму субстратного фосфорилирования.

Кроме того, в комбинации с альдегид:ферредоксиноксидоредуктазой (AOR) и алкогольдегидрогеназой, кислоты, образованные с помощью системы Ptb-Buk, могут быть далее преобразованы в соответствующие альдегиды, спирты или диолы. AOR (ЕС 1.2.7.5) катализирует

реакцию кислоты и восстановленного ферредоксина (который может, например, образовываться в результате окисления СО или водорода) с образованием альдегида и окисленного ферредоксина. Алкогольдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.1 и ЕС 1.1.1.2) может преобразовывать альдегид и НАД(Ф)Н в спирт и НАД(Ф).

- 5 6 Введение Ptb-Buk и/или AOR в гетерологичный вид, соответственно, обеспечивает новый альтернативный способ получения нативных и ненативных продуктов, таких как кислоты, алкены, кетоны, альдегиды, спирты и диолы, с высоким выходом, таким образом преодолевая ограничения существующего уровня техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 10 7 Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная (т.е. генно-инженерная) бактерия, содержащая экзогенную фосфатбутирилтрансферазу (Ptb) и экзогенную бутираткиназу (Buk) (Ptb-Buk). В общем случае, указанная Ptb-Buk действует на ненативный субстрат, например, субстрат, отличный от бутаноил-КоА и/или бутаноилфосфата, и продуцирует ненативный продукт, например, продукт, отличный от бутаноилфосфата или
- 15 бутирата. Согласно некоторым вариантам реализации указанная Ptb-Buk преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат, 3-гидроксиизовалерил-КоА в 3-гидроксиизовалерат, 3-гидроксибутирил-КоА в 3-гидроксибутират, или 2-гидроксиизобутирил-КоА в 2-гидроксиизобутират.

- 8 Указанная бактерия может продуцировать что-либо одно или более из кислоты, алкена, кетона, альдегида, спирта или диола. Более конкретно, указанная бактерия может
- 20 продуцировать что-либо одно или более из ацетона или его предшественника, изопропанола или его предшественника, изобутилена или его предшественника, 3-гидроксибутирата или его предшественника, 1,3-бутандиола или его предшественника, 2-гидроксиизобутирата или его предшественника, адипиновой кислоты или ее предшественника, 1,3-гександиола или его предшественника, 3-метил-2-бутанола или его предшественника, 2-бутен-1-ола или его
- 25 предшественника, изовалерата или его предшественника, или изоамилового спирта или его предшественника. Указанная бактерия, как правило, не продуцирует бутанол. В частном варианте осуществления изобретения бактерия может продуцировать одно или более из 1-пропанола, 1-гексанола и 1-октанола. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная бактерия представляет собой C1-фиксирующую бактерию. В некоторых вариантах осуществления
- 30 изобретения указанная бактерия получена из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharbutyricum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium diolis*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium phytofermentans*,
- 35 *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Trichoderma reesei*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, и *Methylobacterium extorquens*.

9 Указанная бактерия может дополнительно содержать разрушающую мутацию в фосфотрансацетилазе (Pta) и ацетаткиназе (Ack). Указанная бактерия может дополнительно содержать разрушающую мутацию в тиюэстеразе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена генетически сконструированная бактерия, содержащая экзогенную Ptb-Buk и экзогенную или эндогенную альдегид:ферредоксиноксидоредуктазу.

Согласно настоящему изобретению также предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования ацетона или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), и фермент, который преобразует ацетоацетат в ацетон (этап 3), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), представляет собой Ptb-Buk, или (b) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА (этап 13), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтират в ацетоацетат (этап 15), и фермент, который преобразует ацетоацетат в ацетон (этап 3), при этом фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), представляет собой Ptb-Buk. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует ацетон или его предшественник. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная бактерия дополнительно содержит разрушающую мутацию в первичной/вторичной алкогольдегидрогеназе.

Согласно настоящему изобретению также предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования изопропанола или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), фермент, который преобразует ацетоацетат в ацетон (этап 3), и фермент, который преобразует ацетон в изопропанол (этап 4), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), представляет собой Ptb-Buk, или (b) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА (этап 13), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтират в ацетоацетат (этап 15), фермент, который преобразует ацетоацетат в ацетон (этап 3), и фермент, который преобразует ацетон в изопропанол (этап 4), при этом фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), представляет собой Ptb-Buk. В некоторых вариантах осуществления указанная бактерия продуцирует изопропанол или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению также предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования изобутилена или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), фермент, который преобразует ацетоацетат в ацетон (этап 3), фермент, который преобразует ацетон в 3-гидроксизовалерат (этап 5), и фермент, который преобразует 3-гидроксизовалерат в изобутилен (этап 6), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), представляет собой Ptb-Buk, или (b) фермент, который

преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), фермент, который преобразует ацетоацетат в ацетон (этап 3), фермент, который преобразует ацетон в 3-гидроксиизовалерил-КоА (этап 7), фермент, который преобразует 3-гидроксиизовалерил-КоА в 3-гидроксиизовалерат (этап 8), и фермент, который преобразует 3-гидроксиизовалерат в изобутилен (этап 6), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), и/или фермент, который преобразует 3-гидроксиизовалерил-КоА в 3-гидроксиизовалерат (этап 8), представляет собой Ptb-Buk. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует изобутилен или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению также предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования 3-гидроксibuтирата или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), и фермент, который преобразует ацетоацетат в 3-гидроксibuтират (этап 15), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), представляет собой Ptb-Buk, (b) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА (этап 13), и фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), при этом фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), представляет собой Ptb-Buk, или (с) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), и фермент, который преобразует ацетоацетат в 3-гидроксibuтират (этап 15), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), представляет собой тиюэстеразу. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует 3-гидроксibuтират или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению также предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования 1,3-бутандиола или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), и фермент, который преобразует ацетоацетат в 3-гидроксibuтират (этап 15), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтират в 3-гидроксibuтиральдегид (этап 16), и фермент, который преобразует 3-гидроксibuтиральдегид в 1,3-бутандиол (этап 17), при этом фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в ацетоацетат (этап 2), представляет собой Ptb-Buk, (b) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА (этап 13), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтират в 3-гидроксibuтиральдегид (этап 16), и фермент, который преобразует 3-гидроксibuтиральдегид в 1,3-бутандиол (этап 17), при этом фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират (этап 14), представляет собой Ptb-Buk, или (с) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА (этап 13), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтиральдегид (этап 18), и фермент, который преобразует

3-гидроксibuтиральдегид в 1,3-бутандиол (этап 17). В конкретном варианте осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует 1,3-бутандиол или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению также предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования 2-гидроксиизобутирата или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА (этап 13), фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в 2-гидроксиизобутирил-КоА (этап 19), и фермент, который преобразует 2-гидроксиизобутирил-КоА в 2-гидроксиизобутират (этап 20), при этом фермент, который преобразует 2-гидроксиизобутирил-КоА в 2-гидроксиизобутират (этап 20), представляет собой Ptb-Buk. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует 2-гидроксиизобутират или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования адипиновой кислоты или ее предшественника, содержащая: (а) ферменты, которые преобразуют ацетил-КоА в сукцинил-КоА (этап 21), фермент, который преобразует сукцинил-КоА в 3-оксо-адипил-КоА (этап 22), фермент, который преобразует 3-оксо-адипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА (этап 23), фермент, который преобразует 3-гидроксиадипил-КоА в 2,3-дегидроадипил-КоА (этап 24), фермент, который преобразует 2,3-дегидроадипил-КоА в адипил-КоА (этап 25), и фермент, который преобразует адипил-КоА в адипиновую кислоту (этап 26), при этом фермент, преобразующий адипил-КоА в адипиновую кислоту (этап 26), представляет собой Ptb-Buk, или (b) фермент, который преобразует ацетил-КоА в 3-оксо-адипил-КоА (этап 22), фермент, который преобразует 3-оксо-адипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА (этап 23), фермент, который преобразует 3-гидроксиадипил-КоА в 2,3-дегидроадипил-КоА (этап 24), фермент, который преобразует 2,3-дегидроадипил-КоА в адипил-КоА (этап 25), и фермент, который преобразует адипил-КоА в адипиновую кислоту (этап 26), при этом фермент, который преобразует адипил-КоА в адипиновую кислоту (этап 26), представляет собой Ptb-Buk. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует адипиновую кислоту или ее предшественник.

Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования 1,3-гександиола или его предшественника из 3-гидроксibuтирил-КоА, содержащая: (а) фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в кротонил-КоА (этап 27), фермент, который преобразует кротонил-КоА в бутирил-КоА (этап 31), фермент, который преобразует бутирил-КоА в ацетобутирил-КоА (этап 32), фермент, который преобразует ацетобутирил-КоА в 3-гидроксигексаноил-КоА (этап 36), фермент, который преобразует 3-гидроксигексаноил-КоА в 3-гидроксигексаноат (этап 37), фермент, который преобразует 3-гидроксигексаноат в 1,3-гексальдегид (этап 38), и фермент, который преобразует 1,3-гексальдегид в 1,3-гександиол (этап 39). В конкретном варианте осуществления изобретения указанная бактерия продуцирует 1,3-гександиол или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования 3-метил-2-бутанола или его предшественника из 3-гидроксibuтирил-КоА, содержащая: (а) фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в кротонил-КоА (этап 27),

фермент, который преобразует кротонил-КоА в бутирил-КоА (этап 31), фермент, который преобразует бутирил-КоА в ацетобутирил-КоА (этап 32), фермент, который преобразует ацетобутирил-КоА в ацетобутират (этап 33), фермент, который преобразует ацетобутират в ацетилацетон (этап 34), и фермент, который преобразует ацетилацетон в 3-метил-2-бутанол (этап 35), при этом фермент, который преобразует ацетобутирил-КоА в ацетобутират (этап 33), представляет собой Ptb-Buk. В конкретном варианте осуществления изобретения бактерия продуцирует 3-метил-2-бутанол или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования 2-бутен-1-ола или его предшественника из 3-гидроксibuтирил-КоА, содержащая: (а) фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в кротонил-КоА (этап 27), фермент, который преобразует кротонил-КоА в кротонат (этап 28), фермент, который преобразует кротонат в кротональдегид (этап 29), и фермент, который преобразует кротональдегид в 2-бутен-1-ол (этап 30), при этом фермент, который преобразует кротонил-КоА в кротонат (этап 28), представляет собой Ptb-Buk. В конкретном варианте осуществления указанная бактерия продуцирует 3-метил-2-бутанол или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования изовалерата или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (этап 40), фермент, который преобразует 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглюконил-КоА (этап 41), фермент, который преобразует 3-гидрокси-3-метилглюконил-КоА в 2-метилкротонил-КоА (этап 42), фермент, который преобразует 2-метилкротонил-КоА в изовалерил-КоА (этап 43), и фермент, который преобразует изовалерил-КоА в изовалерат (этап 44), при этом фермент, который преобразует изовалерил-КоА в изовалерат (этап 44), представляет собой Ptb-Buk. В конкретном варианте осуществления указанная бактерия продуцирует изовалерат или его предшественник.

Согласно настоящему изобретению предложена генетически сконструированная бактерия для продуцирования изоамилового спирта или его предшественника, содержащая: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (этап 40), фермент, который преобразует 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглюконил-КоА (этап 41), фермент, который преобразует 3-гидрокси-3-метилглюконил-КоА в 2-метилкротонил-КоА (этап 42), фермент, который преобразует 2-метилкротонил-КоА в изовалерил-КоА (этап 43), фермент, который преобразует изовалерил-КоА в изовалерат (этап 44), фермент, который преобразует изовалерат в изовалеральдегид (этап 45), и фермент, который преобразует изовалеральдегид в изоамиловый спирт (этап 46), при этом фермент, который преобразует изовалерил-КоА в изовалерат (этап 44), представляет собой Ptb-Buk, или (b) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА (этап 1), фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (этап 40), фермент, который преобразует 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглюконил-КоА (этап 41), фермент, который преобразует 3-гидрокси-3-метилглюконил-КоА в 2-метилкротонил-КоА (этап 42), фермент, который преобразует 2-метилкротонил-КоА в

- изовалерил-КоА (этап 43), фермент, который преобразует изовалерил-КоА в изовалеральдегид (этап 45), и фермент, который преобразует изовалеральдегид в изоамиловый спирт (этап 46). В конкретном варианте осуществления указанная бактерия продуцирует изоамиловый спирт или его предшественник. В конкретном варианте осуществления указанная бактерия представляет собой
- 5 С1-фиксирующую бактерию. В конкретном варианте осуществления указанная бактерия получена из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharbutyricum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium diolis*, *Clostridium kluyveri*,
- 10 *Clostridium pasterianum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium phytofermentans*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Trichoderma reesei*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum* и *Methylobacterium extorquens*.
- 15 **10** Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения продукта, включающий культивирование бактерии согласно любому из вышеупомянутых вариантов реализации в присутствии субстрата. Указанный продукт может представлять собой, например, ацетон или его предшественник, изопропанол или его предшественник, изобутилен или его предшественник, 3-гидроксibuтират или его предшественник, 1,3-бутандиол или его
- 20 предшественник, 2-гидроксиизобутират или его предшественник, адипиновую кислоту или ее предшественник, 1,3-гександиол или его предшественник, 3-метил-2-бутанол или его предшественник, 2-бутен-1-ол или его предшественник, изовалерат или его предшественник, или изоамиловый спирт или его предшественник. Обычно указанный субстрат представляет собой газообразный субстрат, содержащий, например, что-либо одно или более из CO, CO₂ и H₂.
- 25 Согласно одному варианту реализации указанный газообразный субстрат представляет собой сингаз. Согласно другому варианту реализации указанный газообразный субстрат представляет собой отходящий промышленный газ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

- 11 Фиг. 1 представляет собой диаграмму метаболических путей продуцирования различных
- 30 продуктов, в том числе ацетона, изопропанола, изобутилена, 3-гидроксibuтирата, 1,3-бутандиола и 2-гидроксиизобутирата из ацетил-КоА. Ацетил-КоА может быть получен из любого подходящего субстрата, такого как углеводный (например, сахарный) субстрат или газообразный субстрат. Согласно настоящему изобретению ацетил-КоА часто получают из газообразного субстрата. Жирными стрелками указаны этапы, которые могут быть катализированы Ptb-Buk.
- 35 **12** Фиг. 2 представляет собой диаграмму, отражающую реакции, естественным образом катализируемые Ptb-Buk, а именно, преобразование бутаноил-КоА в бутират и генерацию одной молекулы АТФ.
- 13** Фиг. 3 представляет собой диаграмму сравнения активности КоА-трансферазы, тиюэстеразы и Ptb-Buk.

14 Фиг. 4 представляет собой график, отражающий средние показатели продуцирования ацетона в *E. coli* BL21 (D3), модифицированной плазмидами, содержащими экзогенные гены. Указанные данные демонстрируют способность Ptb-Buk к преобразованию ацетоацетил-КоА в ацетоацетат в *E. coli in vivo*.

5 **15** Фиг. 5 представляет собой график, отражающий эффект индукции *E. coli* BL21 (DE3), несущей как плазмиду pACYC-ptb-buk, так и плазмиду pCOLA-thlA-adc (экспрессирующие тилолазу, Ptb-Buk и ацетоацетатдекарбоксилазу).

16 Фиг. 6 представляет собой диаграмму пути, разработанного для применения Ptb-Buk для получения ацетона, с повторным использованием восстанавливающих эквивалентов, получаемых при продуцировании (R)-3-гидроксibuтирил-КоА и АТФ, генерируемой Ptb-Buk.

17 Фиг. 7 представляет собой диаграмму, отражающую роль альдегид:ферредоксиноредуктазы (AOR), ферредоксина и Adh при продуцировании 1,3-бутандиола в *C. autoethanogenum*. Чаще всего AOR может применяться для катализа преобразование кислоты в альдегид, а Adh может применяться для катализа преобразования альдегида в спирт/диол.

18 Фиг. 8 представляет собой диаграмму, отражающую стереоспецифичность Ptb-Buk при продуцировании (R)-3-гидроксibuтирата и 2-гидроксиизобутирата. Термин «нативный» на фиг. 8 относится к нативной тилоэстеразе.

19 Фиг. 9 представляет собой диаграмму, отражающую продуцирование изобутена с помощью Ptb-Buk-преобразования 3-гидроксиизобутирил-КоА и 3-гидроксиизобутирата с применением альтернативного пути 1.

20 Фиг. 10 представляет собой диаграмму, отражающую продуцирование изобутена с помощью Ptb-Buk-преобразования 3-гидроксиизобутирил-КоА и 3-гидроксиизобутирата с применением альтернативного пути 2.

25 **21** Фиг. 11 представляет собой диаграмму, отражающую продуцирование 1,3-бутандиола с помощью 3-бутиральдегиддегидрогеназы (Bld).

22 Фиг. 12 представляет собой график, отражающий продуцирование изопропанола в *C. autoethanogenum* с применением системы Ptb-Buk относительно контроля. ○ pMTL85147-thlA-adc, ● pMTL85147-thlA-ptb-buk-adc.

30 **23** Фиг. 13A-F представляют собой графики, отражающие продуцирование 3-гидроксibuтирата, ацетата, этанола и ацетона с применением модульных плазмид у *E. coli* с разными концентрациями индуктора ИПТГ (0, 50, 100 мкМ). Фиг. 13A: pACYC-ptb-buk, pCOLA-thlA-adc, pCDF-phaB. Фиг. 13B: pACYC-ptb-buk, pCOLA-thlA-adc, pCDF-phaB-bdh1. Фиг. 13C: pCOLA-thlA-adc, pCDF-phaB-bdh1. Фиг. 13D: pCOLA-thlA-adc. Фиг. 13E: pCDF-phaB-bdh1. Фиг. 13F: pCDF-phaB.

24 Фиг. 14 представляет собой плазмидную карту плазмиды pMTL8225-budA::thlA-phaB.

- 25 Фиг. 15 представляет собой снимок геля ПЦР-верификации замены генов ацетолактатсинтазы (*budA*) генами тиолазы (*thlA*) и 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназы (*phaB*) у *C. autoethanogenum* для 4 клонов (1, 4, 7, 9) по сравнению с диким типом (W). Все клоны являются положительными, что видно по большему размеру ПЦР-фрагментов по сравнению с
- 5 диким типом.
- 26 Фиг. 16 представляет собой график, отражающий профиль ферментации для периодической ферментации штамма *C. autoethanogenum* *budA::thlAphaB* и демонстрирующий образование 3-гидроксибутирата и 1,3-бутандиола из газа.
- 27 Фиг. 17А представляет собой график, отражающий продуцирование 1,3-BDO с помощью тиолазы, 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназы (Bld) и бутиральдегиддегидрогеназы. Фиг. 17В
- 10 представляет собой график, отражающий влияние экспрессии *bld* на рост.
- 28 Фиг. 18А представляет собой график, отражающий образование 3-гидроксибутирата и 1,3-бутандиола из газообразного субстрата в *C. autoethanogenum* *pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA*. Фиг. 18В представляет собой график, отражающий восстановление ацетата в этанол в той же культуре.
- 15 29 Фиг. 19 представляет собой график, отражающий профиль ферментации штамма *C. autoethanogenum* *pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA*, демонстрирующий образование 3-гидроксибутирата и 1,3-бутандиола из газообразного субстрата в непрерывной культуре (где это указано, среду непрерывно восполняли с заданной скоростью разведения D).
- 30 Фиг. 20А и фиг. 20В представляют собой графики, отражающие увеличенную активность гидролиза КоА в отношении диапазона ацил-КоА (ацетоацетил-КоА, 3-гидроксибутирил-КоА и 2-гидроксиизобутирил-КоА) у *C. autoethanogenum*, экспрессирующего систему *Ptb-Buk* из плазмиды *pMTL82256-ptb-buk*, по сравнению с диким типом (WT).
- 25 31 Фиг. 21А и фиг. 21В представляют собой графики, отражающие сниженную активность гидролиза ацил-КоА у штаммов *C. autoethanogenum* с инактивированной тиюэстеразой (СТ2640 = тиюэстераза 1, СТ 1524 = тиюэстераза 2, СТ1780 = тиюэстераза 3) по сравнению с активностью, обнаруживаемой у *C. autoethanogenum* LZ1560 или LZ1561.
- 32 Фиг. 22 представляет собой график, отражающий увеличенное специфическое продуцирование изопропанола у штамма *C. autoethanogenum* с разрушенной тиюэстеразой 3 CAETHG_1780 по сравнению с *C. autoethanogenum* дикого типа.
- 30 33 Фиг. 23А-Д представляют собой графики, отражающие рост (фиг. 23А) и профили продуцирования изопропанола (фиг. 23В), ацетата (фиг. 23С) и этанола (фиг. 23Д) у *C. autoethanogenum* дикого типа и штамма с разрушенной тиюэстеразой 3 (CAETHG_1780), по сравнению с *C. autoethanogenum* дикого типа.
- 34 Фиг. 24 представляет собой плазмидную карту *pMTL8225-ptb-ack::ptb-buk*.
- 35 35 Фиг. 25 представляет собой снимок геля, отражающий замену генов *pta* и *ack* на гены *ptb* и *buk* и кассету *ermB*.

- 36 Фиг. 26 представляет собой график, отражающий увеличенное преобразование 3-гидроксibuтирата в 1,3-BDO за счет избыточной экспрессии гена альдегид:ферредоксиноксидоредуктазы *aor1*.
- 37 Фиг. 27 представляет собой график, отражающий активность тиюэстеразы TesB, Pta-Ack и системы Ptb-Buk на гидролиз КоА ацетоацетил-КоА, 3-гидроксibuтирил-КоА и 2-гидроксиизобутирил-КоА по сравнению с контролем (штамм BL21). Ptb-Buk демонстрирует максимальную активность, тогда как Pta-Ack демонстрирует отсутствие активности.
- 38 Фиг. 28А и 28В представляют собой графики, отражающие продуцирование 3-гидроксibuтирата с помощью Ptb-Buk в комбинации с (S)-специфической (Hbd) (фиг. 28А) или (R)-специфической 3-гидроксibuтиратдегидрогеназой (PhaB) (фиг. 28В).
- 39 Фиг. 29А-D представляют собой графики, отражающие ЖХ-МС/МС-детекцию 2-гидроксиизомасляной кислоты (2-ГИБ) и 2-гидроксibuтирата (2-ГБ). Фиг. 29А: 1 мМ стандарт 2-ГИБ. Фиг. 29В: 1 мМ стандарт 2-ГБ. Фиг. 29С: 0,5 мМ стандарт 2-ГБ и 2-ГИБ. Фиг. 29D: дубликат образца *C. autoethanogenum*, демонстрирующий продуцирование 2-ГИБ и 2-ГБ из газа.
- 40 Фиг. 30 представляет собой группу графиков, отражающих ГХ-МС-подтверждение продуцирования 2-гидроксиизомасляной кислоты (8,91 мин). Первая панель: *C. autoethanogenum* + pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-tesB. Вторая панель: *C. autoethanogenum* + pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-ptb-buk (спектр). Третья панель: *E. coli* + pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-tesB. Четвертая панель: *E. coli* + pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-ptb-buk.
- 41 Фиг. 31 представляет собой группу графиков ПЦР в реальном времени, отражающих экспрессию генов пути 2-НІВА (*thlA*, *hba*, *meaBhcmA*, *hcmB* из промотора *pta-ack* и, соответственно, промотора оперона Вуда-Льюнгаля) в *E. coli*, *C. autoethanogenum* LZ1561 при 30 °C, и *C. autoethanogenum* LZ1561 при 37 °C.
- 42 Фиг. 32 представляет собой диаграмму, отражающую продуцирование различных продуктов в микроорганизме, содержащем Ptb-Buk, AOR и Adh.
- 43 Фиг. 33 представляет собой диаграмму, отражающую сопряжение люциферазы светлячков (Luc) с системой Ptb-Buk для характеристики вариантов Ptb-Buk.
- 44 Фиг. 34 представляет собой диаграмму метаболических путей продуцирования различных продуктов, в том числе адипиновой кислоты. Жирными стрелками указаны этапы, которые могут быть катализированы Ptb-Buk.
- 45 Фиг. 35 представляет собой диаграмму метаболических путей продуцирования различных продуктов, в том числе 1,3-гександиола, 2-метил-2-бутанола и 2-бутен-1-ола. Жирными стрелками указаны этапы, которые могут быть катализированы Ptb-Buk.
- 46 Фиг. 36 представляет собой диаграмму метаболических путей продуцирования различных продуктов, в том числе изовалерата и изоамилового спирта. Жирными стрелками указаны этапы, которые могут быть катализированы Ptb-Buk.

47 Фиг. 37 представляет собой график продуцирования 3-ГБ в *C. autoethanogenum*, содержащем плазмиду pMTL82256-thlA-ctfAB, в различных точках роста.

48 Фиг. 38А представляет собой график, отражающий рост и профиль продуцирования этанола и 2,3-бутандиола у штамма *C. autoethanogenum* pta-ack::ptb-buk + pMTL85147-thlA-ptb-buk-adc. Фиг. 38В представляет собой график, отражающий профиль продуцирования

49 Фиг. 39 представляет собой диаграмму схемы пути продуцирования диапазона спиртов, кетонов, енолов или диолов C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄ посредством комбинирования известного пути удлинения цепи (Hbd, Crt, Bcd-EtfAB, Thl) с Ptb-Buk + AOR/Adc-Adh.

10 50 Фиг. 40 представляет собой график, отражающий продуцирование 3-ГБ и 1,3-BDO *C. autoethanogenum*, трансформированным плазмидой pMTL83159-phaB-thlA, в различных точках роста.

51 Фиг. 41 представляет собой график, отражающий продуцирование 3-ГБ и 1,3-BDO *C. autoethanogenum*, содержащим нокаут budA и pMTL-HBD-ThlA, в различных точках роста.

15 52 Фиг. 42А представляет собой график, отражающий продуцирование 3-ГБ при ферментации *C. autoethanogenum* pMTL83159-phaB-thlA + pMTL82256. Фиг. 42В представляет собой график, отражающий продуцирование 3-ГБ при ферментации *C. autoethanogenum* pMTL83159-phaB-thlA + pMTL82256-buk-ptb.

20 53 Фиг. 43 представляет собой график, отражающий продуцирование 3-ГБ штаммом *C. autoethanogenum* с нокаутом тиоэстеразы (Δ CAETHG_1524), экспрессирующим плазмиду pMTL83156-phaB-thlA, содержащим и не содержащим экспрессионную плазмиду Ptb-Buk pMTL82256-buk-ptb.

25 54 Фиг. 44 представляет собой график, отражающий продуцирование этанола и 1,3-BDO у штамма *C. autoethanogenum*, экспрессирующего плазмиду pMTL82256-hbd-thlA (2pf) содержащего и не содержащего плазмиду для избыточной экспрессии AOR pMTL83159-aor1 (+aor1).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Метаболические пути на фиг. 1 и 34–36

30 55 Фиг. 1 и 34–36 представляют собой диаграммы метаболических путей продуцирования различных продуктов кислот, алкенов, кетонов, альдегидов, спиртов и диолов, в том числе ацетона, изопропанола, изобутилена, 3-гидроксibuтирата (R- и S-изомеров), 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирата, адипиновой кислоты, 1,3-гександиола, 2-метил-2-бутанола, 2-бутен-1-ола, изовалерата и изоамилового спирта из субстрата. Жирными стрелками указаны этапы, которые могут быть катализированы Ptb-Buk. Примеры ферментов приведены для каждого из этапов и ферментативных путей, подробно представленных на фиг. 1 и 34–36. Однако специалисту в

35 данной области техники могут быть известны дополнительные подходящие ферменты.

56 Этап 1 отражает преобразование ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА. Указанный этап может быть катализирован тиолазой (т.е. ацетил-КоА-ацетилтрансферазой) (EC 2.3.1.9). Указанная

тиолаза может представлять собой, например, ThlA из *Clostridium acetobutylicum* (WP_010966157.1) (SEQ ID NO: 1), PhaA из *Cupriavidus necator* (WP_013956452.1) (SEQ ID NO: 2), BktB из *Cupriavidus necator* (WP_011615089.1) (SEQ ID NO: 3) или AtoB из *Escherichia coli* (NP_416728.1) (SEQ ID NO: 4). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* обладает нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

57 Этап 2 отражает преобразование ацетоацетил-КоА в ацетоацетат. Указанный этап может быть катализирован КоА-трансферазой (т.е. ацетил-КоА:ацетоацетил-КоА-трансферазой) (EC 2.8.3.9). Указанная КоА-трансфераза может представлять собой, например, CtfAB, гетеродимер, содержащий субъединицы CtfA и CtfB, из *Clostridium beijerinckii* (CtfA, WP_012059996.1) (SEQ ID NO: 5) (CtfB, WP_012059997.1) (SEQ ID NO: 6). Указанный этап может также быть катализирован тиоэстеразой (EC 3.1.2.20). Указанная тиоэстераза может представлять собой, например, TesB из *Escherichia coli* (NP_414986.1) (SEQ ID NO: 7). Указанный этап может также быть катализирован гипотетической тиоэстеразой, например, из *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*. В частности, три гипотетических тиоэстеразы были идентифицированы в *Clostridium autoethanogenum*: (1) «тиоэстераза 1» (AGY74947.1; аннотирована как пальмитоил-КоА-гидролаза; SEQ ID NO: 8), (2) «тиоэстераза 2» (AGY75747.1; аннотирована как 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстераза; SEQ ID NO: 9), и (3) «тиоэстераза 3» (AGY75999.1; аннотирована как гипотетическая тиоэстераза; SEQ ID NO: 10). Три гипотетических тиоэстеразы были также идентифицированы в *Clostridium ljungdahlii*: (1) «тиоэстераза 1» (ADK15695.1; аннотирована как предсказанная ацил-КоА-тиоэстераза 1; SEQ ID NO: 11), (2) «тиоэстераза 2» (ADK16655.1; аннотирована как предсказанная тиоэстераза; SEQ ID NO: 12), и (3) «тиоэстераза 3» (ADK16959.1; аннотирована как предсказанная тиоэстераза; SEQ ID NO: 13). Указанный этап может также быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (EC 2.3.1.19) + бутираткиназой (EC 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиоэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тиоэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

58 Этап 3 отражает преобразование ацетоацетата в ацетон. Указанный этап может быть катализирован ацетоацетатдекарбоксилазой (EC 4.1.1.4). Указанная ацетоацетатдекарбоксилаза может представлять собой, например, Adc из *Clostridium beijerinckii* (WP_012059998.1) (SEQ ID NO: 14). Указанный этап может также быть катализирован альфа-кетоизовалератдекарбоксилазой (EC 4.1.1.74). Указанная альфа-кетоизовалератдекарбоксилаза может представлять собой, например, KivD из *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO: 15). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей

указанному этапу. Кроме того, *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. В редких случаях преобразование ацетоацетата в ацетон может происходить спонтанно. Однако спонтанное преобразование очень неэффективно; маловероятно, что оно может приводить к продуцированию выходных продуктов на желаемых уровнях.

59 Этап 4 отражает преобразование ацетона в изопропанол. Указанный этап может быть катализирован первичной:вторичной алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.2). Указанная первичная:вторичная алкогольдегидрогеназа может представлять собой, например, SecAdh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74782.1) (SEQ ID NO: 16), SecAdh из *Clostridium ljungdahlii* (ADK15544.1) (SEQ ID NO: 17), SecAdh из *Clostridium ragsdalei* (WP_013239134.1) (SEQ ID NO: 18) или SecAdh из *Clostridium beijerinckii* (WP_026889046.1) (SEQ ID NO: 19). Указанный этап может также быть катализирован первичной:вторичной алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.80), такой как SecAdh из *Thermoanaerobacter brokii* (3FSR_A) (SEQ ID NO: 20). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу (Körpe, *Appl Environ Microbiol*, 80: 3394-3403, 2014). Однако *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Нокдаун или нокаут указанного фермента у *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* приводит к продуцированию и накоплению ацетона, а не изопропанола (WO 2015/085015).

60 Этап 5 отражает преобразование ацетона в 3-гидроксиизовалерат. Указанный этап может быть катализирован гидроксиизовалератсинтазой, например, гидроксиметилглутарил-КоА-синтазой (ГМГ-КоА-синтазой) (EC 2.3.3.10) из *Mus musculus* (SEQ ID NO: 21) (US 2012/0110001). Гидроксиметилглутарил-КоА-синтаза может быть сконструирована таким образом, чтобы ее активность увеличивалась. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

61 Этап 6 отражает преобразование 3-гидроксиизовалерата в изобутилен (изобутен). Указанный этап может быть катализирован гидроксиизовалератфосфорилазой/ декарбоксилазой. Указанный этап может также быть катализирован мевалонатдифосфатдекарбоксилазой (гидроксиизовалератдекарбоксилазой) (EC 4.1.1.33). Указанная мевалонатдифосфатдекарбоксилаза может представлять собой, например, Mdd из *Saccharomyces cerevisiae* (CAA96324.1) (SEQ ID NO: 22) или Mdd из *Picrophilus torridus* (WP_011178157.1) (SEQ ID NO: 23) (US 2011/0165644; van Leeuwen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1377-1387, 2012). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

62 Этап 7 отражает преобразование ацетона в 3-гидроксиизовалерил-КоА. Указанный этап может быть катализирован 3-гидроксиизовалерил-КоА-синтазой. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью,

соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

63 Этап 8 отражает преобразование 3-гидроксиизовалерил-КоА в 3-гидроксиизовалерат. Указанный этап может быть катализирован КоА-трансферазой (т.е. ацетил-КоА:ацетоацетил-КоА-трансферазой) (EC 2.8.3.9). Указанная КоА-трансфераза может представлять собой, например, CtfAB, гетеродимер, содержащий субъединицы CtfA и CtfB, из *Clostridium beijerinckii* (CtfA, WP_012059996.1) (SEQ ID NO: 5) (CtfB, WP_012059997.1) (SEQ ID NO: 6). Указанный этап может также быть катализирован тиоэстеразой (EC 3.1.2.20). Указанная тиоэстераза может представлять собой, например, TesB из *Escherichia coli* (NP_414986.1) (SEQ ID NO: 7). Указанный этап может также быть катализирован гипотетической тиоэстеразой, например, из *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*. В частности, три гипотетической тиоэстеразы были идентифицированы в *Clostridium autoethanogenum*: (1) «тиоэстераза 1» (AGY74947.1; аннотирована как пальмитоил-КоА-гидролаза; SEQ ID NO: 8), (2) «тиоэстераза 2» (AGY75747.1; аннотирована как 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстераза; SEQ ID NO: 9) и (3) «тиоэстераза 3» (AGY75999.1; аннотирована как гипотетическая тиоэстераза; SEQ ID NO: 10). Три гипотетических тиоэстеразы были также идентифицированы в *Clostridium ljungdahlii*: (1) «тиоэстераза 1» (ADK15695.1; аннотирована как предсказанная ацил-КоА-тиоэстераза 1; SEQ ID NO: 11), (2) «тиоэстераза 2» (ADK16655.1; аннотирована как предсказанная тиоэстераза; SEQ ID NO: 12); и (3) «тиоэстераза 3» (ADK16959.1; аннотирована как предсказанная тиоэстераза; SEQ ID NO: 13). Указанный этап может также быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (EC 2.3.1.19) + бутираткиназой (EC 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиоэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тиоэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

64 Этап 9 отражает преобразование ацетил-КоА в 3-метил-2-оксопентаноат. Указанный этап охватывает ряд ферментативных реакций, вовлеченных в путь биосинтез изолейцина, который естественным образом присутствует у многих бактерий, в том числе *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (и *Escherichia coli*). Ферменты, вовлеченные в преобразование ацетил-КоА в 3-метил-2-оксопентаноат, могут включать цитрамалатсинтазу (EC 2.3.1.182), 3-изопропилмалатдегидратазу (EC 4.2.1.35), 3-изопропилмалатдегидрогеназу (EC 1.1.1.85), ацетолактатсинтазу (EC 2.2.1.6), кетол-кислотную редуктоизомеразу (EC 1.1.1.86) и/или дигидроксикислотную дегидратазу (EC 4.2.1.9). Указанная цитрамалатсинтаза может представлять собой, например, CimA из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76958.1) (SEQ ID NO: 24) или CimA из *Methanocaldococcus jannaschii* (NP_248395.1) (SEQ ID NO: 25). Указанная 3-изопропилмалатдегидратаза может представлять собой, например, LeuCD из *Clostridium*

autoethanogenum (WP_023162955.1, LeuC; AGY77204.1, LeuD) (последовательности SEQ ID NO: 26 и 27, соответственно) или LeuCD из *Escherichia coli* (NP_414614.1, LeuC; NP_414613.1, LeuD) (последовательности SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно). Указанная 3-изопротилмалатдегидрогеназа может представлять собой, например, LeuB из *Clostridium*
 5 *autoethanogenum* (WP_023162957.1) (SEQ ID NO: 30) или LeuB из *Escherichia coli* (NP_414615.4) (SEQ ID NO: 31). Указанная ацетолактатсинтаза может представлять собой, например, PivBN из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74359.1, PivB; AGY74635.1, PivB; AGY74360.1, PivN) (последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, соответственно) или PivBN из *Escherichia coli* (NP_418127.1, PivB; NP_418126.1, PivN) (последовательности SEQ ID NO: 35 и 36, соответственно).
 10 Указанная кетол-кислотная редуктоизомераза может представлять собой, например, PivC из *Clostridium autoethanogenum* (WP_013238693.1) (SEQ ID NO: 37) или PivC из *Escherichia coli* (NP_418222.1) (SEQ ID NO: 38). Указанная дигидроксикислотная дегидратаза может представлять собой, например, PivD из *Clostridium autoethanogenum* (WP_013238694.1) (SEQ ID NO: 39) или PivD из *Escherichia coli* (YP_026248.1) (SEQ ID NO: 40). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium*
 15 *ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

65 Этап 10 отражает преобразование 3-метил-2-оксопентоата в 2-метилбутаноил-КоА. Указанный этап может быть катализирован кетоизовалератоксидоредуктазой (EC 1.2.7.7). Указанная кетоизовалератоксидоредуктаза может представлять собой, например, VorABCD из
 20 *Methanothermobacter thermautotrophicus* (WP_010876344.1, VorA; WP_010876343.1, VorB; WP_010876342.1, VorC; WP_010876341.1, VorD) (последовательности SEQ ID NO: 41–44, соответственно) или VorABCD из *Pyrococcus furiosus* (WP_011012106.1, VorA; WP_011012105.1, VorB; WP_011012108.1, VorC; WP_011012107.1, VorD) (последовательности SEQ ID NO: 45–48, соответственно). VorABCD представляет собой 4-субъединичный фермент. *Clostridium*
 25 *autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

66 Этап 11 отражает преобразование 2-метилбутаноил-КоА в 2-метилкротонил-КоА. Указанный этап может быть катализирован 2-метилбутаноил-КоА-дегидрогеназой (EC 1.3.99.12).
 30 Указанная 2-метилбутаноил-КоА-дегидрогеназа может представлять собой, например, AcdH из *Streptomyces avermitilis* (AAD44196.1 или BAB69160.1) (SEQ ID NO: 49) или AcdH из *Streptomyces coelicolor* (AAD44195.1) (SEQ ID NO: 50). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному
 35 этапу.

67 Этап 12 отражает преобразование 2-метилкротонил-КоА в 3-гидроксиизовалерил-КоА. Указанный этап может быть катализирован кротонозой/3-гидроксибутирил-КоА-дегидратазой (EC 4.2.1.55). Указанная кротоноза/3-гидроксибутирил-КоА-дегидратаза может представлять собой, например, Crt из *Clostridium beijerinckii* (ABR34202.1) (SEQ ID NO: 51), Crt из *Clostridium*
 40 *acetobutylicum* (NP_349318.1) (SEQ ID NO: 52) или LiuC из *Mycobacterium xanthus* (WP_011553770.1).

Указанный этап может также быть катализирован кротонил-КоА-карбоксилазой-редуктазой (ЕС 1.3.1.86). Указанная кротонил-КоА-карбоксилаза-редуктаза может представлять собой, например, Ccr из *Treponema denticola* (NP_971211.1) (SEQ ID NO: 53). Указанный этап может также быть катализирован кротонил-КоА-редуктазой (ЕС 1.3.1.44). Указанная кротонил-КоА-редуктаза может представлять собой, например, Ter из *Euglena gracilis* (AAW66853.1) (SEQ ID NO: 54). Указанный этап может также быть катализирован 3-гидроксипропионил-КоА-дегидратазой (ЕС 4.2.1.116). Указанная 3-гидроксипропионил-КоА-дегидратаза может представлять собой, например, Msd_2001 из *Metallosphaera sedula* (WP_012021928.1). Указанный этап может также быть катализирован эноил-КоА-гидратазой. Указанная эноил-КоА-гидратаза (4.2.1.17) может представлять собой, например, YngF из *Bacillus anthracis* (WP_000787371.1). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

68 Этап 13 отражает преобразование ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА. Указанный этап может быть катализирован 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназой (ЕС 1.1.1.157). Указанная 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназа может представлять собой, например, Hbd из *Clostridium beijerinckii* (WP_011967675.1) (SEQ ID NO: 55), Hbd из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349314.1) (SEQ ID NO: 56) или Hbd1 из *Clostridium kluyveri* (WP_011989027.1) (SEQ ID NO: 57). Указанный этап может также быть катализирован ацетоацетил-КоА-редуктазой (ЕС 4.2.1.36). Указанная ацетоацетил-КоА-редуктаза может представлять собой, например, PhaB из *Cupriavidus necator* (WP_010810131.1) (SEQ ID NO: 58). Указанный этап может также быть катализирован ацетоацетил-КоА-гидратазой (ЕС 4.2.1.119). Следует отметить, что PhaB является R-специфической, а Hbd является S-специфической. Кроме того, Hbd1 из *Clostridium kluyveri* является НАДФН-зависимой, а Hbd из *Clostridium acetobutylicum* и *Clostridium beijerinckii* являются НАДН-зависимыми. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

69 Этап 14 отражает преобразование 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират. Указанный этап может быть катализирован тиоэстеразой (ЕС 3.1.2.20). Указанная тиоэстераза может представлять собой, например, TesB из *Escherichia coli* (NP_414986.1) (SEQ ID NO: 7). Указанный этап может также быть катализирован гипотетической тиоэстеразой, например, из *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*. В частности, три гипотетических тиоэстеразы были идентифицированы в *Clostridium autoethanogenum*: (1) «тиоэстераза 1» (AGY74947.1; аннотирована как пальмитоил-КоА-гидролаза; SEQ ID NO: 8), (2) «тиоэстераза 2» (AGY75747.1; аннотирована как 4-гидроксibuбензоил-КоА-тиоэстераза; SEQ ID NO: 9) и (3) «тиоэстераза 3» (AGY75999.1; аннотирована как гипотетическая тиоэстераза; SEQ ID NO: 10). Три гипотетических тиоэстеразы были также идентифицированы в *Clostridium ljungdahlii*: (1) «тиоэстераза 1» (ADK15695.1; аннотирована как предсказанная ацил-КоА-тиоэстераза 1; SEQ ID NO: 11), (2) «тиоэстераза 2» (ADK16655.1; аннотирована как предсказанная тиоэстераза; SEQ ID NO: 12) и (3) «тиоэстераза 3» (ADK16959.1; аннотирована как предсказанная тиоэстераза; SEQ ID

NO: 13). Указанный этап может также быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (EC 2.3.1.19) + бутираткиназой (EC 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тииоэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тииоэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

70 Этап 15 отражает преобразование 3-гидроксibuтирата в ацетоацетат. Указанный этап может быть катализирован 3-гидроксibuтиратдегидрогеназой (EC 1.1.1.30). Указанная 3-гидроксibuтиратдегидрогеназа может представлять собой, например, Bdh1 из *Ralstonia pickettii* (BAE72684.1) (SEQ ID NO: 60) или Bdh2 из *Ralstonia pickettii* (BAE72685.1) (SEQ ID NO: 61). Указанная обратная реакция, преобразование ацетоацетата в 3-гидроксibuтират, может быть катализирована другими 3-гидроксibuтиратдегидрогеназными (EC 1.1.1.30) ферментами. Например, преобразование ацетоацетата в 3-гидроксibuтират может быть катализировано Bdh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY75962) (SEQ ID NO: 62). *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* предположительно содержат ферменты с аналогичной активностью. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

71 Этап 16 отражает преобразование 3-гидроксibuтирата в 3-гидроксibuтиральдегид. Указанный этап может быть катализирован альдегид:ферредоксиноксидоредуктазой (EC 1.2.7.5). Указанная альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза (AOR) может представлять собой, например, AOR из *Clostridium autoethanogenum* (WP_013238665.1; WP_013238675.1) (последовательности SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно) или AOR из *Clostridium ljungdahlii* (ADK15073.1; ADK15083.1) (последовательности SEQ ID NO: 65 и 66, соответственно). Согласно дополнительным вариантам реализации указанная альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза, например, может представлять собой любой источник или может происходить из любого из следующих источников, последовательности которых общедоступны:

Описание	Микроорганизм	Номер доступа	GeneID
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Acidilobus saccharovorans</i> 345-15	NC_014374.1	9498931
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Acidilobus saccharovorans</i> 345-15	NC_014374.1	9499504
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Acidilobus saccharovorans</i> 345-15	NC_014374.1	9499550
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Acidilobus saccharovorans</i> 345-15	NC_014374.1	9498997
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	NC_013926.1	8828075
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	NC_013926.1	8828511
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	NC_013926.1	8828305
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	NC_013926.1	8827762
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	NC_013926.1	8827370
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum</i> sp. MAR08-339	NC_019942.1	14306579
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum</i> sp. MAR08-339	NC_019942.1	14306982
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum</i> sp. MAR08-339	NC_019942.1	14306639

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aciduliprofundum sp. MAR08-339</i>	NC_019942.1	14307339
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Aeropyrum pernix K1</i>	NC_000854.2	1444491
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus fulgidus DSM 4304</i>	NC_000917.1	1483287
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus fulgidus DSM 4304</i>	NC_000917.1	1483233
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus fulgidus DSM 4304</i>	NC_000917.1	1483554
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus fulgidus DSM 4304</i>	NC_000917.1	1485513
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus profundus DSM 5631</i>	NC_013741.1	8738726
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus profundus DSM 5631</i>	NC_013741.1	8740019
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus sulfaticallidus PM70-1</i>	NC_021169.1	15392228
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus sulfaticallidus PM70-1</i>	NC_021169.1	15393814
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus sulfaticallidus PM70-1</i>	NC_021169.1	15391826
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus sulfaticallidus PM70-1</i>	NC_021169.1	15393763
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus sulfaticallidus PM70-1</i>	NC_021169.1	15393491
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus veneficus SNP6</i>	NC_015320.1	10393142
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Archaeoglobus veneficus SNP6</i>	NC_015320.1	10395048
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldisphaera lagunensis DSM 15908</i>	NC_019791.1	14212403
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldisphaera lagunensis DSM 15908</i>	NC_019791.1	14211524
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldisphaera lagunensis DSM 15908</i>	NC_019791.1	14212092
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldisphaera lagunensis DSM 15908</i>	NC_019791.1	14212561
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5710116
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5710117
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5709088
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5708891
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5710478
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5710457
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Caldivirga maquilingensis IC-167</i>	NC_009954.1	5709696
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>	NC_022786.1	17602865
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8</i>	NC_010482.1	6094361
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8</i>	NC_010482.1	6094198
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8</i>	NC_010482.1	6093546
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8</i>	NC_010482.1	6093319
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8</i>	NC_010482.1	6094057
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8</i>	NC_010482.1	6093563
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Chloroflexus aurantiacus J-10-fl</i>	NC_010175.1	5828639
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Clostridium acetobutylicum ATCC 824</i>	NC_003030.1	1118201
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Clostridium botulinum A, uumamm ATCC 3502</i>	NC_009495.1	5187636
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Clostridium botulinum A, uum. Hall</i>	NC_009698.1	5400593
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfovibrio vulgaris, um. Hildenborough</i>	NC_002937.3	2796664
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfovibrio vulgaris, um. Hildenborough</i>	NC_002937.3	2795337
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus fermentans DSM 16532</i>	NC_018001.1	13061477
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus fermentans DSM 16532</i>	NC_018001.1	13061068
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus fermentans DSM 16532</i>	NC_018001.1	13062247

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i> 1221n	NC_011766.1	7171099
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i> 1221n	NC_011766.1	7171759
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i> 1221n	NC_011766.1	7170725
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Desulfurococcus mucosus</i> DSM 2162	NC_014961.1	10152801
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8778536
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8779007
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8778940
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8779639
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8778820
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8778745
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642	NC_013849.1	8779874
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Fervidicoccus fontis</i> Kam940	NC_017461.1	12449263
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Fervidicoccus fontis</i> Kam940	NC_017461.1	12449994
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Fervidicoccus fontis</i> Kam940	NC_017461.1	12449294
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Fervidicoccus fontis</i> Kam940	NC_017461.1	12449682
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	NC_002939.5	2685730
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	NC_002939.5	2687039
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i> B3	NC_014297.1	9418623
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i> B3	NC_014297.1	9418760
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i> B3	NC_014297.1	9420819
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i> B3	NC_014297.1	9418748
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960	NC_015948.1	11051410
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960	NC_015948.1	11050783
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960	NC_015948.1	11051433
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula hispanica</i> N601	NC_023013.1	23805333
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula hispanica</i> N601	NC_023013.1	23805138
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula hispanica</i> N601	NC_023013.1	23804665
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	NC_006396.1	3127969
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	NC_006396.1	3129232
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	NC_017941.2	13028168
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	NC_017941.2	13028399
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	NC_013964.1	8919329
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	NC_013964.1	8919033
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	NC_013967.1	8926544
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551	NC_014735.1	9989054
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551	NC_014729.1	9994424
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551	NC_014729.1	9992444
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	галофильная архея DL31	NC_015954.1	11095016
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	галофильная архея DL31	NC_015954.1	11095541
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	галофильная архея DL31	NC_015954.1	11094595
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	галофильная архея DL31	NC_015954.1	11096497
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	галофильная архея DL31	NC_015954.1	11094563
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	галофильная архея DL31	NC_015954.1	11095602
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halopiger xanaduensis</i> SH-6	NC_015666.1	10799161
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halopiger xanaduensis</i> SH-6	NC_015658.1	10795465
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halopiger xanaduensis</i> SH-6	NC_015666.1	10798686
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halopiger xanaduensis</i> SH-6	NC_015666.1	10796679
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halorubrum lacusprofundi</i> ATCC 49239	NC_012029.1	7400122

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halorubrum lacusprofundi</i> ATCC 49239	NC_012029.1	7400291
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Halorubrum lacusprofundi</i> ATCC 49239	NC_012029.1	7400689
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013744.1	8744461
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013744.1	8744695
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013743.1	8740954
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013745.1	8745418
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013743.1	8742968
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013743.1	8741246
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013743.1	8741269
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	NC_013745.1	8745313
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Hyperthermus butilicus</i> DSM 5456	NC_008818.1	4781896
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Hyperthermus butilicus</i> DSM 5456	NC_008818.1	4782266
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Hyperthermus butilicus</i> DSM 5456	NC_008818.1	4782804
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Hyperthermus butilicus</i> DSM 5456	NC_008818.1	4781774
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ignicoccus hospitalis</i> KIN4/I	NC_009776.1	5562477
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ignicoccus hospitalis</i> KIN4/I	NC_009776.1	5562774
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Ignisphaera aggregans</i> DSM 17230	NC_014471.1	9716798
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	NC_000909.1	1452083
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocella arvoryzae</i> MRE50	NC_009464.1	5142690
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocella arvoryzae</i> MRE50	NC_009464.1	5143773
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocella conradii</i> HZ254	NC_017034.1	11972399
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocella conradii</i> HZ254	NC_017034.1	11971349
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocella paludicola</i> SANA E	NC_013665.1	8680711
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocella paludicola</i> SANA E	NC_013665.1	8680676
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z	NC_008942.1	4795790
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	NC_009051.1	4847673
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanohalobium evestigatum</i> Z-7303	NC_014253.1	9347460
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanohalobium evestigatum</i> Z-7303	NC_014253.1	9347022
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanolobus psychrophilus</i> R15	NC_018876.1	13845119
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DSM 15978	NC_019977.1	14408029
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac	NC_017527.1	12511443
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosaeta thermophila</i> PT	NC_008553.1	4462364
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM 4017	NC_015676.1	10822365
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	NC_003552.1	1475882
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	NC_003552.1	1474856
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	NC_003552.1	1473602
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina barkeri</i> , um. Fusaro	NC_007355.1	3625763
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	NC_003901.1	1479263
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	NC_003901.1	1481668
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	NC_003901.1	1480987
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina mazei</i> Tuc01	NC_020389.1	14656065
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina mazei</i> Tuc01	NC_020389.1	14656771
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosarcina mazei</i> Tuc01	NC_020389.1	14654304
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	NC_011832.1	7271108
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	NC_007796.1	3924565
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Methylobacterium alcaliphilum</i> 20Z	NC_016112.1	11361147
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	NC_007644.1	3831332
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	NC_007644.1	3830998

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	NC_007644.1	3831866
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	NC_013922.1	8824961
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	NC_013922.1	8823392
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	NC_013923.1	8826737
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099	NC_013922.1	8825516
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624	NC_019962.1	14335278
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624	NC_019962.1	14333050
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624	NC_019962.1	14333754
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natrinema</i> sp. J7-2	NC_018224.1	13349954
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2	NC_019792.1	14210296
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2	NC_019792.1	14207133
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2	NC_019792.1	14209682
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2	NC_019792.1	14207576
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2	NC_019792.1	14206941
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2	NC_019792.1	14206532
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronococcus occultus</i> SP4	NC_019974.1	14403316
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronococcus occultus</i> SP4	NC_019974.1	14405255
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronococcus occultus</i> SP4	NC_019974.1	14403781
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronococcus occultus</i> SP4	NC_019974.1	14402014
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8,8.11	NC_020388.1	14651997
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8,8.11	NC_020388.1	14652892
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8,8.11	NC_020388.1	14651999
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160	NC_007427.1	3694680
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160	NC_007426.1	3702508
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160	NC_007426.1	3702507
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160	NC_007426.1	3702509
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> , um. IM2	NC_003364.1	1464236
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> , um. IM2	NC_003364.1	1464102
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> , um. IM2	NC_003364.1	1465126
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> , um. IM2	NC_003364.1	1465445
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> DSM 13514	NC_009376.1	5055904
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> DSM 13514	NC_009376.1	5055700
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> DSM 13514	NC_009376.1	5054881
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> DSM 13514	NC_009376.1	5054644
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> DSM 13514	NC_009376.1	5054547
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum caldifontis</i> JCM 11548	NC_009073.1	4910224
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum caldifontis</i> JCM 11548	NC_009073.1	4908822
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum caldifontis</i> JCM 11548	NC_009073.1	4909927
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum caldifontis</i> JCM 11548	NC_009073.1	4910099
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum islandicum</i> DSM 4184	NC_008701.1	4617364
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum islandicum</i> DSM 4184	NC_008701.1	4616724
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum islandicum</i> DSM 4184	NC_008701.1	4617494
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum neutrophilum</i> V24Sta	NC_010525.1	6165427
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum neutrophilum</i> V24Sta	NC_010525.1	6164958
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum neutrophilum</i> V24Sta	NC_010525.1	6164976
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum oguniense</i> TE7	NC_016885.1	11853778
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum oguniense</i> TE7	NC_016885.1	11854024
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum oguniense</i> TE7	NC_016885.1	11856490
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum oguniense</i> TE7	NC_016885.1	11856176
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum oguniense</i> TE7	NC_016885.1	11854908

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum sp. 1860</i>	NC_016645.1	11594868
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum sp. 1860</i>	NC_016645.1	11596631
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrobaculum sp. 1860</i>	NC_016645.1	11594049
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus abyssi GE5</i>	NC_000868.1	1496313
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus abyssi GE5</i>	NC_000868.1	1495669
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus abyssi GE5</i>	NC_000868.1	1496580
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus abyssi GE5</i>	NC_000868.1	1495287
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus COM1</i>	NC_018092.1	13302148
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus COM1</i>	NC_018092.1	13301806
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus COM1</i>	NC_018092.1	13301219
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus COM1</i>	NC_018092.1	13300785
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus DSM 3638</i>	NC_003413.1	1468181
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus DSM 3638</i>	NC_003413.1	1469073
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus furiosus DSM 3638</i>	NC_003413.1	1469843
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus horikoshii OT3</i>	NC_000961.1	1443218
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus horikoshii OT3</i>	NC_000961.1	1443341
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus horikoshii OT3</i>	NC_000961.1	1443932
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus horikoshii OT3</i>	NC_000961.1	1443598
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus sp. NA2</i>	NC_015474.1	10555029
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus sp. NA2</i>	NC_015474.1	10554020
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus sp. NA2</i>	NC_015474.1	10555341
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus sp. ST04</i>	NC_017946.1	13022107
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus sp. ST04</i>	NC_017946.1	13022436
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus sp. ST04</i>	NC_017946.1	13021314
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus yayanosii CH1</i>	NC_015680.1	10837518
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus yayanosii CH1</i>	NC_015680.1	10837112
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrococcus yayanosii CH1</i>	NC_015680.1	10837264
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrolobus fumarii 1A</i>	NC_015931.1	11138144
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrolobus fumarii 1A</i>	NC_015931.1	11138776
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Pyrolobus fumarii 1A</i>	NC_015931.1	11139127
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Rhodospirillum rubrum ATCC 11170</i>	NC_007643.1	3833668
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Staphylothermus hellenicus DSM 12710</i>	NC_014205.1	9234557
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Staphylothermus hellenicus DSM 12710</i>	NC_014205.1	9233414
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Staphylothermus hellenicus DSM 12710</i>	NC_014205.1	9234134
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Staphylothermus hellenicus DSM 12710</i>	NC_014205.1	9234110
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Staphylothermus marinus F1</i>	NC_009033.1	4907444
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Staphylothermus marinus F1</i>	NC_009033.1	4907343
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans DSM 6589</i>	NC_013522.1	8630284
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans DSM 6589</i>	NC_013522.1	8630027
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans DSM 6589</i>	NC_013522.1	8630623
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoanaerobacter wiegelii Rt8.B1</i>	NC_015958.1	11082596
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus barophilus MP</i>	NC_014804.1	10041639
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus barophilus MP</i>	NC_014804.1	10041106
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus barophilus MP</i>	NC_014804.1	10042460
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus cleftensis</i>	NC_018015.1	13037745
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus cleftensis</i>	NC_018015.1	13038896
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus cleftensis</i>	NC_018015.1	13037242
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus gammatolerans EJ3</i>	NC_012804.1	7988317

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3	NC_012804.1	7987451
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	NC_006624.1	3233851
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	NC_006624.1	3233735
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473	NC_022084.1	16550741
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473	NC_022084.1	16548761
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473	NC_022084.1	16550885
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	NC_011529.1	7018383
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	NC_011529.1	7016739
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	NC_011529.1	7017051
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	NC_011529.1	7017476
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739	NC_012883.1	8096638
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739	NC_012883.1	8096005
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739	NC_012883.1	8096629
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739	NC_012883.1	8095463
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739	NC_012883.1	8096131
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739	NC_012883.1	8096636
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus</i> sp. 4557	NC_015865.1	11015504
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus</i> sp. 4557	NC_015865.1	11015249
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus</i> sp. 4557	NC_015865.1	11015571
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus</i> sp. AM4	NC_016051.1	7419050
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus</i> sp. AM4	NC_016051.1	7418514
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermococcus</i> sp. AM4	NC_016051.1	7420292
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> DSM 11347	NC_011296.1	6941429
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> DSM 11347	NC_011296.1	6943174
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> DSM 11347	NC_011296.1	6941905
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	NC_008698.1	4602054
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	NC_008698.1	4601386
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	NC_008698.1	4600878
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	NC_008698.1	4600730
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum</i> sp. 1910b	NC_022093.1	16572780
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum</i> sp. 1910b	NC_022093.1	16572926
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum</i> sp. 1910b	NC_022093.1	16573009
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermofilum</i> sp. 1910b	NC_022093.1	16574342
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermogladius cellulolyticus</i> 1633	NC_017954.1	13012904
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoplasma acidophilum</i> DSM 1728	NC_002578.1	1456355
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoplasma acidophilum</i> DSM 1728	NC_002578.1	1456646
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoplasma volcanium</i> GSS1	NC_002689.2	1441901
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoplasma volcanium</i> GSS1	NC_002689.2	1441379
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1	NC_016070.1	11262174
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1	NC_016070.1	11262275
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1	NC_016070.1	11262652
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1	NC_016070.1	11262926
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus uzoniensis</i> 768-20	NC_015315.1	10361668
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus uzoniensis</i> 768-20	NC_015315.1	10361250
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermoproteus uzoniensis</i> 768-20	NC_015315.1	10360972
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermosphaera aggregans</i> DSM 11486	NC_014160.1	9165115
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermosphaera aggregans</i> DSM 11486	NC_014160.1	9165462
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	NC_006461.1	3168554

альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	NC_006461.1	3168612
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta distributa</i> DSM 14429	NC_014537.1	9753145
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta distributa</i> DSM 14429	NC_014537.1	9750947
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta distributa</i> DSM 14429	NC_014537.1	9750989
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta distributa</i> DSM 14429	NC_014537.1	9753486
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta distributa</i> DSM 14429	NC_014537.1	9751414
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288238
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288894
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288574
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288827
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288607
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288523
альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	NC_015151.1	10288815

- 72 AOR катализирует реакцию кислоты и восстановленного ферредоксина с образованием альдегида и окисленного ферредоксина. В ацетогенах указанная реакция может быть сопряжена с окислением CO (с помощью CO-дегидрогеназы, EC 1.2.7.4) или водорода (с помощью ферредоксин-зависимой гидрогеназы, EC 1.12.7.2 или 1.12.1.4), что дает в обоих случаях восстановленный ферредоксин (Köpke, Curr Opin Biotechnol 22: 320-325, 2011; Köpke, PNAS USA, 107: 13087-13092, 2010). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Однако избыточная экспрессия эндогенной AOR или введение экзогенной AOR в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. Как вариант, экзогенная AOR может быть введена в микроорганизм, который естественным образом не содержит AOR, например, *E. coli*. В частности, коэкспрессия Ptb-Buk и AOR (и, необязательно, Adh) может позволять такому микроорганизму продуцировать новые ненативные продукты.
- 15 73 Этап 17 отражает преобразование 3-гидроксibuтиралальдегида в 1,3-бутандиол. Указанный этап может быть катализирован алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.1. или 1.1.1.2.). Алкогольдегидрогеназа может преобразовывать альдегид и НАД(Ф)Н в спирт и НАД(Ф). Указанная алкогольдегидрогеназа может представлять собой, например, Adh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 67), *Clostridium ljungdahlii* (ADK17019.1) (SEQ ID NO: 68) или *Clostridium ragsdalei*, BdhB из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349891.1) (SEQ ID NO: 69), Bdh из *Clostridium beijerinckii* (WP_041897187.1) (SEQ ID NO: 70), Bdh1 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003780648.1) (SEQ ID NO: 71), Bdh1 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 72), Bdh2 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003782121.1) (SEQ ID NO: 73), Bdh2 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74784.1) (SEQ ID NO: 74), AdhE1 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149325.1) (SEQ ID NO: 75), AdhE2 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149199.1) (SEQ ID NO: 76), AdhE из *Clostridium beijerinckii* (WP_041893626.1) (SEQ ID NO: 77), AdhE1 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163372.1) (SEQ ID NO: 78) или AdhE2 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163373.1) (SEQ ID NO: 79). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу.
- 30 Однако избыточная экспрессия эндогенной алкогольдегидрогеназы или введение экзогенной

алкогольдегидрогеназы в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. *Escherichia coli* предположительно не обладает нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

74 Этап 18 отражает преобразование 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтиралальдегид.

5 Указанный этап может быть катализирован бутиральдегиддегидрогеназой (ЕС 1.2.1.57). Указанная бутиральдегиддегидрогеназа может представлять собой, например, Bld из *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AAP42563.1) (SEQ ID NO: 80). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

75 Этап 19 отражает преобразование 3-гидроксibuтирил-КоА в 2-гидроксиизобутирил-КоА.

Указанный этап может быть катализирован 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутазой (ЕС 5.4.99.-). Указанная 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутаза может представлять собой, например, HcmAB из *Aquicola tertiaricarbonis* (AFK77668.1, большая субъединица; AFK77665.1, малая субъединица) (последовательности SEQ ID NO: 81 и 82, соответственно) или HcmAB из *Kyrpidia tusciae* (WP_013074530.1, большая субъединица; WP_013074531.1, малая субъединица) (последовательности SEQ ID NO: 83 и 84, соответственно). Было описано улучшение активности HcmAB шапероном MeaB (AFK77667.1, *Aquicola tertiaricarbonis*; WP_013074529.1, *Kyrpidia tusciae*) (последовательности SEQ ID NO: 85 и 86, соответственно) путем реактивации HcmAB, хотя MeaB не является необходимым для функции HcmAB, (Yaneva, *J Biol Chem*, 287: 15502-15511, 2012). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

76 Этап 20 отражает преобразование 2-гидроксиизобутирил-КоА в 2-гидроксиизобутират.

25 Указанный этап может быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (ЕС 2.3.1.19) + бутираткиназой (ЕС 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

77 Этап 21 отражает преобразование ацетил-КоА в сукцинил-КоА. Указанный этап

охватывает ряд ферментативных реакций, вовлеченных в восстановительный ЦТК-путь, который естественным образом присутствует во многих бактериях, в том числе *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (и *Escherichia coli*) (Brown, *Biotechnol Biofuels*, 7: 40, 2014; патент США №9297026). Ферменты, вовлеченные в преобразование ацетил-КоА в сукцинил-КоА, могут включать пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу (PFOR) (ЕС 1.2.7.1), пируваткарбоксилазу (Pyc) (ЕС 6.4.1.1), малик-фермент/малатдегидрогеназу (ЕС 1.1.1.38, ЕС 1.1.1.40), пируватфосфаткиназу (PPDK) (ЕС:2.7.9.1), PEP-карбоксикиназу (PCK) (ЕС 4.1.1.49), фумаратгидратазу/ фумаразу (ЕС 4.2.1.2), фумаратредуктазу (ЕС 1.3.5.1)/ сукцинатдегидрогеназу

(EC 1.3.5.4) и сукцинил-КоА-синтетазу (EC 6.2.1.5). Указанная пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY75153, AGY77232) или *Escherichia coli* (NP_415896). Пируваткарбоксилаза может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY75817). Указанная малик-фермент/малатдегидрогеназа может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76687) или *Escherichia coli* (NP_416714, NP_417703). Указанная пируватфосфатдикиназа (PPDK) может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76274, AGY77114). Указанная PEP-карбоксикиназа (PCK) может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76928) или *Escherichia coli* (NP_417862). Указанная фумаратгидратаза/фумараза может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76121, AGY76122) или *Escherichia coli* (NP_416128, NP_416129, NP_418546). Указанная фумаратредуктаза/сукцинатдегидрогеназа может происходить, например, из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74573, AGY74575, AGY75257, AGY77166) или *Escherichia coli* (NP_415249, NP_415250, NP_415251, NP_415252, NP_418575, NP_418576, NP_418577, NP_418578). Указанная сукцинил-КоА-синтетаза может происходить, например, из *Escherichia coli* (NP_415256, NP_415257).

78 Этап 22 отражает преобразование ацетил-КоА и сукцинил-КоА в 3-оксо-адипил-КоА. Указанный этап может быть катализирован β-кетoadипил-КоА-тиолазой (EC 2.3.1.16). Указанная кетонизовалератоксидоредуктаза может представлять собой, например, PaaJ из *Escherichia coli* (WP_001206190.1). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

79 Этап 23 отражает преобразование 3-оксо-адипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА. Указанный этап может быть катализирован 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназой (EC 1.1.1.157) или ацетоацетил-КоА-гидратазой (EC 4.2.1.119). Указанная 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназа или ацетоацетил-КоА-гидратаза может представлять собой, например, Hbd из *Clostridium beijerinckii* (WP_011967675.1) (SEQ ID NO: 55), Hbd из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349314.1) (SEQ ID NO: 56), Hbd1 из *Clostridium kluyveri* (WP_011989027.1) (SEQ ID NO: 57) или PaaH1 из *Cupriavidus necator* (WP_010814882.1). Следует отметить, что PhaB является R-специфической и Hbd является S-специфической. Кроме того, Hbd1 из *Clostridium kluyveri* является НАДФН-зависимой, а Hbd из *Clostridium acetobutylicum* и *Clostridium beijerinckii* являются НАДН-зависимыми. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

35 1 Этап 24 отражает преобразование 3-гидроксиадипил-КоА в 2,3-дегидроадипил-КоА. Указанный этап может быть катализирован эноил-КоА-гидратазой (EC: 4.2.1.17) или эноил-КоА-редуктазой (EC: 1.3.1.38). Указанная эноил-КоА-гидратаза или эноил-КоА-редуктаза может представлять собой, например, Crt из *C. acetobutylicum* (NP_349318.1) или PhaJ из *Aeromonas caviae* (O32472) (Seq. ID No. 52). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium*

ragsdalei не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

2 Этап 25 отражает преобразование 2,3-дегидроадипил-КоА в адипил-КоА. Указанный этап может быть катализирован транс-2-эноил-КоА-редуктазой (ЕС 1.3.8.1, ЕС 1.3.1.86, ЕС 1.3.1.85, ЕС 1.3.1.44). Указанная транс-2-эноил-КоА-редуктаза может представлять собой, например, Bcd из *C. acetobutylicum* (NP_349317.1), которая образует комплекс с транспортирующими электроны флавопротеинами EtfAB (NP_349315, NP_349316), Ccr из *Streptomyces collinus* (AAA92890), Ccr из *Rhodobacter sphaeroides* (YP_354044.1), Ter из *Treponema denticola* (NP_971211.1) или Ter из *Euglena gracilis* (AY741582.1). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

3 Этап 26 отражает преобразование адипил-КоА в адипиновую кислоту. Указанный этап может быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (ЕС 2.3.1.19) + бутираткиназой (ЕС 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиюэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тиюэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

4 Этап 27 отражает преобразование 3-гидроксibuтирил-КоА в кротонил-КоА. Указанный этап может быть катализирован кротонил-КоА-гидратазой (кротоназой) (ЕС 4.2.1.17) или кротонил-КоА-редуктазой (ЕС 1.3.1.38). Указанная кротонил-КоА-гидратаза (кротоназа) или кротонил-КоА-редуктаза может представлять собой, например, Crt из *C. acetobutylicum* (NP_349318.1) (SEQ ID NO: 52) или PhaJ из *Aeromonas caviae* (O32472). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

5 Этап 28 отражает преобразование кротонил-КоА в кротонат. Указанный этап может быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (ЕС 2.3.1.19) + бутираткиназой (ЕС 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиюэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая

мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тиоэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

6 Этап 29 отражает преобразование кротоната в кротональдегид. Указанный этап может быть катализирован альдегид:ферредоксиноксидоредуктазой (ЕС 1.2.7.5). Примеры источников альдегид:ферредоксиноксидоредуктаз описаны в различных разделах настоящей заявки. AOR катализирует реакцию кислоты и восстановленного ферредоксина с образованием альдегида и окисленного ферредоксина. В ацетогенах указанная реакция может быть сопряжена с окислением СО (с помощью СО-дегидрогеназы, ЕС 1.2.7.4) или водорода (с помощью ферредоксин-зависимой гидрогеназы, ЕС 1.1.2.7.2 или 1.1.2.1.4), что дает в обоих случаях восстановленный ферредоксин (Köpke, Curr Opin Biotechnol 22: 320-325, 2011; Köpke, PNAS USA, 107: 13087-13092, 2010). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Однако избыточная экспрессия эндогенной AOR или введение экзогенной AOR в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. Была продемонстрирована активность AOR *Pyrococcus furiosus* в отношении преобразования кротональдегида и кротоната (Loes, J Bacteriol, 187: 7056-7061, 2005). Как вариант, экзогенная AOR может быть введена в микроорганизм, который естественным образом не содержит AOR, например, *E. coli*. В частности, коэкспрессия Ptb-Buk и AOR (и, необязательно, Adh) может позволять такому микроорганизму продуцировать новые ненативные продукты.

7 Этап 30 отражает преобразование кротональдегида в 2-бутен-1-ол. Указанный этап может быть катализирован алкогольдегидрогеназой (ЕС 1.1.1.1. или 1.1.1.2.). Алкогольдегидрогеназа может преобразовывать альдегид и НАД(Ф)Н в спирт и НАД(Ф). Указанная алкогольдегидрогеназа может представлять собой, например, Adh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 67), *Clostridium ljungdahlii* (ADK17019.1) (SEQ ID NO: 68) или *Clostridium ragsdalei*, BdhB из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349891.1) (SEQ ID NO: 69), Bdh из *Clostridium beijerinckii* (WP_041897187.1) (SEQ ID NO: 70), Bdh1 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003780648.1) (SEQ ID NO: 71), Bdh1 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 72), Bdh2 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003782121.1) (SEQ ID NO: 73), Bdh2 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74784.1) (SEQ ID NO: 74), AdhE1 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149325.1) (SEQ ID NO: 75), AdhE2 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149199.1) (SEQ ID NO: 76), AdhE из *Clostridium beijerinckii* (WP_041893626.1) (SEQ ID NO: 77), AdhE1 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163372.1) (SEQ ID NO: 78) или AdhE2 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163373.1) (SEQ ID NO: 79). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Однако избыточная экспрессия эндогенной алкогольдегидрогеназы или введение экзогенной алкогольдегидрогеназы в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. *Escherichia coli* предположительно не обладает нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

8 Этап 31 отражает преобразование кротонил-КоА в бутирил-КоА. Указанный этап может быть катализирован бутирил-КоА-дегидрогеназой или транс-2-эноил-КоА-редуктазой (ЕС 1.3.8.1,

ЕС 1.3.1.86, ЕС 1.3.1.85, ЕС 1.3.1.44). Указанная бутирил-КоА-дегидрогеназа или транс-2-эноил-КоА-редуктаза может представлять собой, например, Bcd из *C. acetobutylicum* (NP_349317.1), которая образует комплекс с транспортирующими электроны флавопротеинами EtfAB (NP_349315, NP_349316), Ccr из *Streptomyces collinus* (AAA92890), Ccr из *Rhodobacter sphaeroides* (YP_354044.1), Ter из *Treponema denticola* (NP_971211.1) или Ter из *Euglena gracilis* (AY741582.1). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

9 Этап 32 отражает преобразование бутирил-КоА в ацетобутирил-КоА. Указанный этап может быть катализирован тиолазой или ацил-КоА-ацетилтрансферазой (ЕС 2.3.1.9). Указанная тиолаза может представлять собой, например, ThlA из *Clostridium acetobutylicum* (WP_010966157.1) (SEQ ID NO: 1), ThlA1 из *Clostridium kluyveri* (EDK35681), ThlA2 из *Clostridium kluyveri* (EDK35682), ThlA3 из *Clostridium kluyveri* (EDK35683), PhaA из *Cupriavidus necator* (WP_013956452.1) (SEQ ID NO: 2), BktB из *Cupriavidus necator* (WP_011615089.1) (SEQ ID NO: 3) или AtoB из *Escherichia coli* (NP_416728.1) (SEQ ID NO: 4). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* обладает нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

10 Этап 33 отражает преобразование ацетобутирил-КоА в ацетобутират. Указанный этап может быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (ЕС 2.3.1.19) + бутираткиназой (ЕС 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиоэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тиоэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

11 Этап 34 отражает преобразование ацетобутирата в ацетилацетон. Указанный этап может быть катализирован ацетоацетатдекарбоксилазой (ЕС 4.1.1.4). Указанная ацетоацетатдекарбоксилаза может представлять собой, например, Adc из *Clostridium beijerinckii* (WP_012059998.1) (SEQ ID NO: 14). Указанный этап может также быть катализирован альфа-кетоизовалератдекарбоксилазой (ЕС 4.1.1.74). Указанная альфа-кетоизовалератдекарбоксилаза может представлять собой, например, KivD из *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO: 15). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Кроме того, *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. В редких случаях преобразование ацетоацетата в ацетон может происходить спонтанно. Однако спонтанное

преобразование очень неэффективно; маловероятно, что оно может приводить к продуцированию выходных продуктов на желаемых уровнях.

12 Этап 35 отражает преобразование ацетилацетона в 3-метил-2-бутанол. Указанный этап может быть катализирован первичной:вторичной алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.2). Указанная
 5 первичная:вторичная алкогольдегидрогеназа может представлять собой, например, SecAdh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74782.1) (SEQ ID NO: 16), SecAdh из *Clostridium ljungdahlii* (ADK15544.1) (SEQ ID NO: 17), SecAdh из *Clostridium ragsdalei* (WP_013239134.1) (SEQ ID NO: 18) или SecAdh из *Clostridium beijerinckii* (WP_026889046.1) (SEQ ID NO: 19). Указанный этап может также быть катализирован первичной:вторичной алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.80),
 10 такой как SecAdh из *Thermoanaerobacter brokii* (3FSR_A) (SEQ ID NO: 20). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу (Körpe, *Appl Environ Microbiol*, 80: 3394-3403, 2014). Однако *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Нокдаун или нокаут указанного фермента у *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*
 15 или *Clostridium ragsdalei* приводит к продуцированию и накоплению ацетилацетона, а не 3-метил-2-бутанола (WO 2015/085015).

13 Этап 36 отражает преобразование ацетобутирил-КоА в 3-гидроксигексаноил-КоА. Указанный этап может быть катализирован 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназой (EC 1.1.1.157) или ацетоацетил-КоА-гидратазой (EC 4.2.1.119). Указанная 3-гидроксибутирил-КоА-
 20 дегидрогеназа или ацетоацетил-КоА-гидратаза может представлять собой, например, Hbd из *Clostridium beijerinckii* (WP_011967675.1) (SEQ ID NO: 55), Hbd из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349314.1) (SEQ ID NO: 56), Hbd1 из *Clostridium kluyveri* (WP_011989027.1) (SEQ ID NO: 57), Hbd2 из *Clostridium kluyveri* (EDK34807) или PaaH1 из *Cupriavidus necator* (WP_010814882.1). Следует отметить, что PhaB является R-специфической и Hbd является S-специфической. Кроме
 25 того, Hbd1 из *Clostridium kluyveri* является НАДФН-зависимой, а Hbd из *Clostridium acetobutylicum* и *Clostridium beijerinckii* являются НАДН-зависимыми. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

14 Этап 37 отражает преобразование 3-гидроксигексаноил-КоА в 3-гидроксигексаноат. Указанный этап может быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (EC 2.3.1.19) +
 30 бутираткиназой (EC 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиюэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к
 35 продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой
 40 как эндогенная тиюэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

15 Этап 38 отражает преобразование 3-гидроксигексаноата в 1,3-гексальдегид. Указанный этап может быть катализирован альдегид:ферредоксиноксидоредуктазой (ЕС 1.2.7.5). Примеры источников альдегид:ферредоксиноксидоредуктаз описаны в различных разделах настоящей заявки. AOR катализирует реакцию кислоты и восстановленного ферредоксина с образованием альдегида и окисленного ферредоксина. В ацетогенах указанная реакция может быть сопряжена с окислением СО (с помощью СО-дегидрогеназы, ЕС 1.2.7.4) или водорода (с помощью ферредоксин-зависимой гидрогеназы, ЕС 1.12.7.2 или 1.12.1.4), что дает в обоих случаях восстановленный ферредоксин (Köpke, Curr Opin Biotechnol 22: 320-325, 2011; Köpke, PNAS USA, 107: 13087-13092, 2010). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Однако избыточная экспрессия эндогенной AOR или введение экзогенной AOR в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. Как вариант, экзогенная AOR может быть введена в микроорганизм, который естественным образом не содержит AOR, например, *E. coli*. В частности, коэкспрессия Ptb-Buk и AOR (и, необязательно, Adh) может позволять такому микроорганизму продуцировать новые ненативные продукты.

16 Этап 39 отражает преобразование 1,3-гексальдегида в 1,3-гександиол. Указанный этап может быть катализирован алкогольдегидрогеназой (ЕС 1.1.1.1. или 1.1.1.2.). Алкогольдегидрогеназа может преобразовывать альдегид и НАД(Ф)Н в спирт и НАД(Ф). Указанная алкогольдегидрогеназа может представлять собой, например, Adh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 67), *Clostridium ljungdahlii* (ADK17019.1) (SEQ ID NO: 68) или *Clostridium ragsdalei*, BdhB из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349891.1) (SEQ ID NO: 69), Bdh из *Clostridium beijerinckii* (WP_041897187.1) (SEQ ID NO: 70), Bdh1 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003780648.1) (SEQ ID NO: 71), Bdh1 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 72), Bdh2 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003782121.1) (SEQ ID NO: 73), Bdh2 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74784.1) (SEQ ID NO: 74), AdhE1 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149325.1) (SEQ ID NO: 75), AdhE2 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149199.1) (SEQ ID NO: 76), AdhE из *Clostridium beijerinckii* (WP_041893626.1) (SEQ ID NO: 77), AdhE1 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163372.1) (SEQ ID NO: 78) или AdhE2 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163373.1) (SEQ ID NO: 79). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Однако избыточная экспрессия эндогенной алкогольдегидрогеназы или введение экзогенной алкогольдегидрогеназы в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. *Escherichia coli* предположительно не обладает нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

17 Этап 40 отражает преобразование ацетоацетил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА. Указанный этап может быть катализирован гидроксиметилглутарил-КоА-синтазой (ГМГ-КоА-синтазой) (ЕС 2.3.3.10). ГМГ-КоА-синтазы распространены во многих родах и царствах жизни и включают, например, MvaS из *Staphylococcus aureus* (WP_053014863.1), ERG13 из *Saccharomyces cerevisiae* (NP_013580.1), HMGCS2 из *Mus musculus* (NP_032282.2) и многих других

представителей группы ферментов EC 2.3.3.10. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

5 **18** Этап 41 отражает преобразование 3-гидрокси-3-метилглутаноил-КоА в 3-метилглюконил-КоА. Указанный этап может быть катализирован 3-гидроксибутирил-КоА-дегидратазой (EC 4.2.1.55). Указанная 3-гидроксибутирил-КоА-дегидратаза может представлять собой, например, LiuC из *Mycobacterium xanthus* (WP_011553770.1). Указанный этап может также быть катализирован короткоцепочечной эноил-КоА-гидратазой (EC 4.2.1.150) или эноил-КоА-гидратазой (EC 4.2.1.17). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

10 **19** Этап 42 отражает преобразование 3-метилглюконил-КоА в 2-метилкротонил-КоА. Указанный этап может быть катализирован метилкротонил-КоА-декарбоксилазой (обладающей высоким структурным сходством с глутаконат-КоА-трансферазой (EC 2.8.3.12)), например, aibAB из *Mycobacterium xanthus* (WP_011554267.1 и WP_011554268.1). Указанный этап может также быть катализирован метилкротоноил-КоА-карбоксилазой (EC 6.4.1.4), например, LiuDB из *Pseudomonas aeruginosa* (NP_250702.1 и NP_250704.1) или MCCA и MCCB из *Arabidopsis thaliana* (NP_563674.1 и NP_567950.1). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

15 **20** Этап 43 отражает преобразование метилкротонил-КоА в изовалерил-КоА. Указанный этап может быть катализирован оксидоредуктазой, цинк-связывающей дегидрогеназой. Указанный оксидоредуктаза, цинк-связывающая дегидрогеназа может представлять собой, например, AibC из *Mycobacterium xanthus* (WP_011554269.1). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* не обладают известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

20 **21** Этап 44 отражает преобразование изовалерил-КоА в изовалерат. Указанный этап может быть катализирован КоА-трансферазой (т.е. ацетил-КоА:ацетоацетил-КоА-трансферазой) (EC 2.8.3.9). Указанная КоА-трансфераза может представлять собой, например, CtfAB, гетеродимер, содержащий субъединицы CtfA и CtfB, из *Clostridium beijerinckii* (CtfA, WP_012059996.1) (SEQ ID NO: 5) (CtfB, WP_012059997.1) (SEQ ID NO: 6). Указанный этап может также быть катализирован тиоэстеразой (EC 3.1.2.20). Указанная тиоэстераза может представлять собой, например, TesB из *Escherichia coli* (NP_414986.1) (SEQ ID NO: 7). Указанный этап может также быть катализирован гипотетической тиоэстеразой, например, из *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*. В частности, три гипотетических тиоэстеразы были идентифицированы в *Clostridium autoethanogenum*: (1) «тиоэстераза 1» (AGY74947.1; аннотирована как пальмитоил-КоА-гидролаза; SEQ ID NO: 8), (2) «тиоэстераза 2» (AGY75747.1; аннотирована как 4-гидроксибензоил-КоА-тиоэстераза; SEQ ID NO: 9), и (3) «тиоэстераза 3»

(AGY75999.1; аннотирована как гипотетической тиюэстеразы; SEQ ID NO: 10). Три гипотетических тиюэстеразы были также идентифицированы в *Clostridium ljungdahlii*: (1) «тиуюэстераза 1» (ADK15695.1; аннотирована как предсказанная ацил-КоА-тиуюэстераза 1; SEQ ID NO: 11), (2) «тиуюэстераза 2» (ADK16655.1; аннотирована как предсказанная тиюэстераза; SEQ ID NO: 12), и (3) «тиуюэстераза 3» (ADK16959.1; аннотирована как предсказанная тиюэстераза; SEQ ID NO: 13). Указанный этап может также быть катализирован фосфатбутирилтрансферазой (EC 2.3.1.19) + бутираткиназой (EC 2.7.2.7). Примеры источников фосфатбутирилтрансферазы и бутираткиназы описаны в различных разделах настоящей заявки. Нативные ферменты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (или *Escherichia coli*), такие как тиюэстеразы из *Clostridium autoethanogenum*, могут катализировать указанный этап и приводить к продуцированию некоторого количества выходных продуктов. Однако введение экзогенного фермента или избыточная экспрессия эндогенного фермента могут быть необходимы для продуцирования выходных продуктов на желаемых уровнях. Кроме того, согласно определенным вариантам реализации разрушающая мутация может быть введена в эндогенный фермент, такой как эндогенная тиюэстераза, для снижения или элиминации конкуренции с введенной Ptb-Buk.

22 Этап 45 отражает преобразование изовалерата в изовалеральдегид. Указанный этап может быть катализирован альдегид:ферредоксиноксидоредуктазой (EC 1.2.7.5). Указанная альдегид:ферредоксиноксидоредуктаза (AOR) может представлять собой, например, AOR из *Clostridium autoethanogenum* (WP_013238665.1; WP_013238675.1) (последовательности SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно) или AOR из *Clostridium ljungdahlii* (ADK15073.1; ADK15083.1) (последовательности SEQ ID NO: 65 и 66, соответственно). Дополнительные примеры источников альдегид:ферредоксиноксидоредуктаз описаны в различных разделах настоящей заявки. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. Однако избыточная экспрессия эндогенной AOR или введение экзогенной AOR в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. Как вариант, экзогенная AOR может быть введена в микроорганизм, который естественным образом не содержит AOR, например, *E. coli*. В частности, коэкспрессия Ptb-Buk и AOR (и, необязательно, Adh) может позволять такому микроорганизму продуцировать новые ненативные продукты.

23 Этап 46 отражает преобразование изовалеральдегида в изоамиловый спирт. Указанный этап может быть катализирован алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.1. или 1.1.1.2.). Алкогольдегидрогеназа может преобразовывать альдегид и НАД(Ф)Н в спирт и НАД(Ф). Указанная алкогольдегидрогеназа может представлять собой, например, Adh из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 67), *Clostridium ljungdahlii* (ADK17019.1) (SEQ ID NO: 68) или *Clostridium ragsdalei*, BdhB из *Clostridium acetobutylicum* (NP_349891.1) (SEQ ID NO: 69), Bdh из *Clostridium beijerinckii* (WP_041897187.1) (SEQ ID NO: 70), Bdh1 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003780648.1) (SEQ ID NO: 71), Bdh1 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY76060.1) (SEQ ID NO: 72), Bdh2 из *Clostridium ljungdahlii* (YP_003782121.1) (SEQ ID NO: 73), Bdh2 из *Clostridium autoethanogenum* (AGY74784.1) (SEQ ID NO: 74), AdhE1 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149325.1) (SEQ ID NO: 75), AdhE2 из *Clostridium acetobutylicum* (NP_149199.1) (SEQ ID NO:

76), AdhE из *Clostridium beijerinckii* (WP_041893626.1) (SEQ ID NO: 77), AdhE1 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163372.1) (SEQ ID NO: 78) или AdhE2 из *Clostridium autoethanogenum* (WP_023163373.1) (SEQ ID NO: 79). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

5 Однако избыточная экспрессия эндогенной алкогольдегидрогеназы или введение экзогенной алкогольдегидрогеназы в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* могут быть желательны для увеличения выхода продукта. *Escherichia coli* предположительно не обладает нативной активностью, соответствующей указанному этапу.

24 Этап 47 отражает преобразование изовалерил-КоА в изовалеральдегид. Указанный этап
10 может быть катализирован бутиральдегиддегидрогеназой (EC 1.2.1.57). Указанная
бутиральдегиддегидрогеназа может представлять собой, например, Bld из *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AAP42563.1) (SEQ ID NO: 80). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* предположительно не обладают нативной активностью, соответствующей указанному этапу. *Escherichia coli* не обладает известной нативной
15 активностью, соответствующей указанному этапу.

Обзор Ptb-Buk

25 Согласно настоящему изобретению предложены новые пути, задействующие ферментную систему Ptb-Buk. В природе указанная ферментная система обнаруживается у ряда продуцирующих бутират микроорганизмов, такие как продуцирующие бутират *Clostridia* или
20 *Butyrivibrio*. В частности, фосфатбутирилтрансфераза (Ptb) (EC 2.3.1.19) естественным образом катализирует реакцию бутаноила-КоА и фосфата с образованием КоА + бутаноилфосфата и
бутираткиназы (Buk) (EC 2.7.2.7) естественным образом катализирует реакцию бутаноилфосфата и АДФ с образованием бутирата (бутаноата) и АТФ. Соответственно, указанные ферменты совместно (Ptb-Buk) естественным образом катализируют преобразование бутаноил-КоА в
25 бутират и генерируют одну молекулу АТФ посредством субстратного фосфорилирования (фиг. 2). Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что Ptb является неизбирательной и способна воспринимать различные ацил-КоА и эноил-КоА в качестве субстратов, таким образом, Ptb-Buk может применяться для преобразования ряда ацил-КоА и эноил-КоА в соответствующие кислоты или алкенаты, соответственно, с одновременной генерацией АТФ. Было описано, что Ptb
30 активна в отношении диапазона ацил-КоА, в том числе ацетоацетил-КоА, *in vitro* (Thompson, *Appl Environ Microbiol*, 56: 607-613, 1990). Ранее не было показано, что ацетоацетил-фосфат может быть субстратом Buk. Хотя известно, что Buk воспринимает широкий диапазон субстратов (Liu, *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 545-552, 2000), активность *in vivo* не была показана.

26 Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение экзогенной Ptb-
35 Buk позволяет определенным микроорганизмам продуцировать подходящие продукты, в том числе ацетон, изопропанол, изобутилен, 3-гидроксibuтират, 1,3-бутандиол и 2-гидроксиизобутират, а также другие продукты такие как пропионат, капроат и октонат.

27 Новые пути на основе Ptb-Buk обеспечивают ряд значимых преимуществ по сравнению с другими известными существующими маршрутами продуцирования продуктов, основанными на

КоА-трансферазе – как в классическом *кlostридиальном* ферментативном пути ацетон-бутанол-этанол (ABE) – или тииэстеразе (Jones, *Microbiol Rev*, 50: 484-524, 1986; Matsumoto, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 205-210, 2013; May, *Metabol Eng*, 15: 218-225, 2013) (фиг. 3). В частности, указанные новые пути (1) не зависят от присутствия или продуцирования конкретных молекул, таких как органические кислоты, например, бутирата или ацетата, необходимых для КоА-трансферазной реакции, и (2) обеспечивают генерацию АТФ посредством субстратного фосфорилирования, не сохраняющуюся при тииэстеразной или КоА-трансферазной реакции. Те же преимущества присутствуют при применении системы Ptb-Buk для других реакций, таких как преобразование 3-гидроксипутирил-КоА в 3-гидроксипутират. Соответственно, указанные новые пути отличаются потенциально значительно бóльшими титрами продукции и скоростями за счет генерации дополнительной энергии и продуцирования целевых продуктов без ко-продукции нежелательных побочных продуктов, таких как ацетат.

28 Нежелательно, в частности, при промышленном масштабе, чтобы микроорганизмы продуцировали ацетат (или другие органические кислоты, необходимые для КоА-трансферазной реакции) в качестве побочного продукта, поскольку ацетат перенаправляет углерод от целевых продуктов и, соответственно, влияет на эффективность и выход целевых продуктов. Кроме того, ацетат может быть токсическим для микроорганизмов и/или может служить в качестве субстрата для роста загрязняющих микроорганизмов. Кроме того, присутствие ацетата усложняет выделение и разделение целевых продуктов и контроль за условиями ферментации, благоприятствующими получению целевых продуктов.

29 Генерация АТФ по механизму субстратного фосфорилирования может применяться в качестве движущей силы для синтеза продуктов, в частности, в ограниченных по АТФ системах. В частности, ацетогенные бактерии, как известно, живут на «термодинамическом пределе существования» (Schuchmann, *Nat Rev Microbiol*, 12: 809-821, 2014). Соответственно, продуцирование ацетата было описано у всех ацетогенных микроорганизмов, выделенных к настоящему времени (Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, pages 354-420, New York, NY, Springer, 2006), поскольку продуцирование ацетата обеспечивает микроорганизму возможность прямо генерировать АТФ при субстратном фосфорилировании с помощью Pta (фосфотрансацетилазы) (EC 2.3.1.8) и Ack (ацетаткиназы) (EC 2.7.2.1). Несмотря на наличие механизмов сохранения АТФ в указанных микроорганизмах, такие как мембранные градиенты и электроразделительные ферменты, сопряженные с системами переноса ионов или протонов, например, Rnf-комплекс (Schuchmann, *Nat Rev Microbiol*, 12: 809-821, 2014), прямая генерация АТФ остается критически важной для их выживания. В результате при введении гетерологичных путей, не позволяющих генерировать АТФ, происходит продуцирование ацетата в качестве побочного продукта (Schiel-Bengelsdorf, *FEBS Lett*, 586: 2191-2198, 2012). Однако пути Ptb-Buk, описанные в настоящем документе, обеспечивают альтернативный механизм генерации АТФ для микроорганизма по механизму субстратного фосфорилирования и, соответственно, позволяют избежать продуцирования ацетата. В частности, ацетат-образующие ферменты, такие как Pta-Ack, которые в ином случае имели бы существенное значение (Nagarajan, *Microb Cell Factories*, 12: 118, 2013), могут быть заменены на Ptb-Buk в качестве альтернативного способа генерации АТФ.

Поскольку после этого микроорганизм может генерировать АТФ за счет Ptb-Buk, указанная система предоставляет движущую силу, обеспечивающую максимальный поток через новые пути, задействующие Ptb-Buk. Генерация АТФ может также быть критически важным для нижерасположенных путей, требующих АТФ. Например, ферментативное продуцирование изобутилена из ацетона требует АТФ. Хотя полный путь от ацетил-КоА к изобутилену потребляет АТФ при использовании КоА-трансферазы или тиюэстеразы, при использовании Ptb-Buk указанный путь является энергетически нейтральным.

30 Приведены примеры источников Ptb и Buk. Однако следует понимать, что могут быть доступны другие подходящие источники Ptb и Buk. Кроме того, Ptb и Buk могут быть сконструированы для улучшения активности, и/или гены, кодирующие Ptb-Buk, могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии, в частности, в микроорганизмах-хозяевах.

31 Фосфатбутирилтрансфераза может представлять собой любой источник или может происходить, например, из любого из следующих источников, последовательности которых общедоступны:

Описание	Микроорганизм	Номер доступа
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	EKQ52186
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_009167896
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	WP_015390396
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	WP_022743598
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_026886639
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_041893500
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium butyricum</i>	WP_003410761
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CDB14331
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_049180512
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CDB74819
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium paraputrificum</i>	WP_027098882
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_024615655
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium celatum</i>	WP_005211129
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium baratii</i>	WP_039312969
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium intestinale</i>	WP_021800215
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_042402499
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_032117069
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium perfringens</i>	ABG85761
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_003374233
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_004460499
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_003454254
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_041707926
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium perfringens</i>	BAB82054
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_008681116
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium chauvoei</i>	WP_021876993
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium colicanis</i>	WP_002598839
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium cadaveris</i>	WP_027637778
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	WP_010966357

фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium pasteurianum</i>	WP_015617430
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium arbusti</i>	WP_010238988
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium pasteurianum</i>	WP_003445696
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_029160341
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_032120461
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium drakei</i>	WP_032078800
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_021281241
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium argentinense</i>	WP_039635970
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium akagii</i>	WP_026883231
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_053242611
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	WP_007063154
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_035292411
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	WP_035133394
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	WP_035147564
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium hydrogeniformans</i>	WP_027633206
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_040212965
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Candidatus Clostridium</i>	WP_040327613
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_040192242
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_050606427
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium hundense</i>	WP_027625137
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium algidicarnis</i>	WP_029451333
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_035306567
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AAA75486
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_025775938
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_045541062
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_003357252
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_030037192
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium bornimense</i>	WP_044039341
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_041346554
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_053468896
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия порядка <i>Clostridiales</i>	WP_034572261
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium tetani</i>	WP_023439553
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия порядка <i>Clostridiales</i>	ERI95297
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_047403027
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium tetani</i>	WP_011100667
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium tetani</i>	WP_035111554
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium senegalense</i>	WP_010295062
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Caloramator sp.</i>	WP_027307587
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Thermobrachium celere</i>	WP_018661036
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium cellulovorans</i>	WP_010073683
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Coprococcus comes</i>	CDB84786
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Coprococcus comes</i>	WP_008371924
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Eubacterium sp.</i>	CCZ03827
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CCZ05442
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Caloramator australicus</i>	WP_008907395
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CCY59505

фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_035626368
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_027440767
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Fervidicella metallireducens</i>	WP_035381340
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CCX89274
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Eubacterium xylanophilum</i>	WP_026834525
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Roseburia sp.</i>	CDF44203
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Butyrivibrio crossotus</i>	WP_005600912
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_027117626
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CDA68345
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия семейства <i>Peptostreptococcaceae</i>	WP_026899905
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Butyrivibrio crossotus</i>	CCY77124
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	CDE44914
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Coprococcus eutactus</i>	WP_004853197
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия <i>Firmicutes</i>	CCY23248
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_027111007
фосфатбутирилтрансфераза	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_016293387
фосфатбутирилтрансфераза	<i>Clostridium sp.</i>	WP_046822491

32 Согласно предпочтительному варианту реализации фосфатбутирилтрансфераза представляет собой Ptb из *Clostridium acetobutylicum* (WP_010966357; SEQ ID NO: 87) или *Clostridium beijerinckii* (WP_026886639; SEQ ID NO: 88) (WP_041893500; SEQ ID NO: 89).

5 *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* естественным образом не содержат фосфатбутирилтрансферазу.

33 Указанная бутираткиназа может представлять собой любой источник или может происходить, например, из любого из следующих источников, последовательности которых общедоступны:

Описание	Микроорганизм	Номер доступа
бутираткиназа	<i>Clostridium pasteurianum</i>	ALB48406
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	CDB14330
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	CDB74820
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	EKQ52187
бутираткиназа	<i>Clostridium perfringens</i>	Q0SQK0
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_002582660
бутираткиназа	<i>Clostridium colicanis</i>	WP_002598838
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_003371719
бутираткиназа	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_003454444
бутираткиназа	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_004459180
бутираткиназа	<i>Clostridium celatum</i>	WP_005211128
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_008681112
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_008681114
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_009167897
бутираткиназа	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_011010889
бутираткиназа	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_011967556
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_012422882

бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_012450845
бутираткиназа	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	WP_015390397
бутираткиназа	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_017209677
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_017825911
бутираткиназа	<i>Clostridium chauvoei</i>	WP_021876994
бутираткиназа	<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	WP_022743599
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_024615656
бутираткиназа	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_025648345
бутираткиназа	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_026886638
бутираткиназа	<i>Clostridium paraputrificum</i>	WP_027098883
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_032117070
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_035786166
бутираткиназа	<i>Clostridium baratii</i>	WP_039312972
бутираткиназа	<i>Clostridium diolis</i>	WP_039772701
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_041082388
бутираткиназа	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_041893502
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_042402497
бутираткиназа	<i>Clostridium baratii</i>	WP_045725505
бутираткиназа	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_049039634
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_049180514
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_053341511
бутираткиназа	<i>Clostridium butyricum</i>	ABU40948
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	CDE44915
бутираткиназа	<i>Clostridium senegalense</i>	WP_010295059
бутираткиназа	<i>Clostridium intestinale</i>	WP_021800216
бутираткиназа	<i>Eubacterium ventriosum</i>	WP_005363839
бутираткиназа	Бактерия порядка <i>Clostridiales</i>	WP_021657038
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_021281242
бутираткиназа	<i>Clostridium sporogenes</i>	WP_045520059
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_050606428
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_012048334
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_012343352
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_003401518
бутираткиназа	<i>Clostridium argentinense</i>	WP_039635972
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_003357547
бутираткиназа	<i>Clostridium hydrogeniformans</i>	WP_027633205
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_033066487
бутираткиназа	<i>Roseburia sp.</i>	CDF44202
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_027111008
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	CDA68344
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_022782491
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_012101111
бутираткиназа	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	WP_007063155
бутираткиназа	<i>Clostridium botulinum</i>	WP_041346556
бутираткиназа	<i>Clostridium drakei</i>	WP_032078801
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_032120462

бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_053468897
бутираткиназа	Бактерия <i>Firmicutes</i>	CCZ27888
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_035306569
бутираткиназа	<i>Coprococcus comes</i>	CDB84787
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_035292410
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	CCX89275
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_040212963
бутираткиназа	<i>Clostridium pasteurianum</i>	WP_003445697
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_053242610
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_016299320
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_022785085
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_016281561
бутираткиназа	<i>Eubacterium sp.</i>	CDA28786
бутираткиназа	<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_029160342
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_016228168
бутираткиназа	<i>Clostridium pasteurianum</i>	WP_015617429
бутираткиназа	<i>Clostridium algidicarnis</i>	WP_029451332
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_016293388
бутираткиназа	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	WP_035133396
бутираткиназа	<i>Clostridium tetani</i>	WP_011100666
бутираткиназа	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	WP_035147567
бутираткиназа	<i>Subdoligranulum variabile</i>	WP_007045828
бутираткиназа	<i>Eubacterium sp.</i>	CCZ03826
бутираткиназа	Бактерия <i>Firmicutes</i>	CDF07483
бутираткиназа	<i>Eubacterium sp.</i>	CDB13677
бутираткиназа	<i>Clostridium sp.</i>	WP_008400594
бутираткиназа	<i>Clostridium tetani</i>	WP_023439552
бутираткиназа	Бактерия порядка <i>Clostridiales</i>	WP_022787536
бутираткиназа	Бактерия семейства <i>Lachnospiraceae</i>	WP_027434709
бутираткиназа	Бактерия <i>Firmicutes</i>	CCY23249
бутираткиназа	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	WP_010966356

34 Согласно предпочтительному варианту реализации указанная бутираткиназа представляет собой Buk из *Clostridium acetobutylicum* (WP_010966356; SEQ ID NO: 90) или *Clostridium beijerinckii* (WP_011967556; SEQ ID NO: 91) (WP_017209677; SEQ ID NO: 92) (WP_026886638; SEQ ID NO: 93) (WP_041893502; SEQ ID NO: 94). *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* естественным образом не содержат бутираткиназу.

35 Поскольку Ptb-Buk, как было показано, функционирует на широком диапазоне субстратов, разумно предположить, что в случае, когда Ptb-Buk не проявляет какой-либо активности в отношении требуемого субстрата, Ptb-Buk может быть сконструирована таким образом, чтобы добиться активности в отношении представляющего интерес субстрата. Может быть использована (однако без ограничений) стратегия рационального дизайна на основании доступных кристаллических структур Ptb и Buk, содержащих и не содержащих связанный субстрат, при этом связывающий карман может подвергаться изменениям для приведения в соответствие новому

субстрату, или посредством насыщающего мутагенеза. После получения активности указанная активность может быть дополнительно усилена путем проведения итеративных (многократных) циклов ферментного конструирования. Указанные работы по конструированию могут быть скомбинированы с анализами для тестирования ферментной активности. Ранее была подтверждена
 5 эффективность указанных видов стратегий (см., например, Huang, *Nature*, 537: 320-327, 2016; Khoury, *Trends Biotechnol*, 32: 99–109, 2014; Packer, *Nature Rev Genetics*, 16: 379-394, 2015; Privett, *PNAS USA*, 109: 3790-3795, 2012).

36 Для улучшения субстратной специфичности Ptb-Buk в отношении специфического ацил-КоА субстрата может быть проведен скрининг вариантов Ptb-Buk из общедоступных баз данных
 10 или полученных мутантных Ptb-Buk (например, путем направленной эволюции) с применением высокопроизводительного анализа, а именно, избыточной экспрессии пары ферментов Ptb-Buk у *E. coli*, добавления экспериментального субстрата и скрининга на продуцирование АТФ с применением анализа биolumинесценции. В указанном анализе может быть использована устоявшаяся практика соотнесения концентрации АТФ с биolumинесценцией, обусловленной
 15 ферментом – люциферазой светлячков. Возможность проведения указанного анализа в формате многолуночного планшета облегчает эффективный скрининг на субстратную специфичность новых комбинаций Ptb-Buk (фиг. 33).

37 За счет проведения скрининга на продуцирование АТФ, а не на истощение субстрата или накопления продукта, указанный анализ позволяет избежать измерения спонтанного гидролиза
 20 КоА-группы. Однако альтернативный описанный в литературе подход заключается в использовании свободного КоА, который может быть измерен с помощью известного анализа с применением реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) или DTNB) (Thompson, *Appl Environ Microbiol*, 56: 607-613, 1990.) для оценки эффективности сопряжения реакций Ptb-Buk (фиг. 33). Ацил-КоА и соответствующие им свободные кислоты и
 25 промежуточные фосфорсодержащие продукты могут также быть измерены в течение фазы валидации с применением ЖХ-МС/МС.

38 При применении способов высокопроизводительного скрининга кинетические данные собирать сложно ввиду трудоемкости количественного определения белков. Вместо этого для
 30 каждого состава лизата *E. coli*, содержащего ферменты Ptb-Buk, активность в отношении каждого представляющего интерес субстрата (измеряемая как люминесценция на единицу времени) может быть сравнена с активностью в отношении положительного контрольного субстрата (бутирил-КоА) и в отношении ацетил-КоА (физиологический субстрат, предположительно обеспечивающий максимальную конкуренцию для активных участков фермента, направленных против целевого ацил-КоА).

39 Для предотвращения смещения результатов анализа из-за активности нативной фосфотрансацетилазы (Pta) и/или ацетаткиназы (Ack) указанный анализ может также быть
 35 проведен на штамме *E. coli* с нокаутированными генами *pta* и/или *ack*.

Получение ацетона и изопропанола

40 Ацетон и изопропанол представляют собой имеющие важное значение промышленные растворители, совокупный объем рынка которых составляет 8 млн тонн, а стоимость мирового рынка составляет 8,5–11 млрд долларов. Кроме того, ацетон и изопропанол являются

5 предшественниками ценных выходных продуктов, в том числе полиметилметакрилата (ПММА), стоимость мирового рынка которого составляет 7 млрд долларов, изобутилена, стоимость мирового рынка которого составляет 25–29 млрд долларов, и пропилена, стоимость мирового рынка которого составляет 125 млрд долларов. Кроме того, недавно был описан маршрут для получения авиатоплива из ацетона. В настоящее время промышленное получение ацетона прямо

10 связано с получением фенола нефтехимическим способом, поскольку он представляет собой побочный продукт процесса обработки кумола. Около 92% выхода ацетона по объему представляет собой сопутствующий продукт при получении фенола из кумола. Это связано с серьезными последствиями как для окружающей среды, так и для рынка. В процессе обработки кумола на каждый моль фенола приходится один моль образующегося сульфита натрия, что

15 порождает серьезные проблемы, связанные с обработкой отходов, и создает угрозу для природной среды и здоровья человека. Ожидается, что мировой спрос на фенол ожидает стагнация или падение, тогда как спрос на ацетон, предположительно, будет возрастать. Разрабатываются и, согласно ожиданиям, скоро будут коммерциализированы альтернативные маршруты получения фенола путем прямого окисления бензена; это может привести к полной элиминации производства

20 ацетона.

41 Ацетон получают в промышленных масштабах на протяжении почти 100 лет, в качестве побочного продукта бутанола в ходе ацетон-бутанол-спиртовой (АБЕ) ферментации. Хотя промышленная АБЕ-ферментация сошла на нет во второй половине 20 века из-за низких цен на нефть и высокой стоимости сахара, недавно она была возобновлена, и на протяжении последних

25 нескольких лет было построено несколько коммерческих заводов. Несколькими академическими группами было также продемонстрировано получение ацетона из сахара у гетерологичных хозяев, которые экспрессируют соответствующие ферменты АБЕ-ферментирующих организмов, в частности, *E. coli* и дрожжей, путем метаболического конструирования и применения методов синтетической биологии. Однако незначительный выход и высокая стоимость, ассоциированные с

30 предварительной обработкой, необходимой для высвобождения полисахаридного компонента биомассы, делает получение ацетона посредством стандартной ферментации экономически неоправданным, поскольку в современных технологиях биохимического преобразования не используется лигниновый компонент биомассы, который может составлять до 40% от указанного материала.

42 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать ацетон или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения ацетона или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы,

40 состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*.

Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования ацетона могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

5 **43** Получение ацетона путем осуществления этапов 1, 2 и 3: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 2 и 3, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать ацетон или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно 10 предпочтительному варианту реализации этап 2 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 2 и 3 описаны в различных разделах настоящей заявки. В тех случаях, когда указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, который естественным образом содержит первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу, способную к преобразованию ацетона в изопропанол (этап 4) (например, *Clostridium autoethanogenum*, 15 *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*), указанный микроорганизм может быть модифицирован для нокдауна или нокаута экспрессии первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (например, путем разрушения гена, кодирующего указанную первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу), таким образом, что указанный микроорганизм продуцирует ацетон без его преобразования в изопропанол (WO 2015/085015).

20 **44** Получение ацетона путем осуществления этапов 1, 13, 14, 15 и 3: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий экзогенные ферменты для этапов 1, 13, 14, 15 и 3, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать ацетон или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для 25 указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 14 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 14, 15 и 3 описаны в различных разделах настоящей заявки. В тех случаях, когда указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, который естественным образом содержит первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу, способную к преобразованию ацетона в изопропанол (этап 4) (например, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, или 30 *Clostridium ragsdalei*), указанный микроорганизм может быть модифицирован для нокдауна или нокаута экспрессии первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (например, путем разрушения гена, кодирующего указанную первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу), таким образом, что указанный микроорганизм продуцирует ацетон без его преобразования в изопропанол (WO 35 2015/085015).

45 Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм может содержать более чем один путь продуцирования ацетона.

46 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать изопропанол или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также 40 предложен способ получения изопропанола или его предшественников путем культивирования

такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования изопропанола могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

47 Получение изопропанола путем осуществления этапов 1, 2, 3 и 4: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 2, 3 и 4, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изопропанол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 2 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 2, 3 и 4 описаны в различных разделах настоящей заявки. В том случае, когда микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, который естественным образом содержит первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу, способную к преобразованию ацетона в изопропанол (этап 4) (например, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*), введение экзогенного фермента для этапа 4 не является необходимым для получения изопропанола. Однако модификация указанного микроорганизма, например, для сверхэкспрессии нативной первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы, может приводить к усиленному продуцированию изопропанола.

48 Получение изопропанола путем осуществления этапов 1, 13, 14, 15, 3 и 4: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13, 14, 15, 3 и 4, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изопропанол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 14 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 14, 15, 3 и 4 описаны в различных разделах настоящей заявки. В тех случаях, когда указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, который естественным образом содержит первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу, способную к преобразованию ацетона в изопропанол (этап 4) (например, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*), введение экзогенного фермента для этапа 4 не является необходимым для продуцирования изопропанола. Однако модификация микроорганизма, например, для избыточной экспрессии нативной первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы может приводить к усиленному продуцированию изопропанола.

49 Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм может содержать более чем один путь продуцирования изопропанола.

Получение изобутилена

- 50** Изобутилен относится к основным химическим строительным блокам с объемом рынка, превышающим 15 млн тонн, и стоимостью мирового рынка, составляющей 25–29 млрд долларов. Помимо применения в химии и в качестве топливной присадки (15 Мт/год), изобутилен может
- 5 быть преобразован в изооктан, высокоэффективное альтернативное топливо для автомобилей с бензиновыми двигателями. Global Bioenergies были поданы патентные заявки, относящиеся к ферментативному продуцированию изобутена (т.е. изобутилена) из ацетона, однако ни в один из раскрытых маршрутов не входит Ptb-Buk (WO 2010/001078; EP 2295593; WO 2011/076691; van Leeuwen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1377-1387, 2012).
- 10 **51** Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать изобутилен или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения изобутилена или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из
- 15 группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования изобутилена могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.
- 20 **52** На фиг. 1 показаны два альтернативных маршрута продуцирования изобутилена. Первый включает получение изобутилена путем осуществления этапов 1, 2, 3, 5 и 6. Второй включает получение изобутилена путем осуществления этапов 1, 2, 3, 7, 8 и 6. Этапы 2 и 8 могут быть катализированы Ptb-Buk. Соответственно, каждый маршрут может включать Ptb-Buk.
- 53** Получение изобутилена путем осуществления этапов 1, 2, 3, 5 и 6: согласно одному
- 25 варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 2, 3, 5 и 6, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изобутилен или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 2 катализирует Ptb-Buk.
- 30 Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 2, 3, 5 и 6 описаны в различных разделах настоящей заявки. В тех случаях, когда указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, который естественным образом содержит первичную/вторичную алкогольдегидрогеназу, способную к преобразованию ацетона в изопропанол (этап 4) (например, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*), указанный
- 35 микроорганизм может быть модифицирован для нокдауна или нокаута экспрессии первичной/вторичной алкогольдегидрогеназы (например, путем разрушения гена, кодирующего указанную первичную/вторичную алкогольдегидрогеназу), для предотвращения преобразования ацетона в изопропанол и максимизации преобразования ацетона в изобутилен.

54 Получение изобутилена путем осуществления этапов 1, 2, 3, 7, 8 и 6: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 2, 3, 7, 8 и 6, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изобутилен или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 2 и/или этап 8 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 2, 3, 7, 8 и 6 описаны в различных разделах настоящей заявки. В тех случаях, когда указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, который естественным образом содержит первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу, способную к преобразованию ацетона в изопропанол (этап 4) (например, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, или *Clostridium ragsdalei*), указанный микроорганизм может быть модифицирован для нокдауна или нокаута экспрессии первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (например, путем разрушения гена, кодирующего указанную первичную:вторичную алкогольдегидрогеназу) для предотвращения преобразования ацетона в изопропанол и максимизации преобразования ацетона в изобутилен.

Получение 3-гидроксibuтирата

55 3-Гидроксibuтират (3-ГБ) представляет собой четырехуглеродную карбоновую кислоту из семейства бета-гидроксикислот. 3-Гидроксibuтират представляет собой косметический ингредиент для очищения кожи жирного типа, промежуточный продукт при приготовлении антивозрастных кремов, промежуточный продукт при получении полигидроксibuтирата (PHB), биоразлагаемой полимерной смолы и ко-мономер для других полигидроксикислот при получении новых биопластиков. Кроме того, частные варианты применения 3-гидроксibuтирата включают применение в составе биосовместимых и биоразлагаемых нанокмппозитов, в частности, медицинских имплантатов, применение в качестве промежуточного продукта химических C3/C4-продуктов, хиральных строительных блоков и продуктов тонкой химии. Несмотря на продуцирование (R)- и (S)-3-гидроксibuтирата рекомбинантной *E. coli*, растущей на глюкозе, продуцирование 3-гидроксibuтирата микроорганизмами, растущими на газообразных субстратах, продемонстрировано не было (Tseng, *Appl Environ Microbiol*, 75: 3137-3145, 2009). Отметим, что указанная система, ранее продемонстрированная на *E. coli*, не могла быть прямо перенесена на ацетогены, в том числе *C. autoethanogenum*, ввиду присутствия в ацетогенах нативной тиоэстеразы. Хотя *E. coli* также содержит тиоэстеразу TesB, которая может действовать на 3-ГБ-КоА, Tseng показал, что фоновая активность минимальна (< 0,1 г/л). При том, что сообщалось о продуцировании чистых стереоизомеров *E. coli*, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что *C. autoethanogenum* продуцировал смесь изомеров. Без связи с конкретной теорией, это предположительно является результатом активности нативной изомеразы. Это позволяет сочетать комбинацию (S)-специфической 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназы (Hbd) с (R)-специфической Ptb-Buk для оптимизированного продуцирования. Для получения чистых стереоизомеров указанная активность может быть нокаутирована. В совокупности, настоящее изобретение обеспечивает получение нескольких г/л 3-ГБ, в отличие от низких уровней продукции

в *E. coli*, с применением Ptb-Buk в любой комбинации с (R)- или (S)-специфической 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназой, и нативной тиоэстеразы *Clostridium autoethanogenum*.

56 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать 3-гидроксibuтират или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 3-гидроксibuтирата или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования 3-гидроксibuтирата могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

57 На фиг. 1 показаны два альтернативных маршрута продуцирования 3-гидроксibuтирата. Первый предусматривает продуцирование 3-гидроксibuтирата путем осуществления этапов 1, 2 и 15. Второй предусматривает продуцирование 3-гидроксibuтирата путем осуществления этапов 1, 13 и 14. Этапы 2 и 14 могут быть катализированы Ptb-Buk. Соответственно, каждый маршрут может задействовать Ptb-Buk. Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм может содержать более чем один путь продуцирования 3-гидроксibuтирата, при этом Ptb-Buk может катализировать более чем один этап (например, этапы 2 и 14).

58 Получение 3-гидроксibuтирата путем осуществления этапов 1, 2 и 15: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 2 и 15, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 3-гидроксibuтират или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 2 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 2 и 15 описаны в различных разделах настоящей заявки.

59 Получение 3-гидроксibuтирата путем осуществления этапов 1, 13 и 14: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13 и 14, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 3-гидроксibuтират или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 14 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13 и 14 описаны в различных разделах настоящей заявки.

Получение 1,3-бутандиола

60 1,3-Бутандиол (1,3-BDO) часто применяют в качестве растворителя для пищевых вкусоароматических агентов; он представляет собой комономер для применения в некоторых полиуретановых и полиэфирных смолах. Что еще более важно, 1,3-бутандиол может быть

каталитически преобразован в 1,3-бутадиен (Makshina, *Chem Soc Rev*, 43: 7917-7953, 2014). Бутадиен применяют для получения резины, пластиков, смазывающих веществ, латекса и других продуктов. Хотя большая часть получаемого в настоящее время бутадиена используется для изготовления резины для автомобильных шин, он может также быть использован для получения адипонитрила, который может применяться при изготовлении нейлона 6,6. Мировой спрос на бутадиен в настоящее время растет. В 2011 году подсчитанный спрос составил 10,5 млн тонн, оцениваемых в 40 млрд долларов.

61 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать 1,3-бутандиол или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также 10 предложен способ получения 1,3-бутандиола или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого 15 микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования 1,3-бутандиола могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

62 Согласно некоторым вариантам реализации указанный микроорганизм может продуцировать 1,3-бутандиол без ко-продукции этанола (или продуцируя только незначительное 20 количество этанола, например, менее чем 0,1–1,0 г/л этанола или менее чем 1–10 г/л этанола).

63 На фиг. 1 показаны три альтернативных маршрута продуцирования 1,3-бутандиола. Первый предусматривает продуцирование 1,3-бутандиола путем осуществления этапов 1, 2, 15, 16 и 17. Второй предусматривает продуцирование 1,3-бутандиола путем осуществления этапов 1, 13, 14, 16 и 17. Третий предусматривает продуцирование 1,3-бутандиола путем осуществления этапов 25 1, 13, 18 и 17. Этапы 2 и 14 могут быть катализированы Ptb-Buk. Соответственно, по меньшей мере первый и второй маршруты могут задействовать Ptb-Buk. Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм может содержать более чем один путь продуцирования 1,3-бутандиола. Согласно родственному варианту реализации Ptb-Buk может катализировать более чем один этап (например, этапы 2 и 14).

30 64 Получение 1,3-бутандиола путем осуществления этапов 1, 2, 15, 16 и 17: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 2, 15, 16 и 17, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 1,3-бутандиол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного 35 микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 2 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 2, 15, 16 и 17 описаны в различных разделах настоящей заявки.

65 Получение 1,3-бутандиола путем осуществления этапов 1, 13, 14, 16 и 17: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты

для этапов 1, 13, 14, 16 и 17, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 1,3-бутандиол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 14 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 14, 16 и 17 описаны в различных разделах настоящей заявки.

66 Получение 1,3-бутандиола путем осуществления этапов 1, 13, 18 и 17: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13, 18 и 17, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 1,3-бутандиол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат (фиг. 11). Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 18 и 17 описаны в различных разделах настоящей заявки. Наличие аналогичного маршрута было продемонстрировано у *E. coli*, однако не в ацетогенах, таких как *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* (Kataoka, *J Biosci Bioeng*, 115: 475-480, 2013). Хотя применение Ptb-Buk приводит к продуцированию (R)-1,3-бутандиола, указанный маршрут, не требующий применения Ptb-Buk, может приводить к продуцированию (S)-1,3-бутандиола.

Получение 2-гидроксиизобутирата

67 2-Гидроксиизобутират (2-ГИБ) представляет собой четырехуглеродную карбоновую кислоту, которая может служить в качестве строительных блоков для многих типов полимеров. Сложный метиловый эфир метакриловой кислоты, который может быть синтезирован путем обезвоживания 2-гидроксиизобутирата или применения соответствующего амида, полимеризуют с образованием полиметилметакрилата (PMMA) для получения акрилового стекла, прочных покрытий и чернил. Объем мирового рынка одного только указанного соединения превышает 3 млн тонн. Другие разветвленные карбоновые C4-кислоты, например, хлоро- и аминопроизводные 2-гидроксиизобутирата, а также изобутиленгликоль и его оксид, также используют в полимерах и для многих других применений.

68 Стереоспецифичность системы Ptb-Buk, в частности, подходит для преодоления ограничений существующего уровня техники в отношении получения 2-гидроксиизобутирата. И Ptb-Buk, и тиоэстеразы являются неизбирательными, таким образом, побочная активность с 3-гидроксибутирил-КоА может отвлекать ресурсы из целевых путей продуцирования 2-гидроксиизобутирил-КоА (см., например, фиг. 1 и фиг. 8). Однако Ptb-Buk способна различать стереоизомеры и действует на (R)-3-гидроксибутирил-КоА, но не на (S)-3-гидроксибутирил-КоА. Напротив, тиоэстеразы неспособны различать стереоизомеры 3-гидроксибутирил-КоА. Согласно предпочтительному варианту реализации выбирают (S)-специфическую ацетоацетил-КоА-гидратазу (EC 4.2.1.119) (этап 13) в комбинации с Ptb-Buk (этап 20), чтобы избежать потерь с образованием 3-гидроксибутирата и максимизировать выход 2-гидроксиизобутирата (фиг. 8). Указанная (S)-специфическая форма 3-гидроксибутирил-КоА также представляет собой предпочтительный субстрат 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутазы (EC 5.4.99.-) (этап 19) (Yaneva, *J Biol Chem*, 287: 15502-15511, 2012).

69 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать 2-гидроксиизобутират или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 2-гидроксиизобутирата или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования 2-гидроксиизобутирата могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

70 Получение 2-гидроксиизобутирата путем осуществления этапов 1, 13, 19 и 20: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13, 19 и 20, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 2-гидроксиизобутират или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 20 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 19 и 20 описаны в различных разделах настоящей заявки.

71 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен также микроорганизм, способный продуцировать 2-гидроксибутират (2-ГБ) или его предшественники из субстрата. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 2-гидроксибутирата или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Без связи с конкретной теорией, авторы настоящего изобретения считают, что наблюдаемое продуцирование 2-гидроксибутирата обусловлено неспецифической мутазной активностью у таких микроорганизмов, как *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

Получение адипиновой кислоты

72 Адипиновая кислота представляет собой наиболее важную дикарбоновую кислоту, рынок которой оценивается более чем в 4,5 млрд долларов США при ежегодном уровне производства, составляющем приблизительно 2,5 млрд кг. Более 60% полученной адипиновой кислоты используют в качестве мономерного предшественника для получения нейлона; стоимость мирового рынка адипиновой кислоты предположительно достигнет 7,5 млрд долларов США к 2019 году. В настоящее время практически всю адипиновую кислоту получают петрохимически, например, путем карбонилирования бутадиена.

73 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать адипиновую кислоту или ее предшественники из субстрата (фиг. 34). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения адипиновой кислоты или ее предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного

микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования адипиновой кислоты могут включать эндогенные ферменты и, при
5 отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

74 Получение адипиновой кислоты путем осуществления этапов 22, 23, 24, 25 и 26: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 22, 23, 24, 25 и 26, за счет чего указанный микроорганизм способен
10 продуцировать адипиновую кислоту или ее предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 26 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 22, 23, 24, 25 и 26 описаны в различных разделах настоящей заявки.

75 Получение адипиновой кислоты путем осуществления этапов 21, 22, 23, 24, 25 и 26: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 21, 22, 23, 24, 25 и 26, за счет чего указанный микроорганизм
15 способен продуцировать адипиновую кислоту или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 26 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 21, 22, 23, 24,
20 25 и 26 описаны в различных разделах настоящей заявки.

76 Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм может содержать более чем один путь продуцирования адипиновой кислоты.

Получение 1,3-гександиола

77 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать 1,3-гександиол или его предшественники из субстрата (фиг. 35). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 1,3-гександиола или его предшественников
25 путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные
30 пути продуцирования 1,3-гександиола могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

78 Пути, представленные на фиг. 35, начинаются с 3-гидроксibuтирил-КоА, который может быть получен путем осуществления этапов 1 и 13, как показано на фиг. 1.

79 Получение 1,3-гександиола путем осуществления этапов 1, 13, 27, 31, 32, 36, 37, 38 и 39: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13, 27, 31, 32, 36, 37, 38 и 39, за счет чего указанный
35

микроорганизм способен продуцировать 1,3-гександиол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 37 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 27, 31, 32, 36, 37, 38 и 39 описаны в различных разделах настоящей заявки.

Получение 3-метил-2-бутанола

80 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать 3-метил-2-бутанол или его предшественники из субстрата (фиг. 35). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 3-метил-2-бутанола или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования 3-метил-2-бутанола могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

81 Пути, представленные на фиг. 35, начинаются с 3-гидроксibuтирил-КоА, который может быть получен путем осуществления этапов 1 и 13, как показано на фиг. 1.

82 Получение 3-метил-2-бутанола путем осуществления этапов 1, 13, 27, 31, 32, 33, 34 и 35: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13, 27, 31, 32, 33, 34 и 35, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 3-метил-2-бутанол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 33 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 27, 31, 32, 33, 34 и 35 описаны в различных разделах настоящей заявки.

Получение 2-бутен-1-ола

83 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать 2-бутен-1-ол или его предшественники из субстрата (фиг. 35). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 2-бутен-1-ола или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования 2-бутен-1-ола могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

84 Пути, представленные на фиг. 35, начинаются с 3-гидроксibuтирил-КоА, который может быть получен путем осуществления этапов 1 и 13, как показано на фиг. 1.

85 Получение 2-бутен-1-ола путем осуществления этапов 1, 13, 27, 28, 29 и 30: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 13, 27, 28, 29 и 30, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать 2-бутен-1-ол или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 28 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 13, 27, 28, 29 и 30 описаны в различных разделах настоящей заявки.

Получение изовалерата

86 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать изовалерат или его предшественники из субстрата (фиг. 36). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения изовалерата или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные пути продуцирования изовалерата могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

87 Получение изовалерата путем осуществления этапов 1, 40, 41, 42, 43 и 44: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 40, 41, 42, 43 и 44, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изовалерат или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 44 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 40, 41, 42, 43 и 44 описаны в различных разделах настоящей заявки.

Получение изоамилового спирта

88 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, способный продуцировать изоамиловый спирт или его предшественники из субстрата (фиг. 36). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения изоамилового спирта или его предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Однако указанный микроорганизм может также происходить из совершенно другого микроорганизма, например, *Escherichia coli*. Описанные ферментативные

пути продуцирования изоамилового спирта могут включать эндогенные ферменты и, при отсутствующей или низкой активности эндогенных ферментов, экзогенные ферменты.

89 Получение изоамилового спирта путем осуществления этапов 1, 40, 41, 42, 43, 44, 45 и 46: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 40, 41, 42, 43, 44, 45 и 46, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изоамиловый спирт или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Согласно предпочтительному варианту реализации этап 44 катализирует Ptb-Buk. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 40, 41, 42, 43, 44, 45 и 46 описаны в различных разделах настоящей заявки.

90 Получение изоамилового спирта путем осуществления этапов 1, 40, 41, 42, 43, 47 и 46: согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен микроорганизм, содержащий ферменты для этапов 1, 40, 41, 42, 43, 47 и 46, за счет чего указанный микроорганизм способен продуцировать изоамиловый спирт или его предшественники из субстрата, такого как газообразный субстрат. Обычно по меньшей мере один из ферментов в указанном пути является экзогенным для указанного микроорганизма. Примеры типов и источников ферментов для этапов 1, 40, 41, 42, 43, 47 и 46 описаны в различных разделах настоящей заявки.

91 Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм может содержать более чем один путь продуцирования изоамилового спирта.

Получение дополнительных продуктов

92 Согласно настоящему изобретению предложен микроорганизм, содержащий экзогенную Ptb-Buk и экзогенную или эндогенную альдегид:ферредоксиноксиоредуктазу (AOR). Такой микроорганизм может продуцировать, например, 1-пропанол, 1-бутанол, 1-гексанол и 1-октанол или их предшественники из ацетил-КоА, генерированного, например, из газообразного субстрата (фиг. 32). Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения 1-пропанола, 1-бутанола, 1-гексанола и 1-октанола или их предшественников путем культивирования такого микроорганизма в присутствии газообразного субстрата. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei* естественным образом содержат AOR. Однако AOR может быть избыточно экспрессирован в таких микроорганизмах в комбинации с экспрессией экзогенной Ptb-Buk. Как вариант, экзогенная AOR и экзогенная Ptb-Buk могут быть экспрессированы в микроорганизме, отличном от *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*, таком как *Escherichia coli*.

Получение предшественников и промежуточных продуктов

93 Пути, представленные на фиг. 1, 34, 35 и 36, могут быть модифицированы для получения предшественников или промежуточных продуктов вышеупомянутых продуктов. В частности, части любых ферментативных путей, описанных в настоящем документе, могут быть введены в микроорганизм-хозяина для продуцирования предшественников или промежуточных продуктов.

Определения и уровень техники

94 Термин «генетическая модификация» или «генетическое конструирование» в широком смысле относится к манипуляциям с геномом или нуклеиновыми кислотами микроорганизма. Аналогичным образом, термин «генетически сконструированный» относится к микроорганизму, содержащего подвергшиеся манипуляциям геном или нуклеиновые кислоты. Способы генетической модификации включают, например, гетерологичную генную экспрессию, инсерции или делеции генов или промоторов, мутации нуклеиновых кислот, измененную генную экспрессию или инактивацию генов, конструирование ферментов, направленную эволюцию, интеллектуальный дизайн, способы случайного мутагенеза, перестановку генов и кодон-оптимизацию.

95 «Рекомбинантный» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм представляет собой продукт генетической модификации, конструирования или рекомбинации. В общем случае, термин «рекомбинантный» относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит генетический материал или кодируемый генетическим материалом, происходящим из нескольких источников, таких как два или более разных штаммов или видов микроорганизмов. В настоящем документе термин «рекомбинантный» могут также применяться для описания микроорганизма, который содержит мутированную нуклеиновую кислоту или белок, в том числе мутированную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или белка.

96 «Эндогенный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, которая или который присутствует или экспрессируется в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, естественным образом присутствующий в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации экспрессию эндогенного гена может контролировать экзогенный регуляторный элемент, такой как экзогенный промотор.

97 «Экзогенный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, которая или который не присутствует в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации экзогенный ген или фермент может происходить из гетерологичного (т.е. другого) штамма или вида, и быть введен в микроорганизм или экспрессирован в микроорганизме согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту реализации экзогенный ген или фермент может быть получен искусственным или рекомбинантным способом, и введен в микроорганизм или экспрессирован в микроорганизме согласно настоящему изобретению. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы для интеграции в геном микроорганизма согласно настоящему изобретению или для сохранения в экстрахромосомном состоянии в микроорганизме согласно настоящему изобретению, например, в плазмиде.

98 «Ферментная активность» или просто «активность» относится к ферментативной активности в широком смысле, в том числе, однако не ограничиваясь перечисленным, активности

фермента, количеству фермента или доступности фермента для катализа реакции. Соответственно, «увеличенная» ферментная активность включает увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или увеличение доступности фермента для катализа реакции. Аналогичным образом, «уменьшенная» ферментная активность включает уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента для катализа реакции.

99 В отношении ферментной активности «субстрат» представляет собой молекулу, на которую действует фермент, а «продукт» представляет собой молекулу, продуцируемую под действием фермента. «Нативный субстрат», соответственно, представляет собой молекулу, на которую действует фермент естественным образом в микроорганизме дикого типа, а «нативный продукт» представляет собой молекулу, естественным образом продуцируемую под действием фермента в указанном микроорганизме дикого типа. Например, бутаноил-КоА представляет собой нативный субстрат Ptb, а бутаноилфосфат представляет собой нативный субстрат Buk. Кроме того, бутаноилфосфат представляет собой нативный продукт Ptb, а бутират (бутаноат) представляет собой нативный продукт Buk. Аналогичным образом, «ненативный субстрат» представляет собой молекулу, на которую фермент не действует естественным образом в микроорганизме дикого типа, а «ненативный продукт» представляет собой молекулу, не продуцируемую естественным образом под действием фермента в указанном микроорганизме дикого типа. Фермент, который способен действовать на несколько разных субстратов, нативный или ненативный, как правило, называют «неизбирательным» ферментом. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Ptb является неизбирательной и способна воспринимать различные ацил-КоА и эноил-КоА в качестве субстратов, таким образом, Ptb-Buk может применяться для преобразования ряда ацил-КоА и эноил-КоА в соответствующие кислоты или алкенаты, соответственно, с одновременной генерацией АТФ. Соответственно, согласно предпочтительным вариантам реализации Ptb-Buk согласно настоящему изобретению действует на ненативные субстраты (т.е. субстраты, отличные от бутаноил-КоА и/или бутаноилфосфата), обеспечивая получение ненативных продуктов (т.е. продуктов, отличных от бутаноилфосфата и/или бутирата (бутаноата)).

100 Термин «бутирил-КоА» в настоящем документе может применяться взаимозаменяемо с термином «бутаноил-КоА».

101 Термин «энергогенерирующий» или т.п. может применяться взаимозаменяемо в настоящем документе с термином «сохраняющий энергию» или т.п. Оба указанных термина часто используются в опубликованных источниках.

102 «Мутированный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, которые были модифицированы в микроорганизме согласно настоящему изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или исходным микроорганизмом, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации указанная мутация может представлять собой делецию, инсерцию или замену в гене, кодирующем фермент. Согласно другому варианту реализации указанная мутация может представлять собой делецию, инсерцию или замену одной или более аминокислот в ферменте.

103 В частности, «разрушающая мутация» представляет собой мутацию, которая уменьшает или элиминирует (т.е. «разрушает») экспрессию или активность гена или фермента. Разрушающая мутация может частично инактивировать, полностью инактивировать или удалять указанный ген или фермент. Разрушающая мутация может представлять собой нокаутную (КО) мутацию.

5 Разрушающая мутация может представлять собой любую мутацию, которая уменьшает, предотвращает или блокируют биосинтез продукта, продуцируемого ферментом. Разрушающая мутация может включать, например, мутацию в гене, кодирующем фермент, мутацию в генетическом регуляторном элементе, вовлеченном в экспрессию гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, уменьшающий или ингибирующий
10 активность фермента, или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК, CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Разрушающая мутация может быть введена с применением любого способа, известного в данной области техники.

104 Введение разрушающей мутации приводит к получению микроорганизма согласно настоящему изобретению, который не продуцирует целевого продукта, по существу не
15 продуцирует целевого продукта или продуцирует пониженное количество целевого продукта по сравнению с исходным микроорганизмом, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может не продуцировать целевого продукта или продуцирует по меньшей мере приблизительно на 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% меньше целевого продукта, чем
20 исходный микроорганизм. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может продуцировать менее чем приблизительно 0,001; 0,01; 0,10; 0,30; 0,50 или 1,0 г/л целевого продукта.

105 «Кодон-оптимизация» относится к мутации нуклеиновой кислоты, такой как ген, для оптимизированной или улучшенной трансляции указанной нуклеиновой кислоты у конкретного
25 штамма или вида. Кодон-оптимизация может приводить к более высоким скоростям трансляции или большей точности трансляции. Согласно предпочтительному варианту реализации гены согласно настоящему изобретению кодон-оптимизированы для экспрессии у *Clostridium*, в частности, у *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации гены согласно настоящему
30 изобретению кодон-оптимизированы для экспрессии у *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, внесенного в DSMZ под номером доступа DSM23693.

106 «Избыточно экспрессируемый» относится к увеличению экспрессии нуклеиновой кислоты или белка в микроорганизме согласно настоящему изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или исходным микроорганизмом, из которого происходит микроорганизм согласно
35 настоящему изобретению. Избыточная экспрессия может быть достигнута с применением любых способов, известных в данной области техники, в том числе модификации числа копий гена, скорости генной транскрипции, скорости генной трансляции или скорости ферментного разложения.

107 Термин «варианты» включает нуклеиновые кислоты и белки, последовательность которых
40 варьирует относительно последовательности референсной нуклеиновой кислоты и референсного

белка, например, последовательности референсной нуклеиновой кислоты и референсного белка, известной из уровня техники или описанной на примерах в настоящем документе. Практическая реализация настоящего изобретения может быть осуществлена с применением вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по существу ту же функцию, что и референсная нуклеиновая кислота или референсный белок. Например, вариант белка может выполнять по существу ту же функцию или катализируют по существу ту же реакцию, что и референсный белок. Вариант гена может кодировать тот же или по существу тот же белок, что и референсный ген. Вариант промотора может обладать по существу такой же способностью в отношении способствования экспрессии одного или более генов, что и референсный промотор.

108 Такие нуклеиновые кислоты или белки могут называться в настоящем документе «функционально эквивалентными вариантами». Например, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и т.п. Гомологичные гены из других микроорганизмов также представляют собой примеры функционально эквивалентных вариантов. Они включают гомологичные гены таких видов, как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробную информацию о которых можно найти в открытом доступе на таких Интернет-сайтах, как сайты Genbank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты также включают нуклеиновые кислоты, последовательность которых варьирует в результате кодон-оптимизации для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно отличается по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или большей идентичностью последовательности нуклеиновых кислот (процент гомологии) последовательности референсной нуклеиновой кислоты. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно отличается по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или большей идентичностью аминокислот (процент гомологии) последовательности референсного белка. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с применением любого способа, известного в данной области техники.

109 Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм согласно настоящему изобретению с применением любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде депротенинизированных нуклеиновых кислот или в составе с одним или более агентами, например, в виде липосом. Указанные нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК или их комбинации, согласно необходимости. Согласно определенным вариантам реализации могут применяться ингибиторы рестрикции. Дополнительные векторы могут включать плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. Согласно предпочтительному варианту реализации нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм согласно настоящему изобретению с применением плазмиды. Например, трансформация (в том числе трансдукция или трансфекция) может быть достигнута путем электропорации, обработки ультразвуком, полиэтиленгликоль-опосредованной

трансформации, химической или природной компетентности, трансформации протопластов, индукции профага или конъюгации. Согласно определенным вариантам реализации, предусматривающим системы активных рестрикционных ферментов, может быть необходимо метилирование нуклеиновой кислоты до введения указанной нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

110 Кроме того, могут быть разработаны нуклеиновые кислоты, содержащие регуляторный элемент, такой как промотор, для увеличения или контроля экспрессии конкретной нуклеиновой кислоты иным образом. Указанный промотор может представлять собой конститутивный промотор или индуцируемый промотор. В идеале, указанный промотор представляет собой промотор пути Вуда-Льонгдала, промотор ферредоксина, промотор пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона Rnf-комплекса, промотор оперона АТФ-синтазы или промотор оперона фосфотрансацилазы/ацетаткиназы.

111 «Микроорганизм» представляет собой микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или гриб. Микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой, как правило, бактерию. Следует понимать, что в настоящем документе при упоминании «микроорганизма» подразумевается и «бактерия».

112 «Исходный микроорганизм» представляет собой микроорганизм, применяемый для получения микроорганизма согласно настоящему изобретению. Указанный исходный микроорганизм может представлять собой встречающийся в природе микроорганизм (т.е. микроорганизм дикого типа) или микроорганизм, который был модифицирован ранее (т.е. мутантный или рекомбинантный микроорганизм). Указанный микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть модифицирован для экспрессии или избыточной экспрессии одного или более ферментов, которые не экспрессировались или не экспрессировались избыточно в исходном микроорганизме. Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть модифицирован так, что он содержит один или более генов, которые не содержались в исходном микроорганизме. Микроорганизм согласно настоящему изобретению может также быть модифицирован таким образом, чтобы не экспрессировать один или более ферментов или экспрессировать их меньшие количества по сравнению с исходным микроорганизмом. Согласно одному варианту реализации указанный исходный микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный исходный микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, внесенный в DSMZ под номером доступа DSM23693.

113 Термин «происходящий из» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицирован или адаптирован из другой нуклеиновой кислоты, другого белка или микроорганизма (например, исходной нуклеиновой кислоты, исходного белка или микроорганизма; или нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма дикого типа), с получением новой нуклеиновой кислоты, нового белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации, как правило, включают инсерцию, делецию, мутацию или замену нуклеиновых кислот или генов. В общем случае, микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит

из исходного микроорганизма. Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, внесенного в DSMZ под номером доступа DSM23693.

114 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть дополнительно классифицирован на основании функциональных характеристик. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может представлять собой C1-фиксирующий микроорганизм или может происходить из C1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этаногена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа. В таблице 1 приведен репрезентативный перечень микроорганизмов и идентифицированы их функциональные характеристики.

Таблица 1

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

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

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

³ Был описан один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, продуцирующий 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.

115 «C1» относится к содержащей один атом углерода молекуле, например, CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. «C1-оксигенат» относится к содержащей один атом углерода молекуле, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. «C1-источник

5 углерода» относится к содержащей один атом углерода молекуле, которая служит в качестве частичного или единственного источника углерода для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Например, C1-источник углерода может содержать что-либо одно или более из CO, CO₂, CH₄, CH₃OH или CH₂O₂. Предпочтительно, C1-источник углерода содержит что-либо одно из CO и CO₂ или и первое, и второе. «C1-фиксирующий микроорганизм» представляет собой

10 микроорганизм, который обладает способностью продуцировать один или более продуктов из C1-источника углерода. Обычно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из C1-фиксирующего микроорганизма, идентифицированного в таблице 1.

15 116 «Анаэроб» представляет собой микроорганизм, которому не требуется кислород для роста. Анаэроб может негативно реагировать или даже погибать при присутствии кислорода в количестве, превышающем определенный порог. Обычно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой анаэроба. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из анаэроба,

20 идентифицированного в таблице 1.

117 «Ацетоген» представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать ацетат (или уксусную кислоту) как продукт анаэробного дыхания. Обычно ацетогены являются облигатно анаэробными бактериями, использующими путь Вуда-Льюнгаля в качестве основного механизма сохранения энергии и синтеза происходящих из ацетил-КоА и ацетил-КоА продуктов, таких как ацетат (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008).

25 Ацетогены используют путь ацетил-КоА в качестве (1) механизма восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO₂, (2) конечного электроноакцепторного сохраняющего энергию процесса, (3) механизма фиксации (ассимиляции) CO₂ при синтезе клеточного углерода (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все встречающиеся в

30 природе ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, аутоотрофными и неметанотрофными. Обычно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой ацетоген. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из ацетогена, идентифицированного в таблице 1.

118 «Этанологен» представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен

35 продуцировать этанол. Обычно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой этанологен. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из этанологена, идентифицированного в таблице 1.

119 «Автотроф» представляет собой микроорганизм, способные к росту в отсутствие органического углерода. Вместо него автотрофы используют неорганические источники углерода,

40 такие как CO и/или CO₂. Обычно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет

собой автотрофа. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из автотрофа, идентифицированного в таблице 1.

120 «Карбоксидотроф» представляет собой микроорганизм, способный к утилизации СО в качестве единственного источника углерода. Обычно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой карбоксидотроф. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из карбоксидотрофа, идентифицированного в таблице 1.

121 «Метанотроф» представляет собой микроорганизм, способный к утилизации метана в качестве единственного источника углерода и энергии. Согласно некоторым вариантам реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из метанотрофа.

122 В более широком смысле микроорганизм согласно настоящему изобретению может происходить из любого рода или вида, идентифицированного в таблице 1.

123 Согласно предпочтительному варианту реализации указанный микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из кластера *Clostridia*, содержащего виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Указанные виды были впервые описаны и охарактеризованы в источниках: 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*).

124 Указанные три вида во многом аналогичны. В частности, все указанные виды являются С1-фиксирующими анаэробными ацетогенными этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода *Clostridium*. Указанные виды обладают аналогичными генотипами и фенотипами, способами сохранения энергии и ферментативным метаболизмом. Кроме того, указанные виды кластеризованы в кластридиальную группу гомологии рРНК I, с идентичной более чем на 99% 16S рРНК ДНК, имеют содержание G + C в ДНК, составляющее приблизительно 22–30 мол.%, являются грамположительными, имеют аналогичную морфологию и размер (клетки на стадии логарифмического роста имеют размер 0,5–0,7 × 3–5 мкм), являются мезофильными (оптимальный рост при 30–37 °С), отличаются аналогичными диапазонами значений pH, приблизительно 4–7,5 (с оптимальным значением pH, составляющим приблизительно 5,5–6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию с помощью Rnf-комплекса. Также у указанных видов было продемонстрировано восстановление карбоновых кислот до соответствующих спиртов (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Важно отметить, что все указанные виды также демонстрируют выраженный аутотрофный рост на СО-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации, и продуцируют незначительные количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты в определенных условиях.

125 Однако указанные три вида также имеют ряд отличий. Указанные виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* из ЖКТ кролика, *Clostridium ljungdahlii* из отходов курятников, и *Clostridium ragsdalei* из пресноводных отложений. Указанные виды различаются утилизацией различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов

(например, бетаина, бутанола). Кроме того, указанные виды различаются ауксотрофностью по определенным витаминам (например, тиамину, биотину). Указанные виды отличаются различия в последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислот генов и белков пути Вуда-Льюнгдала, хотя общая организация и число указанных генов и белков, как было обнаружено, одинакова у всех видов (Körpe, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011).

Соответственно, в целом, многие из характеристик *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* не являются специфическими для данного вида, а представляют собой общие характеристики указанного кластера С1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных представителей рода *Clostridium*. Однако поскольку указанные виды фактически являются отдельными видами, генетическая модификация или манипуляции, произведенные с одним из указанных видов, могут не оказывать идентичного эффекта на другой вид из указанных видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

Микроорганизм согласно настоящему изобретению может также происходить из изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. 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), O-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Однако согласно некоторым вариантам реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой микроорганизм, отличный от *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Например, указанный микроорганизм может быть выбран из группы, состоящей из *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharbutyricum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium diolis*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium phytofermentans*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Trichoderma reesei*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum* и *Methylobacterium extorquens*.

«Субстрат» относится к источнику углерода и/или энергии для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Обычно указанный субстрат является газообразным и содержит С1-источник углерода, например, СО, СО₂ и/или СН₄. Предпочтительно, указанный субстрат содержит С1-источник углерода в виде СО или СО + СО₂. Указанный субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, такие как Н₂, N₂, или электроны.

130 Субстрат обычно содержит по меньшей мере некоторое количество CO, например, приблизительно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% CO. Субстрат может содержать различное количество CO, например, приблизительно 20–80, 30–70 или 40–60 мол.% CO. Предпочтительно, субстрат содержит приблизительно 40–70 мол.% CO (например, газ сталелитейного производства или доменный газ), приблизительно 20–30 мол.% CO (например, отходящий газ кислородно-конвертерного процесса) или приблизительно 15–45 мол.% CO (например, сингаз). Согласно некоторым вариантам реализации указанный субстрат может содержать относительно небольшое количество CO, например, приблизительно 1–10 или 1–20 мол.% CO. Микроорганизм согласно настоящему изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть CO в субстрате в продукт. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субстрат не содержит или по существу не содержит CO.

131 Субстрат может содержать некоторое количество H₂. Например, субстрат может содержать приблизительно 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.% H₂. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субстрат может содержать относительно большое количество H₂, например, приблизительно 60, 70, 80 или 90 мол.% H₂. Согласно дополнительным вариантам реализации указанный субстрат не содержит или по существу не содержит H₂.

132 Субстрат может содержать некоторое количество CO₂. Например, субстрат может содержать приблизительно 1–80 или 1–30 мол.% CO₂. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субстрат может содержать менее чем приблизительно 20, 15, 10 или 5 мол.% CO₂. Согласно другому варианту реализации указанный субстрат не содержит или по существу не содержит CO₂.

133 Хотя субстрат, как правило, является газообразным, он может также быть представлен альтернативными формами. Например, указанный субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO-содержащим газом с применением генератора микропузырьковых дисперсий. Согласно дополнительному примеру субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

134 Субстрат и/или C1-источник углерода может представлять собой отработанный газ, получаемый в виде побочного продукта промышленного процесса или из некоторого другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей или при газификации биомассы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный промышленный процесс выбран из группы, состоящей из производства продуктов из черных металлов, такого как сталелитейное производство, производства продуктов из цветных металлов, процессов переработки нефти, газификации угля, получения электроэнергии, получения сажистых веществ, получения аммиака, получения метанола и производства кокса. Согласно указанным вариантам реализации указанный субстрат и/или C1-источник углерода может быть захвачен из промышленного процесса до того, как он будет выброшен в атмосферу, с применением любого удобного способа.

135 Указанный субстрат и/или C1-источник углерода может представлять собой сингаз, такой как сингаз, полученный путем газификации угля или остатков нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала, или риформинга природного газа. Согласно другому

варианту реализации указанный сингаз может быть получен при газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

136 Состав субстрата может оказывать значимое влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может снижать эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата могут быть желательны обработка, очистка или фильтрация субстрата для удаления каких-либо нежелательных загрязняющих примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или пылевые частицы, и/или увеличения концентрации желательных компонентов.

137 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть культивирован для продуцирования одного или более продуктов. Например, *Clostridium autoethanogenum* продуцирует или может быть сконструирован таким образом, чтобы продуцировать этанол (WO 2007/117157), ацетат (WO 2007/117157), бутанол (WO 2008/115080 и WO 2012/053905), бутират (WO 2008/115080), 2,3-бутандиол (WO 2009/151342), лактат (WO 2011/112103), бутен (WO 2012/024522), бутадиен (WO 2012/024522), метилэтилкетон (2-бутанон) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилен (WO 2012/026833), ацетон (WO 2012/115527), изопропанол (WO 2012/115527), липиды (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионат (3-HP) (WO 2013/180581), изопрен (WO 2013/180584), жирные кислоты (WO 2013/191567), 2-бутанол (WO 2013/185123), 1,2-пропандиол (WO 2014/0369152) и 1-пропанол (WO 2014/0369152). Помимо одного или более целевых продуктов микроорганизм согласно настоящему изобретению может также продуцировать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол. Согласно некоторым вариантам реализации собственно биомасса микроорганизмов может считаться продуктом.

138 «Нативный продукт» представляет собой продукт, продуцируемый генетически немодифицированным микроорганизмом. Например, этанол, ацетат и 2,3-бутандиол представляют собой нативные продукты *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. «Ненативный продукт» представляет собой продукт, продуцируемый генетически модифицированным микроорганизмом, однако не продуцируемый генетически немодифицированным микроорганизмом, из которого происходит указанный генетически модифицированный микроорганизм.

139 Термины «промежуточный продукт» и «предшественник», которые могут называться взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к молекулярному объекту, расположенному выше по ходу ферментативного пути относительно наблюдаемого или целевого продукта.

140 «Селективность» относится к отношению продуцирования целевого продукта к продуцированию всех продуктов ферментации микроорганизма. Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть сконструирован таким образом, чтобы продуцировать продукты с определенной селективностью или с минимальной селективностью. Согласно одному варианту реализации целевой продукт составляет по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации указанный целевой продукт составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых

микроорганизмом согласно настоящему изобретению, таким образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению отличается селективностью в отношении целевого продукта, составляющей по меньшей мере 10%. Согласно другому варианту реализации указанный целевой продукт составляет по меньшей мере 30% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению, таким образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению отличается селективностью в отношении целевого продукта, составляющей по меньшей мере 30%.

141 «Увеличение эффективности», «увеличенная эффективность» и т.п. включает, не ограничиваясь перечисленными, увеличение скорости роста, скорости или объема продуцирования продукта, отношения объема продукта к объему потребленного субстрата или селективности продукта. Эффективность может быть измерена относительно производительности исходного микроорганизма, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению.

142 Обычно культивирование осуществляют в биореакторе. Термин «биореактор» включает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или более сосудов, колонн или трубок, например, проточный реактор с мешалкой (CSTR), реактор с иммобилизованными клетками (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажную колонку, газлифтный ферментер, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, подходящее для газожидкостного контакта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор может содержать первый реактор для роста и второй реактор для культивирования / ферментации. Субстрат может быть добавлен в один или в оба указанных реактора. В настоящем документе термины «культура», «культивирование» и «ферментация» используются взаимозаменяемо. Указанные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

143 Культуру обычно поддерживают на водной культуральной среде, которая содержит питательные вещества, витамины и/или минеральные вещества, достаточные для обеспечения роста указанного микроорганизма. Предпочтительно, указанная водная культуральная среда представляет собой ростовую среду для анаэробных микроорганизмов, такую как минимальная ростовая среда для анаэробных микроорганизмов. Подходящие среды хорошо известны в данной области техники.

144 Культивирование/ферментацию предпочтительно проводят в подходящих условиях для продуцирования целевого продукта. Обычно культивирование/ферментацию осуществляют в анаэробных условиях. Учитываемые реакционные условия включают давление (или парциальное давление), температура, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, редокс-потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании проточного реактора с мешалкой), уровень инокулята, максимальные концентрации газового субстрата для того, чтобы газ в жидкой фазе не становился ограничивающим фактором, и максимальные концентрации продукта, чтобы избежать ингибирования продуктом. В частности, можно контролировать скорость введения субстрата для того, чтобы концентрация газа в жидкой фазе не становилась ограничивающим

фактором, поскольку культура может потреблять продукты в условиях ограниченной доступности газа.

145 Эксплуатация биореактора при повышенном давлении позволяет увеличить скорость массопереноса газа из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, обычно предпочтительно проведение культивирования/ферментации при давлении, превышающем атмосферное давление. Также, поскольку определенная скорость преобразования газа является, отчасти, функцией от времени удерживания субстрата, а время удерживания определяет требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно снижать требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальную стоимость оборудования для культивирования/ферментации. Это, в свою очередь, означает, что время удерживания, определяемое как результат деления объема жидкости в биореакторе на скорость входящего потока газа, может быть снижено при поддержании повышенного, а не атмосферного давления в биореакторах. Оптимальные реакционные условия отчасти зависят от конкретного используемого микроорганизма. Однако, в целом, предпочтительно осуществление ферментации при давлении, превышающем атмосферное давление. Также, поскольку определенная скорость преобразования газа является, отчасти, функцией от времени удерживания субстрата, а достижение требуемого времени удерживания, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно снижать требуемый объем биореактора, и, следовательно, капитальную стоимость оборудования для ферментации.

146 Целевые продукты могут быть отделены или очищены из ферментативного бульона с применением любого способа или комбинации способов, известных в данной области техники, включая, например, фракционную дистилляцию, испарение, первапорацию, отдувку газом, фазовое разделение и экстрактивную ферментацию, в том числе например, жидкостно-жидкостную экстракцию. Согласно некоторым вариантам реализации целевые продукты выделяют из ферментативного бульона путем непрерывного удаления части бульона из биореактора, отделения клеток микроорганизма из бульона (которое удобно осуществлять путем фильтрации) и извлечения из бульона одного или более целевых продуктов. Спирты и/или ацетон можно выделить, например, путем дистилляции. Кислоты могут быть выделены, например, путем адсорбции на активированном угле. Отделенные клетки микроорганизма предпочтительно возвращают в биореактор. Бесклеточный пермеат, остающийся после извлечения целевых продуктов, также предпочтительно возвращают в биореактор. Дополнительные питательные вещества (такие как витамины В) могут быть добавлены в бесклеточный пермеат для восполнения среды перед ее возвращением в биореактор.

ПРИМЕРЫ

147 Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, однако, разумеется, не должны быть истолкованы как каким-либо образом ограничивающие его объем.

Пример 1

148 В указанном примере продемонстрирована способность Ptb-Buk к преобразованию ацетоацетил-КоА в ацетоацетат у *E. coli in vivo*, и применение Ptb-Buk при получении ацетона, изопропанола, 3-гидроксипропаноата и изобутилена.

- 5 **149** Разрабатывали и конструировали пути на основе системы Ptb-Buk для получения ацетоацетата из ацетоацетил-КоА. Это осуществляли модульным способом с применением векторной системы pDUET (Novagen). Один модуль содержал гены *ptb-buk* из *C. beijerinckii* NCIMB8052 (GenBank NC_009617, позиция 232027..234147; Cbei_0203-204; NCBI-GeneID 5291437-38) на плазмиде pACYC. Другой модуль содержал ген тиолазы *thlA* *C. acetobutylicum* 10 (Genbank NC_001988, позиция 82040..83218; CA_P0078; NCBI-GeneID 1116083) и ген ацетоацетатдекарбоксилазы *adc* *C. beijerinckii* NCIMB8052 (Genbank NC_009617, позиция 4401916..4402656; Cbei_3835; NCBI-GeneID 5294996) на плазмиде pCOLA. Гены *Ptb* и *buk* амплифицировали из геномной ДНК *C. beijerinckii* NCIMB8052, а гены *thlA* и *adc* из 15 существующей плазмиды для ацетона pMTL85147-*thlA*-*ctfAB*-*adc* (WO 2012/115527) и клонировали под контролем промотора T7, присутствующего в векторах pDUET, посредством независимого от рестрикции клонирования с применением метода кольцевого полимеразного удлинения (CPEC) (Quan, *PloS One*, 4:e6441, 2009).

150 Олигонуклеотиды, используемые для амплификации генов *ptb* и *buk*:

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
95	pACYCDuet-ptb-buk - pACYC-ptb-R1	AAGTTTTTACTCATATGTATATC TCCTTCTTATACTTAAC	обратный
96	pACYCDuet-ptb-buk - ptb-pACYC-F1	AGAAGGAGATATACATATGAGT AAAAACTTTGATGAGTTA	прямой
97	pACYCDuet-ptb-buk - buk-pACYC-R1	ACCAGACTCGAGGGTACCTAGT AAACCTTAGCTTGTTT	обратный
98	pACYCDuet-ptb-buk - pACYC-buk-F1	TAAGGTTTACTAGGTACCCTCG AGTCTGGTAAAGAAAC	прямой

151 Олигонуклеотиды, используемые для амплификации генов *thlA* и *adc*:

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
99	pCOLADuet-thlA- <i>adc</i> - <i>thlA</i> - <i>adc</i> -R1	ACATATGTATATCTCCTTCTTACT AGCACTTTTCTAGCAATATTG	обратный
100	pCOLADuet-thlA- <i>adc</i> - <i>adc</i> - <i>ThlA</i> -F1	AGTAAGAAGGAGATATACATATG TTAGAAAGTGAAGTATCTAAAC	прямой
101	pCOLADuet-thlA- <i>adc</i> - <i>adc</i> -pCOLA-R1	CAGACTCGAGGGTACCTTATTTTA CTGAAAGATAATCATGTAC	обратный
102	pCOLADuet-thlA- <i>adc</i> - pCOLA- <i>adc</i> -F1	TCTTTCAGTAAAATAAGGTACCCT CGAGTCTGGTAAAGAAAC	прямой
103	pCOLADuet-thlA- <i>adc</i> - <i>thlA</i> -pCOLA-F1	GAAGGAGATATACATATGAAAGA AGTTGTAATAGCTAGTG	прямой
104	pCOLADuet-thlA- <i>adc</i> - pCOLA- <i>thlA</i> -R1	ACAACCTTCTTTCATATGTATATCT CCTTCTTATACTTAAC	обратный

152 После конструирования плазмид pACYC-ptb-buk (SEQ ID NO: 105) и pCOLA-thlA-adc (SEQ ID NO: 106), ими индивидуально и совместно трансформировали *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) и проводили эксперименты с ростом в 4 повторностях в 1,5 мл культур в 12-луночных планшетах при 28 °C с орбитальным встряхиванием при 160 об/мин с применением минимальной среды M9 (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol 3, Cold Spring Harbour Press, 1989) с глюкозой (фиг. 4). Указанные культуры инокулировали с плотностью, соответствующей OD600 нм = 0,1 и индуцировали разными концентрациями ИПТГ (0, 50, 100 мкМ) через 2 ч роста (фиг. 5). Указанные планшеты герметично закрывали с применением липкой пленки для планшетов и над каждой лункой иглой с зеленым концом делали прокол для обеспечения микроаэробных условий. Рост продолжался в течение дополнительных 64 ч индукции. Указанный эксперимент проводили в трех повторностях.

153 Концентрации ацетона, а также концентрации других метаболитов, таких как изобутилен, измеряли с применением газохроматографического (ГХ) анализа, используя систему для парофазной ГХ Agilent 6890N, оснащенную полиэтиленгликолевым (ПЭГ) волокном 60 мкм Supelco для твердофазной микроэкстракции, колонкой Restek Rtx-1 (30 м × 0,32 мкм × 5 мкм) и пламенно-ионизационным детектором (FID). Образцы (4 мл) переносили в 20 мл флакон для парофазного анализа, над которым инкубировали (экспонировали) волокно в течение 10 мин при 50 °C. Образец десорбировали в инжекторе при 250 °C в течение 9 минут. Хроматографию проводили с использованием программы термостата на 40 °C (5-минутное удерживание) и от 10 °C/мин до 200 °C, с последующим 5-минутным удерживанием при 220 °C. Скорость потока через колонку составляла 1 мл/мин, водород использовали в качестве газа-носителя. Температуру FID поддерживали на уровне 250 °C; 40 мл/мин водорода, 450 мл/мин воздуха и 15 мл/мин азота использовали в качестве поддувочного газа.

154 Было совершенно очевидно, что штамм, несущий как плазмиду pACYC-ptb-buk, так и плазмиду pCOLA-thlA-adc (экспрессирующий тиолазу, Ptb-Buk и ацетоацетатдекарбоксилазу), продуцировал ацетон. Средний измеренный итоговый показатель продуцирования ацетона составил 0,19 г/л, при этом продуцирование ацетона отсутствовало в контроле без плазмид, в контрольной среде и в несущих одну плазмиду контролях с pACYC-ptb-buk (экспрессирующих Ptb-Buk) или pCOLA-thlA-adc (экспрессирующих тиолазу и ацетоацетатдекарбоксилазу) (ниже достоверного предела детекции). Неиндуцированная культура штамма, несущего как плазмиду pACYC-ptb-buk, так и плазмиду pCOLA-thlA-adc (экспрессирующего тиолазу, Ptb-Buk и ацетоацетатдекарбоксилазу), не продуцировала ацетон в поддающихся оценке количествах.

Средние показатели продуцирования ацетона у *E. coli* BL21 (DE3):

Штамм	Ацетон (г/л)
Thl+Ptb-Buk+Adc [<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pACYC-ptb-buk + pCOLA-thlA-adc]	0,19±0,04
Thl+Adc отдельно [<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pCOLA-thlA-adc]	0,04±0,01
Ptb-Buk отдельно [<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pACYC-ptb-buk]	0,03±0,01
Без контрольной плазмиды [<i>E. coli</i> BL21 (DE3)]	0,04±0,01
Контрольная среда	0,03±0,01

155 Настоящий эксперимент ясно демонстрирует, что Ptb-Buk способна осуществлять преобразование ацетоацетил-КоА в ацетоацетат и может быть использован вместо КоА-трансферазы или тиоэстеразы для продуцирования ацетона, что показано на примере маршрута, включающего этапы 1, 2, и 3 согласно фиг. 1.

5 **156** Хорошо известно, что изопропанол может быть продуцирован из ацетона путем добавления первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (Körke, *Appl Environ Microbiol*, 80: 3394-3403, 2014) (этап 4 на фиг. 1), и что изобутилен может быть продуцирован из ацетона путем добавления гидроксизовалератсинтазы (этап 5 на фиг. 1) и декарбоксилазы (этап 6 на фиг. 1) (van Leeuwen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1377-1387, 2012). Можно сконструировать путь, включающий продемонстрированный выше маршрут продуцирования ацетона с помощью Ptb-Buk, используя гены *thlA*, *ptb-buk* и *adc*, а также ген первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (например, под номером доступа Genbank NC_022592, поз. 609711..610766; CAETHG_0553; NCBI-GeneID: 17333984), что обеспечит продуцирование изопропанола с помощью системы Ptb-Buk у *E. coli*, включающее этапы 1, 2, 3 и 4 согласно фиг. 1. Аналогичным образом, может быть сконструирован путь, который включает представленный выше маршрут продуцирования ацетона с помощью Ptb-Buk-преобразования ацетоацетил-КоА в ацетоацетат, с использованием генов *thlA*, *ptb-buk* и *adc* и генов гидроксизовалератсинтазы и декарбоксилазы, обеспечивающий продуцирование изобутилена с помощью системы Ptb-Buk у *E. coli*, содержащей этапы 1, 2, 3, 5 и 6 согласно фиг. 1. Ацетоацетат может также быть преобразован в 3-гидроксibuтират с помощью 3-гидроксibuтиратдегидрогеназы Bdh. Указанное преобразование может быть скомбинировано с Ptb-Buk-преобразованием ацетоацетил-КоА в ацетоацетат для продуцирования 3-гидроксibuтирата у штамма, экспрессирующего гены *thlA*, *ptb-buk* и *bdh*, с получением пути, содержащего этапы 1, 2 и 15 согласно фиг. 1.

Пример 2

25 **157** В указанном примере продемонстрирована способность Ptb-Buk к преобразованию ацетоацетил-КоА в ацетоацетат у *C. autoethanogenum in vivo*, и применение Ptb-Buk при получении ацетона, изопропанола, 3-гидроксibuтирата и изобутилена из газообразного субстрата.

158 Чтобы продемонстрировать, что система Ptb-Buk также позволяет синтезировать ацетон, изопропанол или изобутилен из газообразных субстратов, конструировали плазмиду, которая содержит те же гены, что и описанные в примере 1, *thl* + *ptb-buk* + *adc*, под контролем кlostридиального промотора на челночном векторе, что обеспечивает экспрессию в ацетогенах, таких как *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahliae* или *C. ragsdalei*.

159 Плазмида pMTL представляет собой челночную плазмидную систему для введения кольцевой DNA в Clostridia посредством конъюгации *E. coli* (Heap, *J Microbiol Methods*, 78: 79–85, 2009). Представляющие интерес гены (т.е. *hbd*, *phaB*, *thlA*, *ptb*, *buk* и *aor1*) клонировали в область *lacZ* указанных плазмид с применением общих техник молекулярной биологии, в том числе рестрикционного расщепления ДНК с последующим лигированием, и технологии сборки ДНК «Golden Gate», согласно которой в плазмиду клонируют одновременно более одной части

фрагментов ДНК. Сконструированные плазмиды верифицируют посредством ДНК-секвенирования.

160 Продуцирование ацетона и изопропанола ранее было продемонстрировано у *C. autoethanogenum* с применением плазмиды pMTL85147-thlA-ctfAB-adc, кодирующей *thl*+ *ctfAB* + *adc* (WO 2012/115527) под контролем кластридального промотора из генного кластера Вуда-Льонгдала. В указанной плазмиде гены *ctfAB*, кодирующие КоА-трансферазу, прямо заменяли генами *ptb-buk*, кодирующими систему Ptb-Buk. Это осуществляли согласно описанию в примере 1 с применением способа СРЕС. Итоговая плазида: pMTL85147-thlA-ptb-buk-adc.

161 Олигонуклеотиды, использованные для амплификации *ptb-buk* и клонирования в pMTL8317-thl-ptb-buk-adc, описаны ниже.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
107	thlA-ptb-R1	ATTTCTCCTTTCTAGCACTTT TCTAGCAATATTG	Обратный
108	adc-buk-F1	TAAGGTTTACTAAGGAGGTGT TTTATGTTAGAAAG	Прямой
109	thlA-ptb-F1	GCTAGAAAAGTGCTAGAAAGG GAGGAAATGAACATG	Прямой
110	Buk-adc-R1	AAAACAACCTCCTTAGTAAACC TTAGCTTGTCTTC	Обратный

162 *C. autoethanogenum* DSM10061 и DSM23693 (дериват DSM10061) получали из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Инхоффенштрассе 7 В, 38124 Брауншвейг, Германия).

163 Штаммы культивировали при 37 °С на среде PETC при pH 5,6 с применением стандартных анаэробных техник (Hungate, *Meth Microbiol*, 3В: 117-132, 1969; Wolfe, *Adv Microb Physiol*, 6: 107-146, 1971). Содержащий 30 фунтов/кв. дюйм СО газ сталелитейных производств (собранный на объекте New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия) или синтетическую смесь газов с таким же составом, 44% СО, 32% N₂, 22% СО₂, 2% Н₂, использовали в качестве субстрата для аутоτροφного роста. Для получения твердой среды добавляли 1,2 % бакто-агара (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси 07417, США).

164 Синтезировали конструкцию и затем трансформировали *C. autoethanogenum* посредством конъюгации. Для этого экспрессионный вектор сначала вводили в конъюгативный донорный штамм *E. coli* HB101+R702 (CA434) (Williams, *J Gen Microbiol*, 1136: 819-826, 1990) (донор) с применением стандартной трансформации методом теплового шока. Донорные клетки восстанавливали в среде SOC (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol 3, Cold Spring Harbour Press, 1989) при 37 °С в течение 1 часа до высевания на чашки со средой LB (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol 3, Cold Spring Harbour Press, 1989), содержащей 100 мкг/мл спектиномицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Чашки с LB инкубировали при 37 °С в течение ночи. На следующий день аликвоты объемом 5 мл, содержащие LB с 100 мкг/мл спектиномицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола, инокулировали несколькими донорными колониями и инкубировали при 37 °С, встряхивали в течение приблизительно 4 часов, или до

наблюдаемой видимой плотности культуры, но до наступления стационарной фазы. 1,5 мл донорной культуры собирали в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 2 минут; супернатант утилизировали. Донорные клетки аккуратно ресуспендировали в 500 мкл стерильного буфера ФСБ (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol 3, Cold Spring Harbour Press, 1989) и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 2 минут; супернатант ФСБ утилизировали. Осадок вводили в анаэробную камеру и аккуратно ресуспендировали в 200 мкл культуры *C. autoethanogenum* (реципиента) во время поздней экспоненциальной фазы. Указанную смесь для конъюгации (смесь донорных и реципиентных клеток) наносили на чашки с PETC-MES + фруктозный агар и оставляли для высыхания. Когда пятна при визуальном осмотре переставали быть влажными, чашки помещали в сосуд для использования под давлением, нагнетали сингаз до 25–30 фунтов/кв. дюйм и инкубировали при 37 °C в течение ~24 ч. Через 24 ч инкубирования смесь для конъюгации извлекали из чашек, аккуратно соскребая ее с применением инокуляционной петли на 10 мкл. Извлеченную смесь суспендировали в 200–300 мкл среды PETC. Аликвоты указанной смеси для конъюгации объемом 100 мкл высевали на чашки с агаровой средой PETC с добавлением 15 мкг/мл тиамфеникола для выбора трансформантов, несущих плазмиду, которая придает устойчивость к тиамфениколу за счет экспрессии хлорамфениколацетилтрансферазы.

165 Три отдельных колонии *C. autoethanogenum*, несущие плазмиду pMTL85147-thlA-ptb-buk-*adc*, инокулировали в 2 мл среды PETC-MES с 15 мкг/мл тиамфеникола, и культивировали в автотрофных условиях при 37 °C с орбитальным встряхиванием на 100 об/мин в течение трех дней. Культуры разводили до $OD_{600\text{ нм}} = 0,05$ с 10 мл среды PETC-MES с 15 мкг/мл тиамфеникола в бутылках для сыворотки и культивировали в автотрофных условиях при 37 °C с орбитальным встряхиванием на 100 об/мин в течение пяти дней, ежедневно отбирая образцы для измерения биомассы и метаболитов. Параллельно изучали контрольный штамм, в котором экспрессионная плазида кодировали только *thl* и *adc* под контролем промотора кластера Вуда-Льюнгаля, без генов *ctfAB* или *ptb-buk* для катализа образования ацетоацетата из ацетоацетил-КоА (pMTL85147-thlA-*adc*). Образцы культур отбирали в течение пяти дней для мониторинга накопления метаболитов и биомассы.

166 Концентрации изопропанола, а также концентрации этанола, уксусной кислоты, 2,3-бутандиола и молочной кислоты измеряли с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на Agilent LC с рефрактометрической (RI) детекцией при 35°C. Образцы получали путем разведения 400 мкл с 100 мкл раствора 5-сульфосалициловой кислоты (1% масса/объем в 1M серной кислоте), с последующим 3-минутным центрифугированием при 14 000 об/мин; супернатант переносили в стеклянный флакон для анализа. Разделение проводили, вводя пробу объемом 10 мкл на колонку Alltech IOA-2000 (150 мм × 6,5 мм × 8 мкм) со скоростью 0,7 мл/мин при 65°C в изократических условиях, с применением 5 mM серной кислоты в качестве подвижной фазы.

167 В некоторых случаях использовали более длительный метод ВЭЖХ для улучшения разделения пиков. Согласно указанному способу концентрации изопропанола, этанола, ацетата, 2,3-бутандиола, а также 3-гидроксibuтирата (который не подлежит разделению с применением

более краткого метода) измеряли с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на Agilent 1260 Infinity LC с рефрактометрической (RI) детекцией при 35°C. Образцы получали путем разведения 400 мкл с 100 мкл раствора 5-сульфосалициловой кислоты (1% масса/объем в 1М серной кислоте), с последующим 3-минутным центрифугированием при 14 000 об/мин; супернатант переносили в стеклянный флакон для анализа. Разделение проводили, вводя пробу объемом 10 мкл на колонку Aminex HPLX-87H (300 мм × 7,8 мм × 9 мкм) со скоростью 0,6 мл/мин при 35°C в изократических условиях, с применением 5 мМ серной кислоты в качестве подвижной фазы.

168 *C. autoethanogenum*, несущий pMTL85147-thlA-ptb-buk-adc, продуцировал изопропанол в количестве до 0,804 г ИПА/г биомассы, тогда как контрольный штамм *C. autoethanogenum* с pMTL85147-thlA-adc, не содержащей Ptb-Buk, не продуцировал ИПА (фиг. 12).

169 Настоящий эксперимент ясно демонстрирует, что Ptb-Buk способна осуществлять преобразование ацетоацетил-КоА в ацетоацетат в пути изопропанола при использовании газообразного субстрата. Ptb-Buk может быть использована вместо КоА-трансферазы или тиюэстеразы ферментирующим газ ацетогеном, таким как *C. autoethanogenum*, что показано на примере использования маршрута, включающего этапы 1, 2, 3 и 4 согласно фиг. 1.

170 *C. autoethanogenum* содержит нативную первичную/вторичную алкогольдегидрогеназу которая преобразует ацетон в изопропанол (Körpe, *Appl Environ Microbiol*, 80: 3394-3403, 2014). Было продемонстрировано, что нокаут указанного гена элиминирует преобразование ацетона в изопропанол у *C. autoethanogenum* (WO 2015/085015). На фоне указанного нокаута становится возможным получение ацетона (а не изопропанола) с помощью системы Ptb-Buk из газообразного сырья с применением тех же генов, включающее этапы 1, 2, и 3 согласно фиг. 1. Добавление генов гидроксиизовалератсинтазы и декарбоксилазы (van Leeuwen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1377-1387, 2012) в указанный штамм обеспечивает продуцирование изобутилена из газа у *C. autoethanogenum* или аналогичных бактерий, включающее этапы 1, 2, 3, 5 и 6 согласно фиг. 1.

171 Ацетоацетат может также быть преобразован в 3-гидроксибутират с помощью 3-гидроксибутиратдегидрогеназы Bdh. 3-гидроксибутиратдегидрогеназа была идентифицирована в геноме *C. autoethanogenum* (AGY75962) и других ацетогенов, таких как *C. ljungdahlii* (ADK16920.1). Указанная активность может быть скомбинирована с Ptb-Buk- (или КоА-трансферазным) преобразованием ацетоацетил-КоА в ацетоацетат для продуцирования 3-гидроксибутирата штаммом, экспрессирующим гены *thlA*, *ptb-buk* (или *ctfAB*) и *bdh*, что дает путь, содержащий этапы 1, 2 и 15 согласно фиг. 1. Для *C. autoethanogenum* были продемонстрированы низкие уровни образования 3-гидроксибутирата (до 2 г/л) через указанный маршрут. Указанные уровни могут быть увеличены путем избыточной экспрессии гена Bdh, который естественным образом экспрессируется на незначительных уровнях.

172 В одном эксперименте *C. autoethanogenum* трансформировали плазмидой pMTL82256-thlA-ctfAB согласно описанию в примере 2. Продуцирование отслеживали в течение 10 дней на шести биологических репликатах в аутотрофных условиях согласно описанию в примере 2. Средний показатель для 3-ГБ через 10 дней составил $1,86 \pm 0,14$ г/л. На 10 день средний титр

продуцируемого 1,3-бутандиола (из 3-ГБ) составил $0,38 \pm 0,05$ г/л (фиг. 37). Не происходило образования ацетона или изопропанола. Это показывает, что 3-ГБ может быть эффективно продуцирован нативными ферментами через ацетоацетат.

173 Согласно некоторым вариантам реализации может быть желательным нокаут или нокдаун экспрессии 3-гидроксibuтиратдегидрогеназ, таких как Bdh, для предотвращения утечки углерода в 3-ГБ и, соответственно, стимуляции продуцирования таких продуктов, как ацетон, изопропанол и изобутилен.

Пример 3

174 В указанном примере продемонстрирована способность Ptb-Buk к преобразованию (R)-3-гидроксibuтирил-КоА в (R)-3-гидроксibuтират в *E. coli in vivo* для продуцирования (R)-гидроксibuтирата, ацетона, изопропанола или изобутилена.

175 Разрабатывали и сконструировали пути, основанные на системе Ptb-Buk, для получения (R)-3-гидроксibuтирата из (R)-3-гидроксibuтирил-КоА. Кроме того, использовали 3-гидроксibuтиратдегидрогеназу (Bdh) для преобразования (R)-3-ГБ в ацетоацетат. Описано содержание у *Ralstonia pickettii* двух 3-гидроксibuтиратдегидрогеназ, Bdh1 и Bdh2, способных к преобразованию 3-гидроксibuтират в ацетоацетат *in vitro* (Takanashi, *J Biosci Bioeng*, 101: 501-507, 2006). Один разработанный путь включал применение указанного фермента для продуцирования ацетона (этапы 1, 13, 14, 15, 3 согласно фиг. 1), с повторным использованием восстанавливающих эквивалентов, полученных при продуцировании (R)-3-гидроксibuтирил-КоА, и АТФ, генерированной Ptb-Buk (фиг. 6).

176 Указанные пути конструировали модульным способом с применением векторной системы pDUET (Novagen). Указанные два модуля, описанные в примере выше (pACYC-ptb-buk для экспрессии Ptb-Buk; и pCOLA-thlA-adc для экспрессии тиолазы и ацетоацетатдекарбоксилазы) использовали совместно с двумя дополнительными модулями, каждый из которых содержал (R)-специфическую 3-гидроксibuтиратдегидрогеназу *phaB Cupravidus necator* (WP_010810131.1) (pCDF-phaB), а один содержал также ген 3-гидроксibuтиратдегидрогеназы *bdh1 Ralstonia pickettii* (BAE72684.1) (pCDF-phaB-bdh1) в векторе pCDF. Оба гена, *phaB* и *bdh1*, были синтезированы с помощью GeneArt и клонированы под контролем промотора T7, присутствующего при независимом от рестрикции клонировании с применением метода кольцевого полимеразного удлинения (CPEC) (Quan, PloS One, 4:e6441, 2009).

177 Олигонуклеотиды, используемые для амплификации гена *bdh1*:

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
111	pDuet-insert2-R1	CATATGTATATCTCCTTCTTATAC TTAAC	прямой
112	insert2-pDuet-F1	GTTAAGTATAAGAAGGAGATATA CATATG	прямой
113	pDuet-insert2-F1	CCTCGAGTCTGGTAAAGAAAC	прямой
114	insert2-pDuet-R1	GTTTCTTTACCAGACTCGAGG	прямой

178 Олигонуклеотиды, используемые для амплификации гена *phaB*:

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
115	pCDF- <i>phaB</i> - pACYC- <i>phaB</i> -R1	CTATTCTTTGTGTCATGGTATATCTCCTTATTAAAG	прямой
116	pCDF- <i>phaB</i> - <i>phaB</i> -pACYC-F1	ATAAGGAGATATACCATGACACA AAGAATAGCATAC	прямой
117	pCDF- <i>phaB</i> - pACYC- <i>phaB</i> -F1	TGGTTTACACATGGGATAAGATCCGAATTCGAGCTC	прямой
118	pCDF- <i>phaB</i> - <i>phaB</i> -pACYC-R1	AGCTCGAATTCGGATCTTATCCCA TGTGTAAACCAC	прямой

179 После конструирования плазмид pACYC-ptb-buk (SEQ ID NO: 105), pCOLA-thlA-*adc* (SEQ ID NO: 106), pCDF-*phaB* (SEQ ID NO: 119) и pCDF-*phaB*-*bdh1* (SEQ ID NO: 120) ими трансформировали индивидуально и в комбинациях *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), и проводили эксперименты с ростом в 4 повторностях в культуре объемом 1,5 мл в 12-луночных планшетах при 28 °C с орбитальным встряхиванием при 160 об/мин с применением минимальной среды M9 с глюкозой. Культуры инокулировали с плотностью, соответствующей OD_{600nm} = 0,1, и через 2 ч роста индуцировали разными концентрациями ИПТГ (0, 50, 100 мкМ). Указанные планшеты герметично закрывали с применением липкой пленки для планшетов BioRad и над каждой лункой иглой с зеленым концом делали прокол для обеспечения микроаэробных условий. Рост продолжался в течение дополнительных 64 ч индукции. Указанный эксперимент проводили в 3 повторностях. Метаболиты измеряли согласно описанию в предыдущих примерах.

180 Культуры, содержащие комбинацию плазмид pACYC-ptb-buk, pCOLA-thlA-*adc* и pCDF-*phaB*, продуцировали 1,65–2,4 г/л (R)-3-гидроксibuтирата (в зависимости от уровня индуктора) с очень незначительным количеством побочных продуктов (фиг. 13A-F), демонстрируя эффективность системы Ptb-Buk для преобразования (R)-3-гидроксibuтирил-КоА в (R)-3-гидроксibuтират и поддержания роста (фиг. 13A-F). В культуральной среде в культурах, которые также экспрессировали *bdh1* (содержащих комбинацию плазмид pACYC-ptb-buk, pCOLA-thlA-*adc* и pCDF-*phaB*-*bdh1*) были обнаружены только незначительные количества (R)-3-гидроксibuтирата, тогда как ацетон был обнаружен в количестве от 0,89 до 1,16 г/л (в зависимости от уровня индуктора), что указывает на эффективность гена *bdh1* для преобразования (R)-3-гидроксibuтирата в ацетоацетат, и далее в ацетон. Ни 3-гидроксibuтират, ни ацетон не были обнаружены при любых комбинациях плазмид без Ptb-Buk (фиг. 13A-F). В указанных культурах уровни ацетата уровни были значимо выше.

181 Настоящий эксперимент ясно демонстрирует, что Ptb-Buk способна осуществлять преобразование (R)-3-гидроксibuтират-КоА в 3-гидроксibuтират, а также что Bdh1 способен к преобразованию *in vivo* 3-гидроксibuтирата далее в ацетоацетат путем повторного использования восстанавливающих эквивалентов, полученных при продуцировании (R)-3-гидроксibuтирил-КоА. Настоящий эксперимент также выявляет, что Ptb-Buk способна поддерживать рост и, соответственно, продуцирование ацетата перестает быть необходимостью. Продуцирование (R)-3-гидроксibuтирата было показано на примере штамма, содержащего этапы 1, 13 и 14 согласно

фиг.1. Продуцирование ацетона было показано на примере маршрута, который содержит этапы 1, 13, 14, 15 и 3 согласно фиг. 1.

182 Хорошо известно, что изопропанол может быть продуцирован из ацетона путем добавления первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (этап 4 на фиг. 1) (Körke, *Appl Environ Microbiol*, 80: 3394-3403, 2014), и что изобутилен может быть продуцирован из ацетона путем добавления гидроксиизовалератсинтазы (этап 5 на фиг. 1) и декарбоксилазы (этап 6 на фиг. 1) (van Leeuwen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1377-1387, 2012). Можно сконструировать путь, который включает продемонстрированный выше маршрут продуцирования ацетона с помощью Ptb-Buk, используя гены *thlA*, *ptb-buk* и *adc*, а также ген первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (например, Genbank NC_022592, позиция 609711..610766; CAETHG_0553; NCBI-GeneID: 17333984), что обеспечит продуцирование изопропанола с помощью системы Ptb-Buk у *E. coli* (этапы 1, 13, 14, 15, 3 и 4 согласно фиг. 1). Аналогичным образом, можно сконструировать путь, который включает продемонстрированный выше маршрут продуцирования ацетона с помощью Ptb-Buk, используя гены *thlA*, *ptb-buk* и *adc*, а также гены гидроксиизовалератсинтазы и декарбоксилазы, что обеспечит продуцирование изобутилена с помощью системы Ptb-Buk у *E. coli* (этапы 1, 13, 14, 15, 3, 5 и 6 согласно фиг. 1).

Пример 4

183 В указанном примере продемонстрировано продуцирование (R)-3-гидроксибутирата и 1,3-бутандиола у *C. autoethanogenum*. Также продемонстрировано продуцирование 1,3-бутандиола в отсутствие 2,3-бутандиола.

184 Конструировали штамм *C. autoethanogenum*, в котором нативный путь продуцирования 2,3-бутандиола инактивировали и заменяли на гены, обеспечивающие образование (R)-3-гидроксибутирил-КоА. Это было достигнуто путем замены гена ацетоллактатдекарбоксилазы (*budA*) в геноме *C. autoethanogenum* на гены тиолазы (*thlA* *C. acetobutylicum*; GenBank NC_001988, позиция 82040..83218; CA_P0078; NCBI-GeneID 1116083) и (R)-специфической 3-гидроксибутиратдегидрогеназы (*phaB* *Cupriavidus necator*; GenBank WP_010810131.1), с получением в результате штамма *C. autoethanogenum* *budA::thlAphaB*.

185 Для замены гена *budA* на гены *thlA* и *phaB* плазмиду pMTL8225-*budA::thlA-phaB* (фиг. 14) с геном токсина *E. coli mazF* под контролем тетрациклинового индуцируемого промотора *tet3n0* (для контрселекции), плечо гомологии размером ~1Кб в 3'-5' направлении от гена *budA*, *thlA*, *phaB*, кассету *ermB*, фланкированную сайтами *loxP*, и плечо гомологии размером ~1Кб в 5'-3' направлении от гена *budA* собирали на плазмиде pMTL-tet3no.

186 Плечи гомологии размером ~1Кб в 3'-5' и 5'-3' направлении от *budA* амплифицировали с помощью ПЦР из *C. autoethanogenum* с праймерами SN01/ SN02 и SN07/ SN08. Гены *thlA* и *phaB* гены амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК *Cupriavidus necator* с применением праймеров SN03/ SN04mod. Кассету *ermB*, фланкированную сайтами *loxP*, амплифицировали с помощью ПЦР с применением праймеров SN05mod/ SN06. Промотор *tet3no*, фланкированный *FseI* и *PmeI*, синтезировали, обрабатывали рестрикционными ферментами *FseI* и *PmeI*, и очищали. ПЦР-продукты и расщепленный вектор собирали с применением набора для клонирования

GeneArt Seamless от Life Technologies; плазмиду pMTL8225-budA::thlA-phaB (SEQ ID NO: 121) без мутаций во встроенных фрагментах применяли для трансформации *C. autoethanogenum* путем конъюгации согласно описанию в предыдущих примерах.

187 После конъюгации и выбора на триметоприме и кларитромицине, 9 колоний методом штриха в двух повторностях высевали на чашки с агаром PETC-MES с кларитромицином и ангидротетрациклином для индукции экспрессии генов *mazF*. В колониях в присутствии кларитромицина и ангидротетрациклина гены *budA* должны быть заменены на гены *thlA* и *phaB* и кассету *ermB*. Это верифицировали посредством ПЦР с применением праймеров Og31f/ Og32r, фланкирующих плечи гомологии, и полимеразы КАРА (фиг. 15).

188 Полосу, соответствующую ~3,3 Кб, амплифицируют из штамма дикого типа, тогда как полосы, соответствующую ~5,7 Кб, амплифицировали из колоний 1, 4, 7 и 9, что указывает на замену гена *budA* на *thlA*, *phaB* и кассету *ermB*. Вышеуказанное событие дополнительно подтверждали путем секвенирования ПЦР-продуктов из всех 4 клонов. После итоговой модификации экспрессию генов *thlA* и *phaB* запускает промотор в 3'-5' направлении от гена *budA*.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
122	SN01	ATTTACAAATTTCGGCCGGCCTACCTCCTCGTATAAATAAGATG
123	SN02	CTAGCTATTACAACCTTCTTTTCATATTACATTCACCTCTATGTC
124	SN03	GACATAGAGGTGAATGTAATATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAG
125	SN04mod	GTATAGCATACATTATACGAACGGTATTATCCCATGTGTAAACC ACCGT
126	SN05mod	TTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCCTTAGAAGCAAAC TAAG
127	SN06	GTCTAGTGTTTTTTTCTATCAATACTCTAGATACCGTTTCGTATAG C
128	SN07	TGTATGCTATACGAACGGTAAGTATTGATAGAAAAAACACTA GAC
129	SN08	CAAAAAGGAGTTTAAACAAAAAGTCATAAACCTGGATAAC
130	Og31f	CCGTTTCTCACAACAACAATACCAG
131	Og32r	AAACCACCTTGACGATGAAACCATA

189 Осуществляли ферментацию штамма *C. autoethanogenum* budA::thlA-phaB. Культуру выращивали при 37 °C с синтетическим газом (50% CO, 18% CO₂, 2 % H₂ и 30% N₂), который постоянно подавали в биореактор. Исходную скорость потока газа устанавливали на уровне 50 мл/мин, с последующим увеличением до 400 мл/мин в ходе эксперимента, а скорость перемешивания увеличивали от 200 об/мин до 500 об/мин. Ферментацию осуществляли на протяжении почти 5 дней. Метаболиты измеряли согласно описанию в примерах выше.

190 Концентрацию 1,3-бутандиола и других метаболитов, таких как 2-гидроксиизомасляная кислота, измеряли с применением газохроматографического (ГХ) анализа, используя систему для ГХ Agilent 6890N, оснащенную колонкой Agilent CP-SIL 5CB-MS (50 м × 0,25 мкм × 0,25 мкм), автоматическим пробозаборником и пламенно-ионизационным детектором (FID). Образцы получали путем разведения 400 мкл образца 400 мкл ацетонитрила с последующим 3-минутным центрифугированием при 14 000 об/мин; супернатант переносили в стеклянный флакон и

высушивали образец в Thermo SpeedVac. После высыхания образцы суспендировали в растворе, содержащем 400 мкл N,O-бис(трифторацетамида) (BSTFA) и пиридин (в соотношении 3:1) и нагревали в герметично закрытом стеклянном флаконе в течение 60 минут при 60 °С. Образцы переносили в автоматический пробозаборник для анализа, вводя пробу объемом 1 мкл, с коэффициентом деления 30:1 и температурой на входе, составляющей 250 °С. Хроматографию проводили с использованием программы термостата от 70 °С (без удерживания) с нарастанием до 110 °С со скоростью 3 °С/мин, с нарастанием до 230 °С со скоростью 15 °С/мин, с последующим итоговым нарастанием со скоростью 40 °С/мин до 310 °С с 3-минутным удерживанием. Скорость потока через колонку составляла 1,8 мл/мин, гелий использовали в качестве газа-носителя.

Температуру FID поддерживали на уровне 320 °С; 40 мл/мин водорода, 400 мл/мин воздуха и 20 мл/мин гелия использовали в качестве поддувочного газа.

191 Неожиданным образом, штамм *C. autoethanogenum* budA::thlA-phaB, экспрессирующий *thlA* и *phaB*, продуцировал до 1,55 г/л 3-гидроксibuтирата из газа (фиг. 16). Нативная тиоэстераза может конвертировать образующийся 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтират. В геномной последовательности были идентифицированы три гипотетических тиоэстеразы.

192 Что еще более неожиданно, было обнаружено, что помимо образования 3-гидроксibuтирата, происходило также образование до 150 мг/л 1,3-бутандиола (фиг. 16). Это может быть обусловлено активностью нативных альдегид:ферредоксиноксидоредуктазы (AOR) и алкогольдегидрогеназы. В геноме *C. autoethanogenum* присутствуют два гена AOR и несколько генов алкогольдегидрогеназ (Mock, *J Bacteriol*, 197: 2965-2980, 2015). Указанное восстановление 3-гидроксibuтирата приводит в действие восстановленный ферредоксин, и, соответственно, оно может быть прямо сопряжено с окислением CO, обеспечивающим образование восстановленного ферредоксина ($\text{CO} + \text{Fd}_{\text{ox}} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Fd}_{\text{red}}$) (фиг. 7).

193 Было также продемонстрировано продуцирование 1,3-BDO из газа через альтернативный маршрут с применением бутиральдегиддегидрогеназы Bld из *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AAP42563.1) (SEQ ID NO: 80). Ген *bld* синтезировали и клонировали совместно с той же тиолазой (*thlA* *C. acetobutylicum*) и (R)-специфической 3-гидроксibuтиратдегидрогеназой (*phaB* *Cupravidus necator*) в плазмиду pMTL8315-Pfdx-thlA-phaB-bld (SEQ ID NO: 132). Гены *Bld* и *phaB* амплифицировали из вышеуказанной плазмиды с помощью праймеров, представленных в таблице ниже, и клонировали в существующую плазмиду pMTL85147-thlA (WO 2012/115527).

SEQ ID NO:	Праймер	Последовательность	Направление
133	bld-phaB-F1	ACATGGGATAAGAAGGAGATATACATATGATAAAAG	прямой
134	bld-pMTL-R1	CGTCGACTCTAGATTAACTGCTAAAACACATCTTC	прямой
135	pMTL-bld-F1	GTGTTTTAGCAGGTAACTAGAGTCGACGTCACGC	прямой

194 Итоговой конструкцией трансформировали *C. autoethanogenum* согласно описанию выше и проводили эксперимент с ростом в бутылках для сыворотки с 50 мл среды PETC, нагнетая до достижения давления 30 фунтов/кв. дюйм СО-содержащий газ сталелитейных производств (собранный на объекте New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия) или синтетической смеси 5 газов с таким же составом, 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂.

195 Было продемонстрировано продуцирование 1,3-BDO через указанный маршрут из газа (фиг. 17A), однако уровни продуцирования были ниже (до 67 мг/л 1,3-BDO), чем через маршрут с AOR и, в отличие от маршрута с AOR, наблюдалось влияние на рост при экспрессии гена *bld* относительно *C. autoethanogenum* дикого типа (фиг. 17B).

10 196 В другом эксперименте *C. autoethanogenum*, трансформированный плазмидой pMTL83159-*phaB-thlA* согласно описанию в примере 2, продуцировал 0,33 и 0,46 г/л 3-ГБ и 1,3-BDO, соответственно, в эксперименте в бутылках в аутотрофных условиях согласно описанию в примере 2 (фиг. 40).

Пример 5

15 197 В указанном примере продемонстрировано продуцирование (S)-3-гидроксibuтирата и 1,3-бутандиола у *C. autoethanogenum*.

198 Конструировали плазмиду, которая экспрессирует тиолазу (*thlA* из *C. acetobutylicum*; SEQ ID NO: 136) и (S)-специфическую 3-гидроксibuтиратдегидрогеназу (*hbd1* из *C. kluyveri*; SEQ ID NO: 137) под контролем либо промотора ферредоксина (P_{fdx}, выделенный из *C. autoethanogenum*; SEQ ID NO: 138), либо промотора пируват-ферредоксиноксидоредуктазы (P_{pfor}, выделенный из *C. autoethanogenum*; SEQ ID NO: 139). Указанную плазмиду конструировали следующим образом: P-*hbd1-rbs2-thlA* собирали вместе и клонировали в вектор pMTL83151 (Heap, *J Microbiol Meth*, 78: 79–85, 2009), используя рутинные способы молекулярного клонирования, в том числе расщепление рестрикционными ферментами с последующим лигированием, полимеразную 25 цепную реакцию с перекрывающимися праймерами, бесшовное клонирование (Thermo Fisher Scientific) и метод GeneArt Type IIs (Thermo Fisher Scientific). Оперон P – *hbd1* – *rbs2* – *thlA* клонировали между сайтами рестрикции NotI и XhoI, обнаруживаемыми в области множественного клонирования плазмиды. P является конститутивным промотором, который содержит интактный сайт связывания рибосомы (*rbs*). *rbs2* (SEQ ID NO: 140) представляет собой 30 сайт связывания рибосомы для экспрессии *thlA*. Осуществляли поэтапные процедуры амплификации P, *hbd1* и *thlA* с существующих матриц с праймерами, представленными ниже.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
141	Pfdx-F1	AAAGGTCTCCGGCCGCGCTCACTATCTGCG GAACC	прямой
142	Pfdx-R1	TTTGGTCTCGAATTCTGTAACACCTCCTTAA TTTT TAG	обратный
143	Ppfor-F1	AAAGGTCTCCGGCCGCAAAATAGTTGATAA TAATGCAGAG	прямой
144	Ppfor-R1	TTTGGTCTCGAATTCCTCTCCTTTTCAAGCAT ATA	обратный

145	hbd1-F1	AAAGGTCTCGAATTCAAAGATCTATGTCTAT TAAATCAGTTGCAG	прямой
146	hbd1-R1	TTTGGTCTCCCTCCTTTCTATTTCTAATATGC GAAAAATCCTTTACC	обратный
147	thlA-F1	AAAGGTCTCAGGAGGTGTTACATATGAAAG AAGTTGTAATAGCTAGTGC	прямой
148	thlA-R1	TTTGGTCTCCTCGAGTATGGATCCCTAGCAC TTTTCTAGCAATATTGC	обратный

199 Полимеразные цепные реакции проводили согласно описанию ниже с применением набора для ПЦР Кара Taq PCR Kit (Кара Biosystems). Температуру отжига устанавливали на уровне 56 °С, удлинение в течение 1 минуты. Проводили 30 циклов повторных ПЦР-реакций. После этого ПЦР-продукты обессоливали с применением набора DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research Corporation).

200 Остов плазмиды pMTL83151 получали, проводя двойное расщепление NotI/XhoI с применением FastDigest NotI и FastDigest XhoI (Thermo Fisher Scientific), следуя предоставленному протоколу, с последующей обработкой щелочным фосфатом, с применением щелочной фосфатазы FastAP (Thermo Fisher Scientific) и следуя предоставленным протоколам. Затем расщепленный остов обессоливали с применением набора DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research Corporation).

201 Сборку ПЦР-продуктов и остова плазмиды осуществляли с применением набора GeneArt Type IIs (Thermo Fisher Scientific). Затем итоговую плазмиду выделяли из экспрессирующего плазмиду хозяина – *E. coli* с применением набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

202 Для введения собранных плазмид pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA и pMTL8315-Ppfor-hbd1-thlA, состоящих из оперонов, сначала плазмиду вводили в штамм *E. coli* CA434 посредством химической трансформации. После этого выполняли конъюгацию путем смешивания трансформированного штамма CA434 с хозяином-продуцентом *C. autoethanogenum* на твердой агаровой среде LB, и инкубации в анаэробной среде под давлением со смесью, состоящей из монооксида углерода и водорода, согласно описанию в примере 2. После конъюгации проводили отбор *C. autoethanogenum* на основании успешного роста на твердой среде, содержащей подходящий антибиотик и триметоприм для удаления оставшегося штамма *E. coli* CA434, в анаэробных условиях.

203 Штаммы *C. autoethanogenum*, несущие введенную плазмиду pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA или pMTL8315-Ppfor-hbd1-thlA, состоящую из оперона P-hbd1-rbs2-thlA, культивировали в 10 мл среды PETC в бутылки Schott объемом 250 мл, герметично закрывали резиновой пробкой и крышкой, и нагнетали до достижения давления 30 фунтов/кв. дюйм СО-содержащий газ сталелитейных производств (собранный на объекте New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия) или синтетическую смесь газов с таким же составом, 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂. Метаболиты измеряли согласно описанию в предыдущих примерах.

204 Неожиданным образом, в культурах *C. autoethanogenum*, экспрессирующих *thlA* и *hbd1*, присутствовал 3-гидроксibuтират, продуцированный из газа (фиг. 18A). Нативная тиоэстераза

может преобразовывать образующийся 3-гидроксибутирил-КоА в 3-гидроксибутират. В геномной последовательности были идентифицированы три гипотетических тиоэстеразы. В штамме, несущем pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA, обнаруживалось до 2,55 г/л 3-гидроксибутирата (фиг. 18А).

205 Что еще более неожиданно, было также обнаружено, что 3-гидроксибутират со временем преобразуется в 1,3-бутандиол; к окончанию роста штамм, несущий плазмиду pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA, продуцировал до 1,1 г/л 1,3-бутандиола (фиг. 18А). Это может быть обусловлено активностью нативных альдегид:ферредоксиноксидоредуктазы (AOR) и алкогольдегидрогеназы. В геноме *C. autoethanogenum* присутствуют два гена AOR и несколько алкогольдегидрогеназ (Mock, *J. Bacteriol.*, 197: 2965-2980, 2015). Указанное восстановление 3-гидроксибутирата (и восстановление ацетата до этанола; фиг. 18В) приводит в действие восстановленный ферредоксин, и, соответственно, оно может быть прямо сопряжено с окислением CO, обеспечивающим образование восстановленного ферредоксина ($\text{CO} + \text{Fd}_{\text{ox}} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Fd}_{\text{red}}$) (фиг. 7).

206 Тот же самый штамм *C. autoethanogenum*, несущий плазмиду pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA, также тестировали в ходе непрерывной ферментации. Ферментацию осуществляли согласно описанию в предыдущем примере, однако культивирование переводили в непрерывный режим со скоростью разведения свежей средой, составляющей примерно 0,05, на 2 день и затем увеличивали до 1,0 на 3 день. Наблюдался высокий уровень продуцирования 3-гидроксибутирата, до 7 г/л, при продуцировании 1,3-BDO на уровне 0,5 г/л.

207 Чтобы улучшить продуцирование (S)-3-гидроксибутирата и 1,3-бутандиола и избежать синтеза другой формы бутандиола (2,3-бутандиола), плазмиду pMTL-HBD-ThlA вводили в штамм с инактивированным путем продуцирования 2,3-бутандиола, у которого был удален ген ацетолактатдекарбоксилазы BudA (US9297026). Указанный нокаут budA элиминировал основной путь, ведущий к 2,3-BDO, увеличивая специфичность в отношении продуцирования 3-ГБ и 1,3-BDO. При экспрессии pMTL-HBD-ThlA штаммов с делецией budA достигалась специфичность, составляющая 15% (С-мол.%) как для 3-ГБ, так и для 1,3-BDO (фиг. 41).

	Селективность (С-мол.%)
Ацетат	14,7
Этанол	64,9
2,3-BDO	1,3
Биомасса	3,7
3-ГБ	10,4
1,3-BDO	5,0

208 Для сравнения, в штамме, экспрессирующем ту же плазмиду, pMTL83159-hbd-thlA, без нокаута budA, общая специфичность в отношении продуцирования 3-ГБ и 1,3-BDO в стационарном состоянии составляла только 6,9%

	Селективность (С-мол.%)
Ацетат	0,4
Этанол	84,3

2,3-BDO	6,2
Биомасса	2,2
3-ГБ	3,5
1,3-BDO	3,4

Пример 6

209 В указанном примере продемонстрировано, что система Ptb-Buk эффективна у *C. autoethanogenum* в отношении диапазона ацил-КоА, в том числе ацетоацетил-КоА, 3-гидроксibuтирил-КоА и 2-гидроксизобутирил-КоА

210 Систему Ptb-Buk экспрессировали из плазмиды в *C. autoethanogenum* и ее активность измеряли с применением анализа гидролиза КоА. Для этого гены *ptb-buk* из *C. beijerinckii* NCIMB8052 (GenBank NC_009617, позиция 232027..234147; Cbei_0203-204; NCBI-GeneID 5291437-38) амплифицировали из геномной ДНК *C. beijerinckii* NCIMB8052 и клонировали под контролем промотора пируват-ферредоксиноксиоредуктазы (P_{pfor} , выделенный из *C. autoethanogenum*; SEQ ID NO: 139) в вектор pMTL82251 (Heap, *J Microbiol Meth*, 78: 79–85, 2009) с применением рутинных способов молекулярного клонирования, в том числе расщепления рестрикционными ферментами с последующим лигированием, полимеразной цепной реакции с перекрывающимися праймерами, бесшовного клонирования (Thermo Fisher Scientific) и GeneArt Type IIs (Thermo Fisher Scientific) согласно описанию в примере 5. Олигонуклеотиды описаны ниже.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
149	Ppfor-F2	aaacagctatgaccgcGGCCGCAAAATAGT	прямой
150	Ppfor-R2	ttactcatTGGATTCCTCTCCTTT	обратный
151	Ptb-Buk-F2	ggaatccaATGAGTAAAACTTTGATGAG	прямой
152	Ptb-Buk-R2	caggcctcgagatctcCTAGTAAACCTTAGCTTGTTTC	обратный

211 Итоговую плазмиду pMTL82256-ptb-buk (SEQ ID NO: 153) вводили в *C. autoethanogenum* согласно описанию в предыдущих примерах.

212 Анализы на гидролиз Ацил-КоА проводили следующим образом. Клетки *C. autoethanogenum* собирали при плотности OD 2 (поздняя экспоненциальная фаза) путем центрифугирования (14 000 об/мин в течение 1 минут при 4 °C). Клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера для лизиса (калий-фосфатный буфер, pH 8). Клетки лизировали с использованием циклов замораживания-размораживания (необязательно), обрабатывали ультразвуком 6 × 30 с амплитудой 20 на льду. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 14 000 об/мин и 4 °C, и извлекали супернатант с растворимыми белками. Концентрацию белка измеряли, например, с помощью анализа методом Бредфорда.

213 Смесь для анализа содержала: 484 мкл калий-фосфатного буфера с pH 8,0, 1 мкл DTNB (конечная концентрация – 0,1 mM), 10 мкл клеточного лизата и 5 мкл КоА (конечная концентрация

– 500 мкМ). Все компоненты смешивали в кварцевой кювете (кювета объемом 1 мл с длиной считываемого пути 1 см), за исключением белка. Анализ начинали с добавления клеточного лизата с последующей реакцией в спектрофотометре при 405 нм, 30 °С в течение 3 минут. Контроль без лизата анализировали для измерения автолиза ацил-КоА.

5 **214** Для определения активности рассчитывали наклон в линейной части кривой (обычно в течение первых 30 секунд). Количество белка нормировали и наклон делили на количество белка. Коэффициент экстинкции ($14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) использовали для расчета специфической активности в М/с/мг. Вычитали активность отрицательного контроля.

10 **215** Анализ проводили с ацетоацетил-КоА, рацемической смесью 3-гидроксibuтирил-КоА (3-ГБ-КоА) и 2-гидроксиизобутирил-КоА (2-ГИБ-КоА). Возможность искусственно низких скоростей гидролиза 3-ГБ-КоА и 2-ГИБ-КоА из-за потенциальных ограничений доступности субстрата изучали, повторяя анализы на гидролиз в лизатах *C. autoethanogenum* с использованием разных концентраций ацил-КоА, 500 мкМ и 200 мкМ.

15 **216** Результаты анализа указывают на значимое увеличение гидролиза КоА в лизатах *C. autoethanogenum*, несущего плазмиду pMTL82256-ptb-buk, экспрессирующую систему Ptb-Buk, в отношении диапазона ацил-КоА, в том числе ацетоацетил-КоА, 3-гидроксibuтирил-КоА и 2-гидроксиизобутирил-КоА (фиг. 20А-В). Примечательно, что наблюдается также гидролиз КоА таких ацил-КоА, как 2-гидроксиизобутирил-КоА, которые *C. autoethanogenum* дикого типа не гидролизует. Наблюдалась некоторая нативная активность гидролиза КоА в отношении
20 ацетоацетил-КоА и 3-гидроксibuтирил-КоА.

Пример 7

25 **217** В указанном примере продемонстрировано, что разрушение идентифицированных нативных генов тиоэстеразы повышает эффективность системы Ptb-Buk и КоА-трансферазы за счет увеличения популяции доступных ацил-КоА, таких как ацетоацетил-КоА, 3-гидроксibuтирил-КоА или 2-гидроксиизобутирил-КоА.

218 В отличие от системы Ptb-Buk, где энергия сохраняется в форме АТФ при преобразовании ацил-КоА в соответствующие кислоты, при простом гидролизе КоА сохранения энергии не происходит.

30 **219** В анализах на гидролазу было обнаружено, что у *C. autoethanogenum* присутствует нативная активность гидролиза в отношении ацетоацетил-КоА и 3-гидроксibuтирил-КоА.

220 Анализы на гидролиз ацил-КоА проводили с ацетоацетил-КоА, рацемической смесью 3-гидроксibuтирил-КоА (3-ГБ-КоА) и 2-гидроксиизобутирил-КоА (2-ГИБ-КоА) согласно описанию в предыдущем примере. Результаты указанного анализа указывают на расщепление ацетоацетил-КоА и 3-ГБ-КоА, однако не 2-ГИБ-КоА, и подтверждают наличие нативной активности у
35 *C. autoethanogenum* (фиг. 11).

221 Анализ генома *C. autoethanogenum* привел к идентификации трех гипотетических КоА-тиоэстераз (гидролаз сложных тиоэфиров), которые могут отвечать за расщепление тиоэфирной

связи ацетоацетил-КоА или 3-гидроксibuтирил-КоА. Они также присутствуют у других ацетогенов, таких как *C. ljungdahlii*.

Описание	Аннотация	<i>C. autoethanogenum</i>	SEQ ID NO:	<i>C. ljungdahlii</i>	SEQ ID NO:
Тиоэстераза 1 (CAETHG_0718)	Пальмитоил-КоА-гидролаза	AGY74947.1	154	ADK15695.1	157
Тиоэстераза 2 (CAETHG_1524)	4-Гидроксibenзоил-КоА-тиоэстераза	AGY75747.1	155	ADK16655.1	158
Тиоэстераза 3 (CAETHG_1780)	Гипотетическая тиоэстераза	AGY75999.1	156	ADK16959.1	159

222 Инактивация указанных трех гипотетических КоА-тиоэстераз приводит к более высоким титрам продуктов, увеличивая эффективность системы Ptb-Buk. Указанные три гипотетических тиоэстеразы инактивировали с применением технологии ClosTron. Вкратце, нацеливающий домен Ltr типа II перепрограммировали, используя интернет-сайт ClosTron, и перенаправленные плазмиды ClosTron заказывали у DNA 2.0. Нокаутные векторы ClosTron pMTL007C-E2-Cau-2640-571s, нацеленный на тиоэстеразу 1 (CAETHG_0718), pMTL007C-E2-PBor3782-166s, нацеленный на тиоэстеразу 2 (CAETHG_1524), и pMTL007C-E2-PBor4039-199s, нацеленный на тиоэстеразу 3 (CAETHG_1780), вводили в *C. autoethanogenum* с применением конъюгации.

223 Выбор на основании интеграции проводили путем отбора на среде PETC с добавлением 5 мкг/мл кларитромицина; успешную инактивацию в результате интеграции интрона типа II подтверждали с помощью ПЦР для всего сайта встраивания.

224 Активность КоА-гидролазы в отношении ацетоацетил-КоА как *C. autoethanogenum* дикого типа, так и каждого из *C. autoethanogenum* с одним из гипотетических инактивированных генов измеряли с применением описанного выше анализа. Было показано, что все три штамма с инактивированными гипотетическими тиоэстеразами демонстрируют меньшую активность гидролиза в отношении ацетоацетил-КоА и 3-гидроксibuтирил-КоА (фиг. 21А-В).

225 Чтобы продемонстрировать, что уменьшение активности КоА-гидролазы и, соответственно, увеличение популяции ацетоацетил-КоА, является благоприятным для продуцирования происходящих из ацетоацетил-КоА продуктов, плазмиду с изопропанолом pMTL85147-thlA-ctfAB-adc, кодирующую *thl+* *ctfAB* + *adc* (WO 2012/115527), вводили в штамм *C. autoethanogenum* дикого типа и штамм с инактивированной тиоэстеразой 1. Эксперимент с ростом проводили в 40 мл среды PETC в бутылки Schott объемом 1 л в технических трипликатах с газом Со при 37 °С при встряхивании на 110 об/мин. Синтетический газ (50% СО, 18% СО₂, 2 % Н₂ и 30% N₂) использовали в качестве единственного источника энергии и углерода. Паровую фазу заменяли один раз и заполняли синтетическим газом, доводя давление до 21 фунт/кв. дюйм (1,5 бар) при 37 °С (50% СО, 18% СО₂, 2 % Н₂ и 30% N₂). Образцы для определения OD и аналитических данных собирали дважды в сутки.

226 Штамм с инактивированной тиоэстеразой 3 CAETHG_1780 продуцировал значимо более высокие уровни изопропанола по сравнению со штаммом дикого типа (фиг. 22 и фиг. 23A-D).

227 Аналогичным образом, нокаут тиоэстераз у *C. autoethanogenum* может увеличивать популяцию 3-гидроксibuтирил-КоА, обеспечивая более эффективную утилизацию 3-гидроксibuтирил-КоА парой Ptb-Buk и приводя к более высоким уровням продуцируемых ацетона, изопропанола, изобутилена, (R)-3-гидроксibuтирата, 1,3-бутандиола и/или 2-гидроксизомасляной кислоты. При введении плазмиды pMTL8315-Pfdx-hbd1-thlA из примера 5 в штамм *C. autoethanogenum* с разрушенной тиоэстеразой 2 CAETHG_1524 синтез 3-гидроксibuтирата прекращался (при этом при экспрессии указанной плазмиды в штамме *C. autoethanogenum* дикого типа наблюдали до 2,55 г/л 3-гидроксibuтирата). В указанном штамме отсутствует конкурентная активность в отношении 3-гидроксibuтирил-КоА.

228 Указанные результаты демонстрируют, что путем уменьшения активности тиоэстераз можно добиться более высоких уровней популяции КоА, доступного для системы Ptb-Buk и синтеза продуктов.

229 Кроме того, продуцирование 3-ГБ и 1,3-BDO может быть увеличено путем избыточной экспрессии ptb-buk. В контрольном эксперименте, когда *C. autoethanogenum* согласно описанию в примере 2 трансформировали плазмидами pMTL83159-phaB-thlA из примера 4, плюс pMTL82256 (Heap, *J Microbiol Methods*, 78: 79–85, 2009), последняя из которых представляет собой пустую плазмиду, используемую в качестве фонового контроля, ферментация такого штамма приводила к продуцированию 3-ГБ с максимальным титром 1,68 г/л на 10 день (фиг. 42A). Когда вместо пустой плазмиды pMTL82256 в *C. autoethanogenum* с pMTL83159-phaB-thlA коэкспрессировали плазмиду pMTL82256-buk-ptb, ферментация приводила к получению более высокого титра 3-ГБ, 4,76 г/л, в более ранний период, на 4 день (фиг. 42B).

230 Удаление нативных тиоэстераз повышает эффективность системы Ptb-Buk, которой свойственно предпочтение (R)-3-ГБ-КоА. Лocus гена тиоэстеразы в геноме удаляли и заменяли на фрагмент ДНК buk-ptb посредством обычной молекулярно-биологической методики, известной как гомологичная рекомбинация. Замену гена тиоэстеразы на buk-ptb подтверждали с помощью ПЦР, с последующим электрофорезом в агарозном геле и секвенированием ДНК.

231 В эксперименте в бутылках, когда pMTL83156-phaB-thlA экспрессировали без ptb-buk у мутанта с делецией тиоэстеразы, описанного выше, средний максимальный титр продуцированного 3-ГБ составлял $0,50 \pm 0,05$ г/л, аналогично титру, полученному с применением немодифицированного штамма *C. autoethanogenum*. При коэкспрессии pMTL82256-buk-ptb с плазмидой pMTL83156-phaB-thlA в штамме с нокаутированной тиоэстеразой продуцирование 3-ГБ увеличивалось до $1,29 \pm 0,10$ г/л (фиг. 43).

35 Пример 8

232 В указанном примере продемонстрирована возможность элиминации системы продуцирования ацетата у ацетогена *C. autoethanogenum* системой Ptb-Buk.

233 Продуцирование ацетата описано у всех ацетогенных микроорганизмов (Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, pages 354-420, New York, NY, Springer, 2006), поскольку продуцирование ацетата обеспечивает микроорганизму возможность прямо генерировать АТФ при субстратном фосфорилировании с помощью Pta (фосфотрансацетилазы) и Ask (фосфотрансацетилазы-ацетаткиназы). Нативные образующие ацетат ферменты, такие как Pta-Ack, соответственно, считаются имеющими существенное значение для ацетогенов (Nagarajan, *Microb Cell Factories*, 12: 118, 2013). Поскольку Ptb-Buk обеспечивает альтернативный способ генерирования энергии, становится возможной замена нативной системы Pta-Ack на Ptb-Buk.

234 Гены *pta* и *ack* у *C. autoethanogenum* находятся в одном опероне. Для замены генов *pta* и *ack* генами *ptb* и *buk* собирали плазмиду, pMTL8225-pta-ack::ptb-buk (фиг. 24), с контрселективным маркером *mazF* под контролем тетрациклинового индуцируемого промотора, плечом гомологии размером ~1Кб в 3'-5' направлении, *ptb*, *buk*, кассетой *ermB*, фланкированной сайтами *loxP* и плечом гомологии размером ~1Кб в 5'-3' направлении (SEQ ID NO: 160).

235 Плечи гомологии размером ~1Кб в 3'-5' и 5'-3' направлении амплифицировали с помощью ПЦР из *C. autoethanogenum* с праймерами SN22f/ SN23r и SN28f/ SN29r. *Ptb* и *buk* гены амплифицировали с помощью ПЦР из плазмиды pIPA_16 с применением праймеров SN24f/ SN25r. Кассету *ermB* с сайтами *loxP* амплифицировали с помощью ПЦР с применением праймеров SN26f/ SN27r. Остов плазмиды амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами SN30f/ SN31r. Полимеразу КАРА использовали для всех ПЦР-амплификаций. ПЦР-продукты собирали с применением набора для клонирования GeneArt Seamless от Life Technologies; плазмиду без мутаций во встраиваемых фрагментах применяли для трансформации *C. autoethanogenum* путем конъюгации согласно описанию выше.

236 После конъюгации и выбора на триметоприме и кларитромицине, 7 колоний методом штриха в двух повторностях высевали на чашки с агаром PETC-MES с кларитромицином и ангидротетрациклином для индукции экспрессии генов *mazF*. В колониях в присутствии кларитромицина и ангидротетрациклина гены *pta* и *ack* должны быть заменены на гены *ptb* и *buk* и кассету *ermB*. Это верифицировали посредством ПЦР с применением праймеров Og29f/ Og30r, фланкирующих плечи гомологии, и полимеразы КАРА (фиг. 25). Полосу, соответствующую ~4,6 Кб амплифицировали из штамма дикого типа, а полосы, соответствующие ~5,7 Кб амплифицировали из колоний 1 и 4-7, что указывает на замену генов *pta* и *ack* генами *ptb* и *buk* и кассетой *ermB*. Вышеуказанное событие дополнительно подтверждали путем секвенирования ПЦР-продуктов из клонов 4-7.

237 После итоговой модификации экспрессию генов *ptb* и *buk* запускает промотор в 3'-5' направлении от гена *pta*.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
161	SN22f	TTTACAAATTCGGCCGGCCAAAGATTGCTCTATGTTTAAGCT
162	SN23r	CATCAAAGTTTTTACTCATCAATTTTCATGTTCATTTCCCTCCCT

163	SN24f	AGGGAGGAAATGAACATGAAATTGATGAGTAAAACTTTGATGAGT
164	SN25r	GTATAGCATACATTATACGAACGGTACTAGTAAACCTTAGCTTGTTCTTC
165	SN26f	GAAGAACAAGCTAAGGTTTACTAGTACCGTTCGTATAATGTATGCTATAC
166	SN27r	AGAGATGAGCATTAAGTCAAGTCTACCGTTCGTATAGCATACA
167	SN28f	TGTATGCTATACGAACGGTAGACTTTTAATGCTCATCTCT
168	SN29r	CATGAGATTATCAAAAAGGAGTTTAAATATCTATTTTGTCTTAGGA
169	SN30f	TCCTAAGGACAAAATAGATATTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATG
170	SN31r	AGCTTAAACATAGAGCAATCTTTGGCCGGCCGAATTTGTAAA
171	Og29f	AGCCACATCCAGTAGATTGAACTTT
172	Og30r	AATTCGCCCTACGATTAAAGTGGAA

238 Итоговый штамм *C. autoethanogenum* pta-ack::ptb-buk, в котором оперон pta-ack заменяли на оперон ptb-buk, трансформировали согласно описанию выше обеспечивающей продуцирование изопропанола плазмидой pMTL85147-thlA-adc из примера 2. Проводили исследование роста в аутотрофных условиях и анализировали конечные продукты метаболизма. Продуцирования ацетата не наблюдалась, тогда как изопропанол (до 0,355 г/л) и 3-ГБ (до 0,29 г/л) по-прежнему продуцировался наряду с этанолом и 2,3-бутандиолом (фиг. 39А и 39В). Это демонстрирует, что возможно продуцирование изопропанола и 3-ГБ без продуцирования ацетата из газообразных субстратов, CO и/или CO₂ и H₂ с применением системы Ptb-Buk.

239 В том случае, если целевым продуктом является ацетон, а не изопропанол, ген первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (SEQ ID NO: 17) может быть дополнительно нокаутирован в указанном штамме *C. autoethanogenum* pta-ack::ptb-buk с применением способов, описанных выше и подробно описанных в WO 2015/085015. Введение плазмиды pMTL85147-thlA-adc в указанный штамм приводит к продуцированию ацетона на уровнях, аналогичных уровням, описанным выше для изопропанола, без ко-продукции ацетата. Этанол, 2,3-бутандиол и 3-ГБ могут представлять собой дополнительные продукты.

240 Дополнительные нокауты могут позволить элиминировать также и указанные продукты, например, нокаут гена ацетолактатдекарбоксилазы BudA приводит к получению штамма, неспособного продуцировать 2,3-бутандиол (US9297026). Продуцирование 3-ГБ может быть снижено или элиминировано путем удаления гена 3-гидроксibuтиратдегидрогеназы Bdh (SEQ ID NO: 62).

Пример 9

241 В указанном примере продемонстрировано улучшение преобразования 3-гидроксibuтирата в 1,3-BDO путем избыточной экспрессии гена альдегид:ферредоксин-оксидоредуктазы *aor1*.

242 Остов плазмиды pMTL82251 использовали для избыточной экспрессии гена *aor1* *C. autoethanogenum*. Плазида pMTL82251 была выбрана, поскольку она имеет другую точку

начала репликации и маркерный антибиотик, однако может быть коэкспрессирована с плазмидой, используемой в примере 5, содержащей *hbdI* и *thlA*. Получение остова плазмиды и реакцию сборки осуществляли после проведения процедур, представленных выше, с получением сначала плазмиды pMTL82256 путем введения промотора ферредоксина *C. autoethanogenum* в плазмиду pMTL82251 с последующим добавлением генов *aorI* с образованием плазмиды pMTL82256-aorI. Использовали перечисленные ниже праймеры.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Направление
173	Pfdx-F1	AAAGGTCTCCGGCCGCGCTCACTATCTGCGGAACC	прямой
174	Pfdx-R1	TTTGGTCTCGAATTCTGTAACACCTCCTTAATTTTAA G	обратный
175	aorI-F1	AAAGGTCTCGAATTCAAAGATCTATGTATGGTTATG ATGGTAAAGTATTAAG	прямой
176	aorI-R1	TTTGGTCTCCTCGAGTATGGATCCCTAGAACTTACCT ATATATTCATCTAATCC	обратный

243 После трансформации штамма *E. coli* CA434 итоговой плазмидой pMTL82256-aorI выполняли конъюгацию с предыдущим хозяином-продуцентом *C. autoethanogenum* 1,3-BDO. Соответственно, итоговый штамм *C. autoethanogenum* был носителем двух плазмид, одна из которых избыточно экспрессировала *hbdI* и *thlA*, а другая – *aorI*, с разными точками начала репликации и селективным маркером. Продуцирование 1,3-BDO характеризовали и количественно описывали согласно процедурам, представленным выше.

244 Результаты ясно показывают, что продуцирование 1,3-BDO может быть улучшено путем избыточной экспрессии *aorI*. Аналогичным образом, в *C. autoethanogenum* могут быть экспрессированы другие гены альдегид:ферредоксиноксидоредуктазы для облегчения преобразования 3-гидроксibuтирата в 1,3-бутандиол.

245 Для улучшения продуцирования 1,3-BDO AOR избыточно экспрессировали для улучшения преобразования 3-ГБ в 3-ГБ-альдегид. С этой целью pMTL82256-hbd-thlA и pMTL83159-aorI коэкспрессировали в *C. autoethanogenum*. По сравнению со штаммом, несущим отдельно pMTL82256-hbd-thlA, штамм с коэкспрессией *aorI* продуцировал больше этанола и 1,3-BDO (фиг. 44).

Пример 10

246 В указанном примере продемонстрирована стереоспецифичность Ptb-Buk, позволяющая получать 2-гидроксиизомасляную кислоту без получения нежелательных побочных продуктов.

247 2-гидроксиизомасляная кислота может быть продуцирована в *E. coli* и *C. autoethanogenum* путем введения тиолазы и 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназы для преобразования ацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, фермента 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутазы для преобразования 3-гидроксibuтирил-КоА в 2-гидроксиизобутирил-КоА, и фермента, который может гидролизовать КоА с образованием 2-гидроксиизомасляной кислоты. 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназа может быть либо (R)-, либо (S)-специфической, и фермент, преобразующий 2-гидроксиизобутирил-КоА в 2-гидроксibuтират в соответствии с этапом 1, 13, 19 и 20 согласно

фиг. 1. Указанный последний этап может быть осуществлен с помощью тиоэстеразы или системы Ptb-Buk.

- 248 Три потенциальных кандидатных гена, тиоэстераза *E. coli* типа II TesB, пару фосфатацетилтрансфераза/ацетаткиназа из *C. autoethanogenum* и пару
5 бутирилтрансфераза/бутираткиназа из *C. beijerinckii* клонировали в экспрессионные векторы *E. coli* pDUET T7 с применением способов, описанных выше, и праймеров, приведенных ниже.

SEQ ID NO:	Праймер	Последовательность
177	pETDuet-ptA-ack - ack-DuetI2-R1	GGGTACCTTATTTATTTTCAACTATTTCTTTTGTATC
178	pETDuet-ptA-ack - DuetI2-ack-F1	TTGAAAATAAATAAGGTACCCTCGAGTCTGGTAAAG
179	pETDuet-ptA-ack - DuetI2-ptA-R1	TTTTTTCCATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAAC
180	pETDuet-ptA-ack - ptA-DuetI2-F1	AGGAGATATACATATGGAAAAAATTTGGAGTAAGGC
181	pETDuet-tesB - DuetI2-tesB-F1	GAAATCATAATTAAGGTACCCTCGAGTCTGGTAAAG
182	pETDuet-tesB - DuetI2-tesB-R1	CCTGACTCATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAAC
183	pETDuet-tesB - tesB-DuetI2-F1	AAGAAGGAGATATACATATGAGTCAGGCACTTAAAA
184	pETDuet-tesB - testB-DuetI2-R1	AGGGTACCTTAATTATGATTTCTCATAACACCTTC

- 249 Полученные плазмиды pDUET-ptA-ack (SEQ ID NO: 185), pDUET-ptb-buk (SEQ ID NO: 186), pDUET-tesB (SEQ ID NO: 187) вводили в BL21(DE3) *E. coli* для экспрессии и затем
10 анализировали активность в отношении ацетоацетил-КоА, 3-гидроксибутирил-КоА и 2-гидроксиизобутирил-КоА. Результаты показаны на фиг. 27. BL21 *E. coli* обладает незначительной, но измеряемой активностью в отношении всех трех субстратов. Для Pta-Ack было показано отсутствие активности, превышающей фоновую, тогда как и тиоэстераза TesB, и Ptb-Buk показали высокую активность в отношении всех трех субстратов, в том числе 2-гидроксиизобутирил-КоА.
- 15 250 Активность и тиоэстеразы TesB, и Ptb-Buk была выше в отношении линейного ацетоацетил-КоА, 3-гидроксибутирил-КоА, по сравнению с разветвленным 2-гидроксиизобутирил-КоА. Это создает проблему для указанного пути, поскольку приводит к ранней терминации пути на уровне 3-гидроксибутирил-КоА, в частности, из-за активности, более высокой, чем активность в отношении фермента 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутаза.
- 20 251 Однако Ptb-Buk, в отличие от тиоэстераз, способна различать стереоизомеры и действует исключительно (или преимущественно) на (R)-3-гидроксибутирил-КоА, но не на (S)-3-гидроксибутирил-КоА. Это было продемонстрировано путем экспрессии системы Ptb-Buk либо с ThlA и (S)-специфической Hbd (фиг. 28A) или (R)-специфической phaB (фиг. 28B) в системе pDuet

у *E. coli*. Указанные конструкции конструировали согласно описанию в примерах 1 и 3. Исследования роста подтвердили, что образование поддающихся оценке количеств 3-гидроксибутирата происходило только при экспрессии Ptb-Buk в комбинации с (S)-специфической Hbd, но не с (R)-специфической phaB.

5 **252** Соответственно, маршрут через (S)-специфическую 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназу и Ptb-Buk обеспечивает значимые преимущества, поскольку система Ptb-Buk (в отличие от тиюэстеразы) не активна в отношении (S)-3-гидроксибутирил-КоА, но (S)-3-гидроксибутирил-КоА также является предпочтительным изомером для 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутаза (Yaneva, *J Biol Chem*, 287: 15502-15511, 2012). Продуцированная 2-гидроксиизобутирил-КоА может затем быть использована Ptb-Buk для продуцирования 2-гидроксиизомасляной кислоты, и (в отличие от тиюэстеразы) гидролиз 2-гидроксиизобутирил-КоА обеспечивает дополнительную энергию (фиг. 8).

253 Разрабатывали модульные конструкции для сравнения производительности указанного пути. Генную кассету, содержащую промотор Вуда-Льонгдала перед генами *meaB*, *hcmA* и *hcmB*, кодировали и синтезировали (SEQ ID NO: 188). *HcmA* и *hcmB* кодируют 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутаза, а *meaB* – шаперон из *Aquicola tertiarycarbonis*; в указанной конструкции гены *hcmA* и *meaB* сливали в один белок согласно описанию (SEQ ID NO: 189) (Yaneva, *J Biol Chem*, 287: 15502-15511, 2012). Генную кассету клонировали либо в плазмиду, содержащую тиюлазу (*thlA* из *C. acetobutylicum*; SEQ ID NO: 136) и (S)-специфическую 3-гидроксибутиратдегидрогеназу (*hbd* из *C. acetobutylicum*; SEQ ID NO: 190) (pMTL83155-thlA-hbd), либо (R)-специфическую 3-гидроксибутиратдегидрогеназу (*phaB* из *R. eutropha*) (pMTL83155-thlA-phaB), с применением рестрикционных ферментов KpnI и NcoI, с образованием плазмид pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meabhcmA-hcmB (SEQ ID NO: 191) и pMTL83155-thlA-phaB-Pwl-meabhcmA-hcmB (SEQ ID NO: 192), соответственно. Субклонирование кодон-оптимизированной 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутазной кассеты в *E. coli* Top-10 прошло успешно, однако после некоторых начальных сложностей; было обнаружено, что 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутазная кассета может быть клонирована в плазмиду при более низкой температуре (28 °C).

254 Для получения векторов pMTL83155-thlA-hbd и pMTL83155-thlA-phaB сначала амплифицировали промоторную область фосфатацетилтрансферазы *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 193) и клонировали в вектор pMTL83151 (FJ797647.1; Heap, *J Microbiol Meth*, 78: 79–85, 2009) с применением сайтов рестрикции NotI и NdeI до введения генов *thlA* и *hbd* или, соответственно, *phaB*, с помощью *NdeI* и *KpnI* в реакции двойного лигирования.

255 Кроме того, собирали совместимые плазмидные модули для экспрессии *ptb-buk* или *tesB*. Для этого соответствующие гены амплифицировали из геномной ДНК и вводили в плазмиду pMTL82256, описанную в примере 9, а затем вводили *ptb-buk* или *phaB* с применением NdeI и NcoI и набора для клонирования Seamless (Life Technologies) с образованием плазмид pMTL82256-ptb-buk (SEQ ID NO: 194) и pMTL82256-tesB (SEQ ID NO: 195).

256 Плазмиды pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meabhcmA-hcmB, pMTL83155-thlA-phaB-Pwl-meabhcmA-hcmB, pMTL82256-ptb-buk и pMTL82256-tesB вводили в *E. coli* Top-10 (все этапы

проводили при 28 °C) и *C. autoethanogenum* путем трансформации согласно описанию в предыдущих примерах, в следующих комбинациях: pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-ptb-buk, pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-tesB, pMTL83155-thlA-phaB-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-ptb-buk и pMTL83155-thlA-phaB-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-tesB.

257 Эксперименты с ростом проводили на *E. coli* в среде LB при 30 °C в течение 4 дней, и с *C. autoethanogenum* на среде PETC с содержащим 30 фунтов/кв. дюйм CO газом сталелитейных производств (собранным на объекте New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия) при 30 °C и 37 °C в течение 6 дней. Метаболиты измеряли согласно описанию выше. Помимо измерения с помощью ГХ-МС, продуцирование 2-гидроксиизомасляной кислоты также подтверждали с применением жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) и ¹H ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии.

258 Данные жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) регистрировали с использованием системы жидкостной хроматографии Dionex UltiMate 3000 (Dionex, Калифорния, США), сопряженной с масс-спектрометром ABSciex 4000 QTRAP (ABSciex, Конкорд, Канада). Указанной системой жидкостной хроматографии управляли через программное обеспечение Chromeleon (Dionex), и хроматографическое разделение проводили, вводя пробу объемом 10 мкл на колонку Gemini-NX C18 150 мм × 2 мм (внутр. диаметр), с гранулами 3 мкм и пористостью 110 Å (Phenomenex, Ашаффенбург, Германия), оснащенную предколонкой-картриджем Security Guard Gemini-NX C18 4 мм × 2 мм (внутр. диаметр). Температуру термостата колонки контролировали и поддерживали на уровне 55°C на всем протяжении сбора данных; использовали следующие подвижные фазы: 7,5 mM водный трибутиламин со значением pH, доведенным до 4,95 (±0,05) с ледяной уксусной кислотой (элюент А) и ацетонитрил (элюент В). Скорость потока подвижных фаз поддерживали на уровне 300 мкл/мин для всего профиля градиента; и подвижные фазы вводили прямо в масс-спектрометр без деления потока. Масс-спектрометром управляли с использованием программного обеспечения Analyst 1.5.2 (ABSciex), он был оснащен источником электроспрея TurboV, эксплуатируемом в режиме отрицательной ионизации. Использовали следующие оптимизированные ранее (и, соответственно, общие) показатели для получения запланированных данных методом мониторинга множественных реакций (MRM): напряжение ионного распыления – 4500В, распылитель (GS1), вспомогательный газ (GS2), газовая завеса (CUR) и газ для соударений (CAD) – 60, 60, 20 и «Среднее» (условные единицы), соответственно, получены с помощью генератора азота N300DR (Peak Scientific, Массачусетс, США). Температуру вспомогательного газа поддерживали на уровне 350 °C. Входной потенциал (EP) составлял -10 Вольт. Указанный способ также позволяет детектировать и отделять 2-гидроксимасляную кислоту.

259 ¹H ядерная магнитно-резонансная (ЯМР) спектроскопия при напряженности поля 400 МГц. Образцы получали путем разведения 400 мкл образца 400 мкл 20 mM фосфатного буфера, приготовленного с D₂O и содержащего триметилсилилпропионовую кислоту (TMSP) в качестве внутреннего стандарта (pH = 7). Указанные образцы затем переносили в стеклянную пробирку для ЯМР (5 мм × 8 дюймов) и анализировали посредством ¹H ЯМР с применением предварительного

насыщения для подавления сигнала воды с импульсом возбуждения 30°, релаксационной задержкой 15 секунд и 64 сканированиями при температуре 27°C. После получения спектра его трансформировали, сглаживали и интегрировали с применением программного обеспечения Agilent VnmrJ. TMSР в известной концентрации использовали для количественного определения 2-гидроксиизобутирата с использованием резонанса в области 1,36 м.д. (синглет).

260 И в *E. coli*, растущей в гетеротрофных условиях, и в *C. autoethanogenum*, растущей в автотрофных условиях, 2-гидроксиизомасляная кислота может быть детектирована в конструкциях pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-tesB (1,5 мг/л согласно способу ЖХ-МС/МС, и 8 мг/л при ГХ-МС в *C. autoethanogenum*; 0,5 мг/л согласно способу ЖХ-МС/МС и 2 мг/л согласно ГХ-МС у *E. coli*) и pMTL83155-thlA-phaB-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-ptb-buk (15 мг/л согласно способу ЖХ-МС/МС и 75 мг/л согласно ГХ-МС у *C. autoethanogenum*; 1,1 мг/л согласно способу ЖХ-МС/МС и 8,5 мг/л согласно ГХ-МС у *E. coli*), однако не в каких других конструкциях, в том числе контрольной. Безусловно, максимальное продуцирование происходило в штамме, несущем плазмиду pMTL83155-thlA-hbd-Pwl-meaBhcmA-hcmB + pMTL82256-ptb-buk (в 10 раз выше, чем для всех других маршрутов), содержащем оптимальный путь с тиолазой, (S)-специфической (S)-специфической 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназой, 2-гидроксиизобутирил-КоА-мутазой и системой Ptb-Buk (фиг. 29А-D). Неожиданным образом, также обнаружено, что указанный штамм продуцирует 2-гидроксибутират (2-ГБ) (до 64 мг/л согласно ЖХ-МС/МС и 50 мг/л согласно ГХ-МС у *C. autoethanogenum*; 12 мг/л согласно ЖХ-МС/МС и 9,5 мг/л согласно ГХ-МС у *E. coli*), что указывает на неспецифическую мутазную активность (фиг. 30). То же самое было обнаружено в штамме tesB, однако в данном случае на значимо более низких уровнях (18 мг/л согласно ЖХ-МС/МС и 9 мг/л согласно ГХ-МС у *C. autoethanogenum*). Продуцирование 2-гидроксиизомасляной кислоты также подтверждали с помощью ЯМР.

261 Кроме того, проводили также количественную ПЦР в реальном времени (кРВ-ПЦР) для подтверждения экспрессии генов *thlA*, *hbd*, *meaBhcmA* и *hcmB* (фиг. 31).

262 Графики РВ-ПЦР показывают, что продукт гена *thlA* экспрессируется на немного более высоких уровнях с промотором $P_{pta-ack}$, чем *hbd* (что ожидалось для второго гена в опероне), и что *hcmB* демонстрирует немного более низкие уровни экспрессии, чем *meaBhcmA*. Также при 30° С в *C. autoethanogenum* наблюдаются более низкие уровни экспрессии, чем при 37° С, и в *E. coli* при 30°С. Циклоспецифические значения приведены ниже.

Условия	Мишень	Среднее Cq	Стандартное отклонение Cq
<i>E. coli</i> / 30 °C	<i>thlA</i>	18,26	0,243
	<i>hbd</i>	20,6	0,603
	<i>meaBhcmA</i>	16,20	0,108
	<i>hcmB</i>	18,30	0,666
<i>C. autoethanogenum</i> / 30 °C	<i>thlA</i>	26,10	0,169
	<i>Hbd</i>	27,54	0,415

	<i>meaBhcmA</i>	20,63	0,604
	<i>hmcB</i>	22,64	0,697
<i>C. autoethanogenum</i> / 37 °C	<i>thlA</i>	18,48	0,069
	<i>hbd</i>	21,85	0,222
	<i>meaBhcmA</i>	16,72	0,119
	<i>hmcB</i>	19,62	0,173

263 Отношение (S)-3-гидроксимасляной кислоты к (R)-3-гидроксимасляной кислоте измеряли с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на системе для ЖХ Agilent 1260 Infinity с УФ-детекцией на 210 нм. Образцы получали путем центрифугирования при 14 000 об/мин в течение 3 минут, с последующим испарением 200 мкл супернатанта до сухого остатка. Затем осадок ресуспендировали в 100% изопропанол и обрабатывали ультразвуком при нагревании в течение 1 часа. Центрифугирование повторяли и супернатант переносили во флакон для ВЭЖХ для анализа. Разделение осуществляли, вводя пробу объемом 5 мкл на колонку TCI Chiral MB-S (250 мм × 4,6 мм × 3 мкм) со скоростью 1,5 мл/мин и 40°C в изократических условиях, с применением в качестве подвижной фазы 95–5 гексан-изопропанола с 0,1% трифторуксусной кислоты.

264 Проводили стереоспецифический анализ продуцированной 3-ГБ. Неожиданным образом было обнаружено, что *C. autoethanogenum* продуцировал смесь изомеров. Согласно описаниям, ферменты Hbd и PhaB являются стереоспецифическими, PhaB является R-специфическим, Hbd – S-специфическим; при экспрессии указанных ферментов в *E. coli* наблюдали стереоизомерически чистый продукт (Tseng, *Appl Environ Microbiol*, 75: 3137-3145, 2009).

265 Приведенная ниже таблица указывает на равновесное распределение (R)- и (S)-форм 3-ГБ, продуцированных посредством трех разных маршрутов у *C. autoethanogenum*. Эти данные указывают на присутствие изомеразы в *C. autoethanogenum*.

Маршрут	% R-формы	% S-формы
ThlA – PhaB	55 ± 7	53 ± 5
ThlA – HBD	12 ± 3	88 ± 3
ThlA – ctfAB	16 ± 7	84 ± 7

266 Нокаут нативных изомераз может предотвращать взаимопревращение (R)- и (S)-форм 3-ГБ. Как вариант, экспрессия или избыточная экспрессия изомераз может обеспечивать новые маршруты для ptb-buk. Например, Hbd может быть использована для получения (S)-3-ГБ, изомеразы может преобразовывать (S)-3-ГБ в (R)-3-ГБ, и ptb-buk может действовать на (R)-3-ГБ с продуцированием представляющих интерес продуктов.

Пример 11

267 В указанном примере продемонстрировано продуцирование изобутилена с помощью Ptb-Buk-преобразования 3-гидроксиизовалерил-КоА и 3-гидроксиизовалерат.

268 Были описаны разные маршруты продуцирования изобутилена, например, преобразование
 5 ацетона в изобутилен с помощью гидроксиизовалератсинтазы и декарбоксилазы (van Leeuwen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1377-1387, 2012). Однако этап гидроксиизовалератдекарбоксилазы является этапом, требующим АТФ, и кинетика указанного фермента может быть неидеальной. Были идентифицированы два ведущих к изобутилену действующих систему Ptb-Buk альтернативных маршрута через 3-гидроксиизовалерил-КоА, который, как было показано *in vitro*, представляет собой подходящий субстрат для системы Ptb-Buk (Liu, *Appl Microbiol Biotechnol*, 53:
 10 545-552, 2000).

269 Альтернативный путь 1 состоит из синтазы, которая преобразует ацетон в 3-гидроксиизовалерил-КоА (фиг. 9).

270 Альтернативный путь 2 проходит через известный промежуточный продукт биосинтеза
 15 изолейцина 3-метил-2-оксопентаноат, общий для бактерий, таких как *E. coli* или *C. autoethanogenum* (фиг. 10).

Пример 12

271 В указанном примере описаны способы определения характеристик вариантов Ptb-Buk.

272 Принимая во внимание субстратную неизбирательность Ptb-Buk, предполагают, что
 20 системы Ptb-Buk с варьирующими последовательностями аминокислот обладают варьирующими предпочтениями в отношении определенных субстратов. Для идентификации системы Ptb-Buk, отдающей предпочтение требуемому субстрату (например, ацетоацетил-КоА, 3-гидроксибутирил-КоА, 2-гидроксиизобутирил-КоА, ацетил-КоА и/или бутирил-КоА), желательно проведение высокопроизводительного скрининга. Такой скрининг может осуществляться путем сопряжения люциферазы светлячков (Luc) с системой Ptb-Buk (фиг. 33). Luc вступает в реакцию с D-
 25 люциферинном с генерацией оксилуциферина, диоксида углерода и света. Помимо магния и молекулярного кислорода, для развития реакции с Luc требуется АТФ. АТФ представляет собой продукт, генерируемый Ptb-Buk при наличии подходящего ацил-КоА- или эноил-КоА-субстрата. Соответственно, сравнение скоростей реакции и предпочтений Ptb-Buk для различных субстратов может быть осуществлено на основании количественного определения количества света,
 30 генерируемого в ходе реакции с Ptb-Buk, Luc, d-люциферинном, магнием, молекулярным кислородом, фосфатом, АДФ, и ацил-КоА или эноил-КоА.

Пример 13

273 В указанном примере используется моделирование на уровне генома, чтобы
 35 продемонстрировать возможность достижения высокой селективности в отношении ненативных продуктов при применении Ptb-Buk. Кроме того, на указанном примере продемонстрировано, что применение Ptb-Buk может обеспечивать сопряжение клеточного роста с продуцированием продукта, что позволяет конструировать стабильные высокопродуктивные штаммы для ферментации.

274 Использовали метаболическую модель на уровне генома *C. autoethanogenum*, аналогичную описанной в источнике: Marcellin, *Green Chem*, 18: 3020-3028, 2006. Были созданы варианты указанной модели, содержащие дополнительные метаболические реакции, каждая из которых представляет отличный генетически модифицированный микроорганизм для получения ненативных продуктов. Для каждого пути получения ненативного продукта создавали три версии модели, включающей либо тиюэстеразную, либо ацетат-КоА-трансферазную, либо Ptb-Buk-реакцию.

275 Показатели максимальной селективности вычисляли с помощью анализа баланса потоков (FBA) с применением скриптов COBRA Toolbox v2.0 из MATLAB R2014a (The Mathworks, Inc.) с Gurobi версии 6.0.4 в качестве решающей программы (Gurobi Optimization, Inc.). Обменные реакции ограничивали для представления химически заданной минимальной ростовой среды с CO в качестве источника углерода и энергии. Для поиска существующих вариантов дизайна штамма, включающих до 10 генных нокаутов и обеспечивающих сопряжение продуцирования целевого ненативного химического вещества с ростом, использовали эволюционный алгоритм.

276 Согласно прогнозу на основании FBA, пути, задействующие Ptb-Buk или КоА-трансферазу, обеспечивают самые высокие показатели селективности продуктов за счет образования АТФ при субстратном фосфорилировании. Результаты представлены в таблице 2. Однако следует отметить, что одним из ограничений моделей на уровне генома и FBA-анализа является то, что не учитывается кинетика ферментов. Для функциональной КоА-трансферазной реакции требуется определенный базовый уровень ацетата, соответственно, в реальности максимальная селективность при применении КоА-трансферазы будет составлять менее чем 100% ввиду необходимости присутствия некоторого базового уровня ацетата.

Ненативный продукт	Максимальный % селективности (С в целевом продукте/С во всех продуктах ферментации)		
	Тиюэстераза	КоА-трансфераза	Ptb-Buk
Ацетон	82,0	100	100
Изопропанол	82,1	100	100
Изобутилен	55,9	80,2	80,2
3-Гидроксibuтират	86,0	100	100
1,3-Бутандиол	88,6	100	100
2-Гидроксиизобутират	86,0	100	100

277 Таблица 2. Анализ баланса потоков (FBA), отражающий максимальные возможные показатели селективности ненативных продуктов у *C. autoethanogenum* в отношении совокупности продуктов и кандидатных ферментов.

278 Желательно конструировать штаммы, в которых продуцирование целевых ненативных химических веществ необходимо для роста клеток. Согласно прогнозу на основании FBA, в большинстве случаев при сопряжении продуцирования целевого химического вещества с ростом при использовании тиюэстеразы или КоА-трансферазы возникнут затруднения; вместо этого предпочтение будет отдано нативным продуктам, ацетату и этанолу. Однако существует множество вариантов дизайна штаммов, обеспечивающих сопряжение роста и продуцирования химических веществ при использовании Ptb-Buk, часто предусматривающих разрушение фосфотрансацетилазных-ацетаткиназных реакций. В таблице 3 обобщены данные относительно способности сопряжения с ростом для каждого штамма.

10

Ненативный продукт	Способность к сопряжению продуцирования ненативных химических веществ с ростом		
	Тиюэстераза	КоА-трансфераза	Ptb-Buk
Ацетон	Нет	Нет	Есть
Изопропанол	Нет	Нет	Есть
Изобутилен	Нет	Нет	Нет
3-Гидроксibuтират	Нет	Нет	Есть
1,3-Бутандиол	Нет	Есть	Есть
2-Гидроксиизобутират	Нет	Нет	Есть

279 Таблица 3. Потенциал для сопряжения ненативного химического продуцирования с ростом у *C. autoethanogenum* при росте на CO, с реконfigurацией метаболической сети с нокаутом до 10 генов.

280 Хотя и Ptb-Buk, и КоА-трансфераза могут поддерживать высокую селективность, согласно прогнозу на основании анализа баланса потоков в большинстве случаев только Ptb-Buk может обеспечивать конструирование стабильных высокопродуктивных штаммов для ферментации, обеспечивающее сопряжение продуцирования ненативных химических веществ с ростом.

Пример 14

281 В указанном примере продемонстрировано продуцирование адипиновой кислоты с помощью Ptb-Buk из газообразного сырья.

282 Было описано продуцирование *E. coli* адипиновой кислоты из сахара через путь, задействующий Ptb-Buk (Yu, *Biotechnol Bioeng*, 111: 2580-2586, 2014). Однако уровень продуцирования был низким, в диапазоне мкг/л. Без связи с конкретной теорией, авторы настоящего изобретения считают, что это предположительно обусловлено отсутствием движущей силы в форме восстановительной способности и профицита АТФ. Применение восстановленного

газообразного субстрата, такого как CO и H₂, и ацетогенной бактерии, такой как *C. autoethanogenum*, может обеспечивать преодоление указанного существующего ограничения. Окисление CO и H₂ обеспечивает достаточную движущую силу для восстановления 3-оксоадипил-КоА до 3-гидроксиадипил-КоА 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназой или ацетоацетил-КоА-гидратазой, и 2,3-дегидроадипил-КоА до адипил-КоА эноил-КоА-гидролазой или эноил-КоА-редуктазой (фиг. 34, этапы 23 и 25), в отличие от *E. coli*, растущих в гетеротрофных условиях на более окисленных сахарах. Ацетогенные бактерии существуют на «энергетическом пределе жизни» и, соответственно, генерирующие АТФ реакции, такие как система Ptb-Buk, обладают выраженной движущей силой, что обеспечивает эффективное преобразование адипил-КоА в адипиновую кислоту (фиг. 34, этап 26), в отличие от *E. coli*, растущей в гетеротрофных условиях на сахарах, с генерацией профицита АТФ за счет гликолиза.

283 Для продуцирования адипиновой кислоты из газа в *C. autoethanogenum* гены, кодирующие сукцинил-КоА-синтетазу, из *E. coli* (NP_415256, NP_415257), кетоизовалератоксидоредуктазу PaaJ из *E. coli* (WP_001206190.1), 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназу Hbd из *Clostridium beijerinckii* (WP_011967675.1), транс-2-эноил-КоА-редуктазу Crt из *C. acetobutylicum* (NP_349318.1), транс-2-эноил-КоА-редуктазу Bcd из *C. acetobutylicum* (NP_349317.1) и транспортирующие электроны флавопротеины EtfAB (NP_349315, NP_349316) клонируют на экспрессионную плазмиду, а затем трансформируют согласно описанию выше штаммы *C. autoethanogenum* pta-ack::ptb-buk или CAETHNG_1524::ptb-buk из приведенных выше примеров. Адипиновую кислоту получают в соответствии с этапами, представленными на фиг. 34.

Пример 15

284 В указанном примере продемонстрировано продуцирование различных продуктов, в том числе 2-бутен-1-ола, 3-метил-2-бутанола, 1,3-гександиола (HDO), с помощью Ptb-Buk и AOR.

285 Как продемонстрировано в примере 6, Ptb-Buk является в значительной степени неизбирательной и действует на широкий диапазон КоА в качестве субстратов, или может быть сконструирована таким образом, чтобы использовать диапазон не встречающихся в природе КоА в качестве субстратов. Аналогичным образом, фермент AOR, как было показано, действует на широкий диапазон субстратов. Вместе указанные два фермента могут преобразовывать широкий диапазон КоА через соответствующие кислоты в альдегиды, которые затем могут быть преобразованы в спирты, кетоны или енолы с помощью алкогольдегидрогеназ, широкий спектр которых существует в природе. Хотя в стандартных условиях восстановление кислот с ферредоксином в альдегиды с помощью AOR является эндотермическим (Thauer, *Bacteriol Rev*, 41: 100-180, 1977), и, соответственно, его реализация нецелесообразна, неожиданным образом, оно имеет место у карбоксидотрофных ацетогенов, таких как *C. autoethanogenum*, функционирующих при низких значениях pH, при CO или H₂ в качестве субстрата (Mock, *J Bacteriol*, 197: 2965-2980, 2015). Одно из общих ограничений при работе с ацетогенами заключается в том, что они ограничены по АТФ, существуя на «термодинамическом пределе жизни» (Schuchmann, *Nat Rev Microbiol*, 12: 809-821, 2014), что может быть преодолено за счет сопряжения указанного восстановления кислот с АТФ-связанным образованием кислот из КоА с помощью системы Ptb-Buk.

286 Применение системы Ptb-Buk и системы AOR было продемонстрировано в приведенных выше примерах для нескольких разных продуктов, однако может быть расширено на дополнительные продукты, например, получение 2-бутен-1-ола, 3-метил-2-бутанола, 1,3-гександиола (HDO). 2-бутен-1-ол может быть продуцирован с помощью Ptb-Buk, AOR и 5 алкогольдегидрогеназы из кротонил-КоА (фиг. 35). 1,3-Гександиол может быть продуцирован с помощью Ptb-Buk, AOR и алкогольдегидрогеназы из 3-гидроксигексаноил-КоА (фиг. 35). Путем комбинирования Ptb-Buk, Adc и алкогольдегидрогеназы (такой как нативная первичная/вторичная алкогольдегидрогеназа) может быть продуцирован 3-метил-2-бутанол из ацетобутирил-КоА.

287 Все указанные предшественники, кротонил-КоА, 3-гидроксигексаноил-КоА или 10 ацетобутирил-КоА, могут быть получены путем восстановления и удлинения ацетил-КоА, ацетоацетил-КоА и 3-ГБ-КоА, согласно описанию в предыдущих примерах, посредством известных ферментативных путей, например, у *Clostridium kluyveri* (Barker, *PNAS USA*, 31: 373-381, 1945; Seedorf, *PNAS USA*, 105: 2128-2133, 2008) и других Clostridia. Задействованные ферменты включают кротонил-КоА-гидратазу (кротоназу) или кротонил-КоА-редуктазу, бутирил-15 КоА-дегидрогеназу или транс-2-эноил-КоА-редуктазу, тиолазу или ацил-КоА-ацетилтрансферазу, и 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназу или ацетоацетил-КоА-гидратазу (фиг. 35). Соответствующие гены из *C. kluyveri* или других Clostridia были клонированы в экспрессионную плазмиду (U.S. 2011/0236941) и затем согласно описанию выше трансформировали штаммы *C. autoethanogenum* pta-ack::ptb-buk или CAETHG_1524::ptb-buk из приведенных выше примеров для 20 получения 2-бутен-1-ола, 3-метил-2-бутанола, 1,3-гександиола (HDO). 2-бутен-1-ол, 3-метил-2-бутанол и 1,3-гександиол (HDO) могут быть предшественниками для дальнейших выходных продуктов.

288 Хотя было представлено всего несколько примеров, следует понимать, что указанный путь может быть дополнительно расширен с применением тех же ферментов или их 25 сконструированных вариантов, обладающих специфичностью в отношении более длинных цепей, для получения диапазона спиртов, кетонов, енолов или диолов C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄ (фиг. 39). Молекулы другого типа могут быть получены также с применением праймеров или удлиняющих звеньев, отличных от ацетил-КоА, на тиолазном этапе, согласно существующим описаниям (Cheong, *Nature Biotechnol.*, 34: 556-561, 2016).

289 Все источники, в том числе публикации, патентные заявки и патенты, цитируемые в 30 настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылок в той же степени, как если бы каждый источник был индивидуальным конкретным образом включен посредством ссылки и полностью приведен в настоящем документе. Ссылка на какой-либо предшествующий уровень техники в настоящем описании не предполагает, и не должна быть истолкована как 35 признание того, что предшествующий уровень техники входит в известный уровень техники в рассматриваемой области в какой-либо стране.

290 Применение терминов в единственном числе, включая сопровождаемые определением «указанный(ая,ое)» и аналогичных объектов в контексте описания настоящего изобретения (в 40 частности, в контексте приведенной ниже формулы изобретения) должны рассматриваться как охватывающие термины как в единственном, так и во множественном числе, если в настоящем

документе не указано иное или если это явным образом не противоречит контексту. Термины «состоящий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» должны рассматриваться как неограничивающие (т.е. означающие «в том числе, но не ограничиваясь перечисленным»), если не указано иное. Подразумевается, что указание диапазонов значений в настоящем документе служит

5 исключительно в качестве краткого способа индивидуального указания каждого отдельного значения, попадающего в указанный диапазон, если в настоящем документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в настоящее описание в той же степени, как если бы оно было индивидуальным образом указано в настоящем документе. Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы в любом подходящем порядке, если в настоящем

10 документе не указано иное или если это иным образом явно не противоречит контексту. Применение всех и каждого примеров, или примеры выражений (например, «такие как») в настоящем документе предназначено исключительно для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если не указано иное. Никакая формулировка в настоящем описании не должна быть истолкована как подразумевающая, что

15 какой-либо не заявленный элемент имеет существенное значение для практической реализации настоящего изобретения.

291 Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящем документе. Специалисты в данной области техники после прочтения приведенного выше описания смогут обнаружить очевидные варианты указанных предпочтительных вариантов реализации.

20 Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в соответствующих случаях будут применять такие варианты, и предполагают, что практическая реализация настоящего изобретения может осуществляться иным образом, чем, в частности, это описано в настоящем документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, описанного в формуле изобретения, прилагаемой к настоящему документу, в рамках,

25 установленных применимым законодательством. Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных вариантах охвачена настоящим изобретением, если в настоящем документе не указано иное или если это иным образом явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

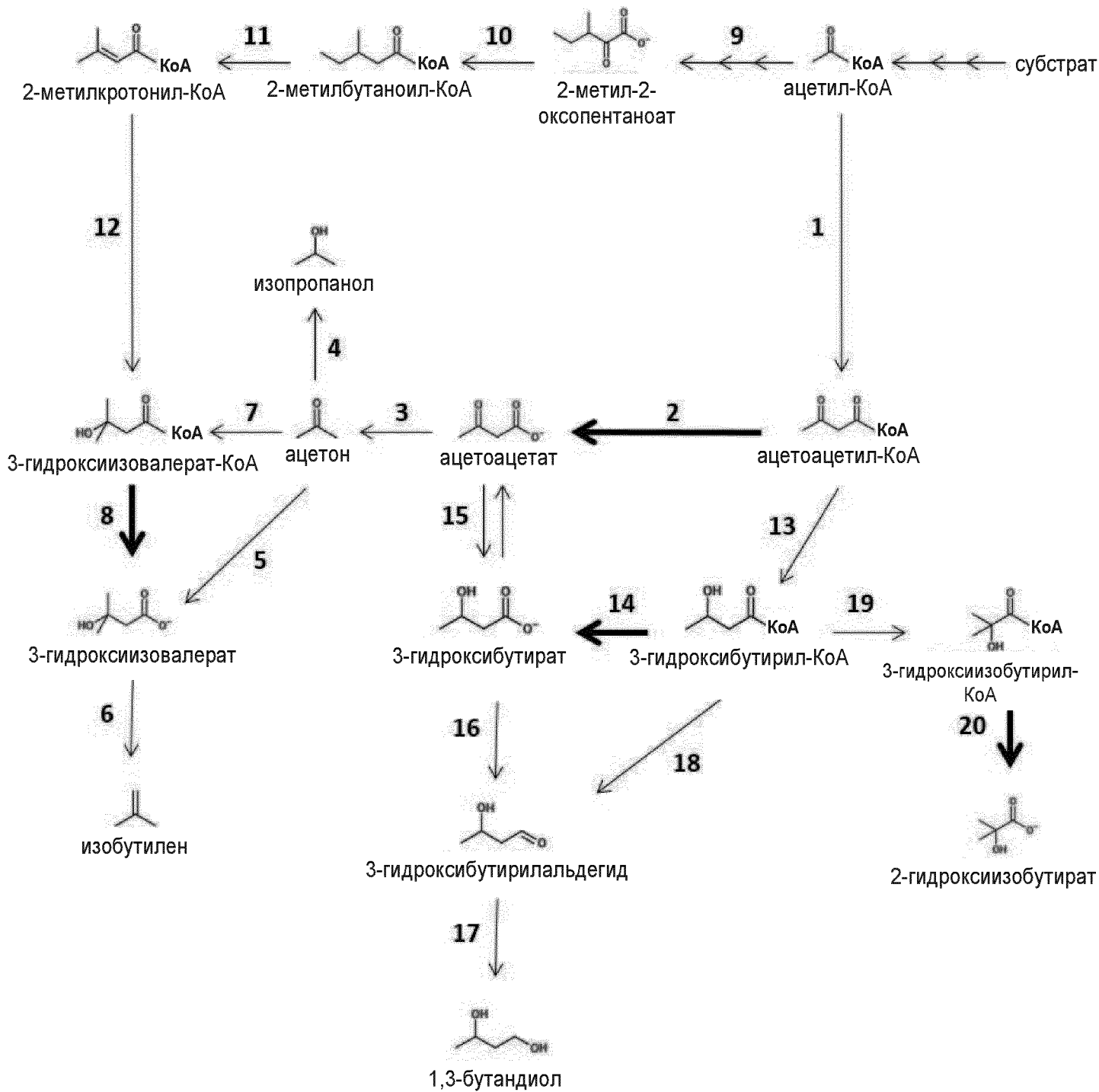
1. Генетически сконструированный микроорганизм, способный продуцировать продукт из газообразного субстрата, содержащий:
 - а) ацил-КоА тиоэфирный праймер и/или удлинитель, причем указанный праймер и удлинитель способны функционировать в итеративном пути;
 - б) нуклеиновую кислоту, кодирующую группу экзогенных ферментов, способных продуцировать по меньшей мере один КоА тиоэфирный промежуточный продукт;
 - с) один или более терминирующих ферментов; ипри этом указанный микроорганизм представляет собой C1-фиксирующую бактерию, содержащую разрушающую мутацию в тиоэстеразе.
2. Микроорганизм по п. 1, в котором праймер и/или удлинитель а) выбран из ацетил-КоА.
3. Микроорганизм по п. 1, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая группу экзогенных ферментов, б), включает тиолазу (Thl), гидроксибутиратдегидрогеназу (Hbd), кротоназу (Crt), и бутирил-КоА дегидрогеназа/транспортирующий электроны флавопротеин АВ (Bcd-EtfAB).
4. Микроорганизм по п. 1, в котором указанная нуклеиновая кислота, кодирующая группу экзогенных ферментов, б), включает фермент, который преобразовывает C_n ацил-КоА в C_{n+2} ацетоацил-КоА.

5. Микроорганизм по п. 1, в котором указанная нуклеиновая кислота, кодирующая группу экзогенных ферментов, b), включает:
- i) фермент, который преобразовывает C_{n+2} ацетоацил-КоА в C_{n+2} 3-ОН-КоА;
 - ii) фермент, который преобразовывает C_{n+2} 3-ОН-КоА в C_{n+2} Эноил-КоА; и
 - iii) фермент, который преобразовывает C_{n+2} Эноил-КоА в C_{n+2} Ацил-КоА.
6. Микроорганизм по п. 1, в котором один или более терминирующих ферментов с) включает экзогенную фосфатбутирилтрансферазу (Ptb) и экзогенную бутираткиназу (Buk) (Ptb-Buk).
7. Микроорганизм по п. 6, дополнительно содержащий ферредоксин-зависимую альдегидоксидоредуктазу (AOR) и/или ацетоацетатдекарбоксилазу (Adc).
8. Микроорганизм по п. 7, дополнительно содержащий алкогольдегидрогеназу (Adh).
9. Микроорганизм по п. 4, где фермент, который преобразовывает C_n ацил-КоА в C_{n+2} ацетоацил-КоА, представляет собой тиолазу.
10. Микроорганизм по п. 5, где фермент, который преобразовывает C_{n+2} ацетоацил-КоА в C_{n+2} 3-ОН-КоА, представляет собой Hbd.
11. Микроорганизм по п. 5, где фермент, который преобразовывает C_{n+2} 3-ОН-КоА в C_{n+2} Эноил-КоА, представляет собой Crt.

12. Микроорганизм по п. 5, где фермент, который преобразовывает C_{n+2} Эноил-КоА в C_{n+2} Ацил-КоА, представляет собой Vcd-EtfAB.
13. Микроорганизм по п. 1, в котором экзогенные ферменты позволяют продуцировать C_{n+2} ацетокислоту, C_{n+2} 3-ОН-кислоту, C_{n+2} Эноат, C_{n+2} 1-кислоту, C_{n+2} Ацетон, C_{n+2} метил-2-ол, C_{n+2} 1,3-диол, C_{n+2} 2-ен-1-ол, или C_{n+2} 1-спирт.
14. Микроорганизм по п. 1, где указанный микроорганизм является представителем рода, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa*, и *Thermoanaerobacter*.
15. Микроорганизм по п. 1, где указанный микроорганизм дополнительно содержит разрушающую мутацию в гене первично-вторичной алкогольдегидрогеназы, дополнительном тиоэстеразном гене или любую их комбинацию.
16. Микроорганизм по п. 1, где указанный микроорганизм происходит из исходного микроорганизма, выбранного из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharbutyricum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium diolis*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium phytofermentans*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Corynebacterium glutamicum*,

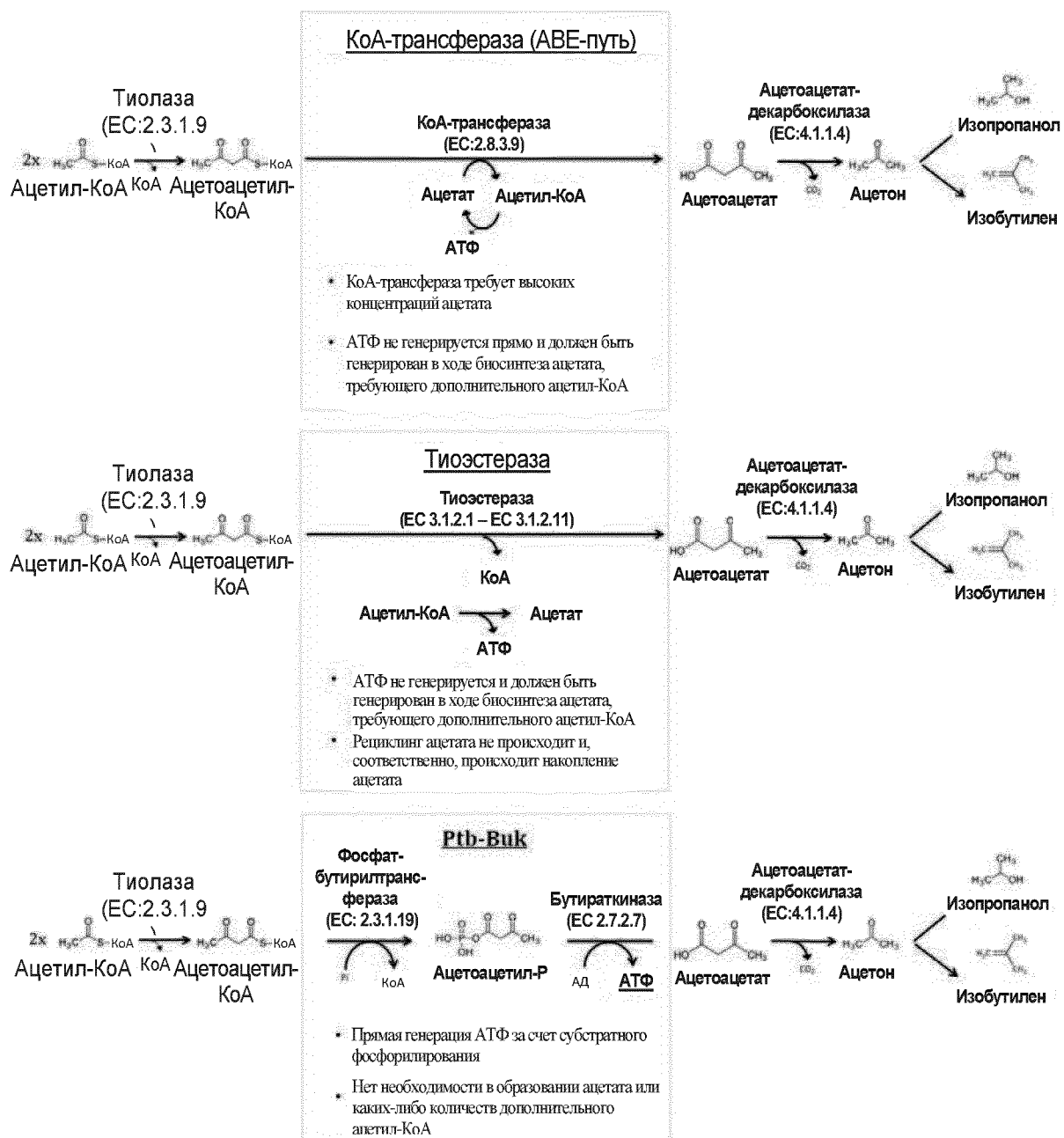
Trichoderma reesei, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, или *Methylobacterium extorquens*.

17. Способ получения продукта, включающий культивирование сконструированного микроорганизма по п. 1 в присутствии газообразного субстрата.
18. Способ по п. 17, где газовый субстрат содержит источник C1-углерода, включающий CO, CO₂, и/или H₂.
19. Способ по п. 17, где продукт выбран из C_{n+2} ацетокислоты, C_{n+2} 3-ОН-кислоты, C_{n+2} Эноата, C_{n+2} 1-кислоты, C_{n+2} Ацетона, C_{n+2} метил-2-ола, C_{n+2} 1,3-диола, C_{n+2} 2-ен-1-ола, или C_{n+2} 1-спирта.
20. Способ по п. 17, где продукт выбран из 1-пропанола, 1-бутанола, 1-гексанола, 1-октанола или их предшественников из ацетил-КоА.

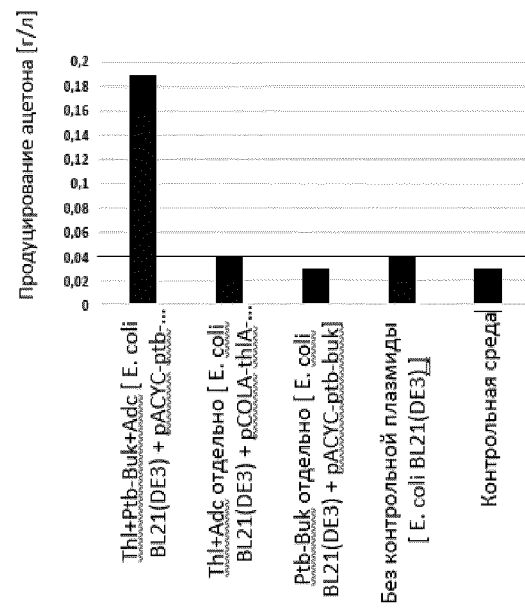




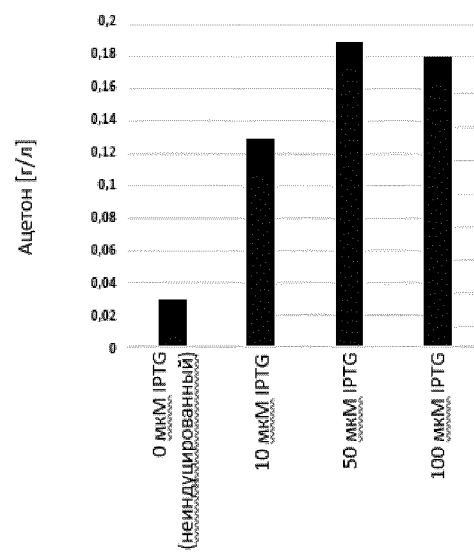
ФИГ. 2



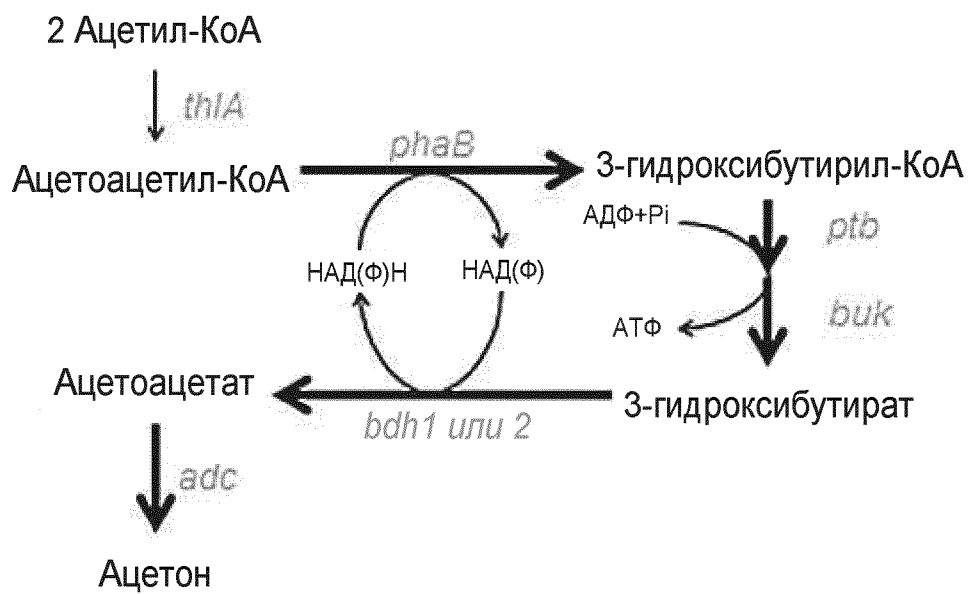
ФИГ. 3



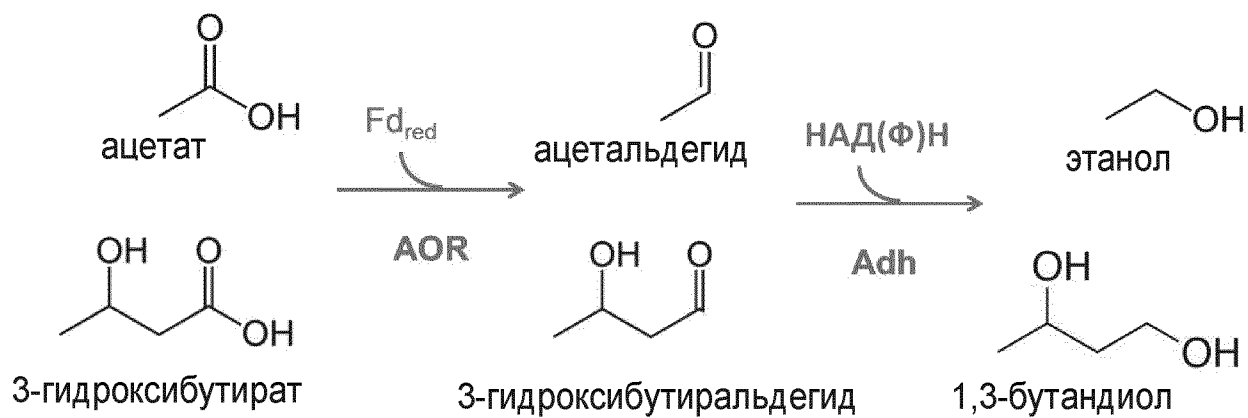
Фиг. 4



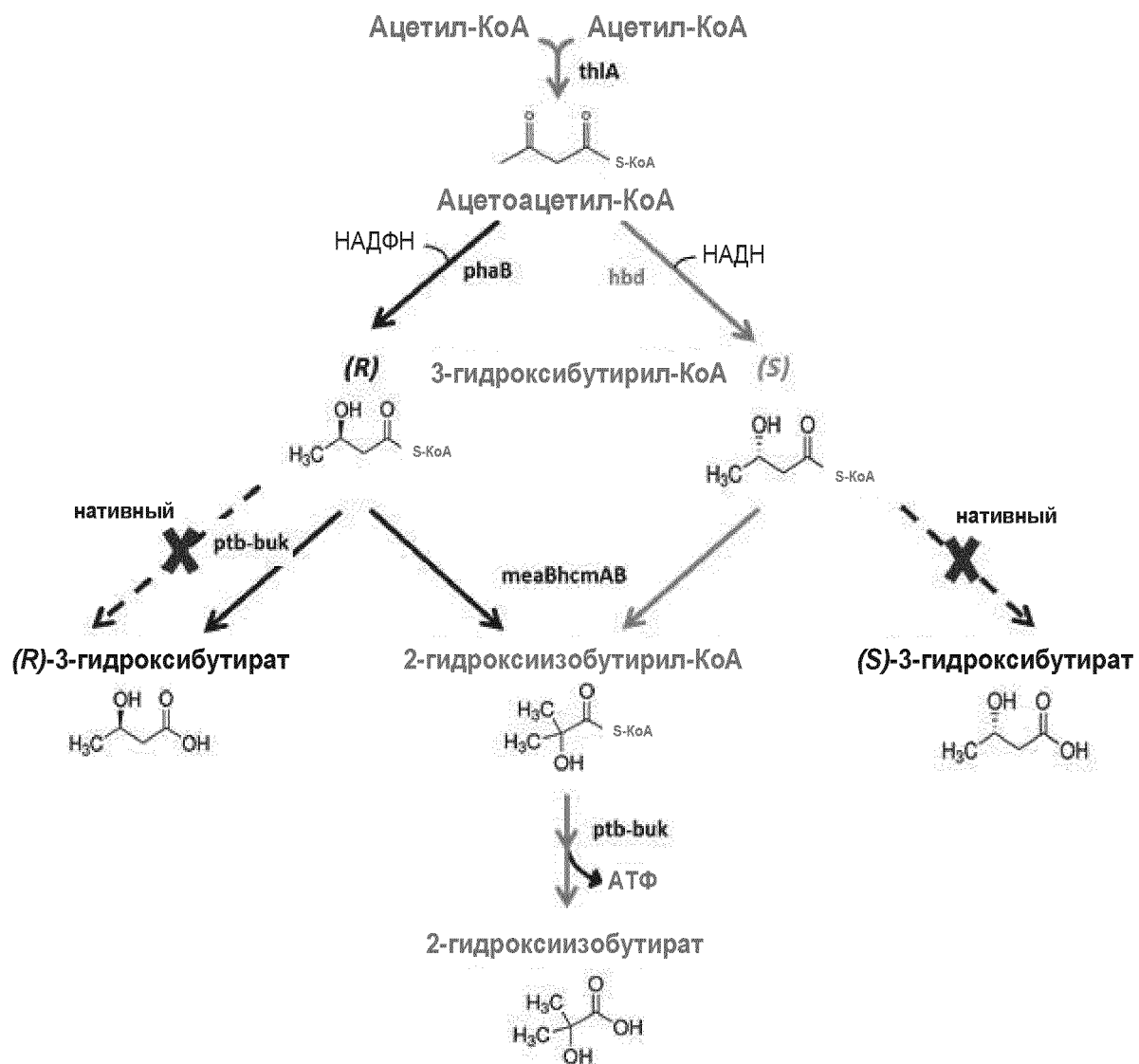
Фиг. 5



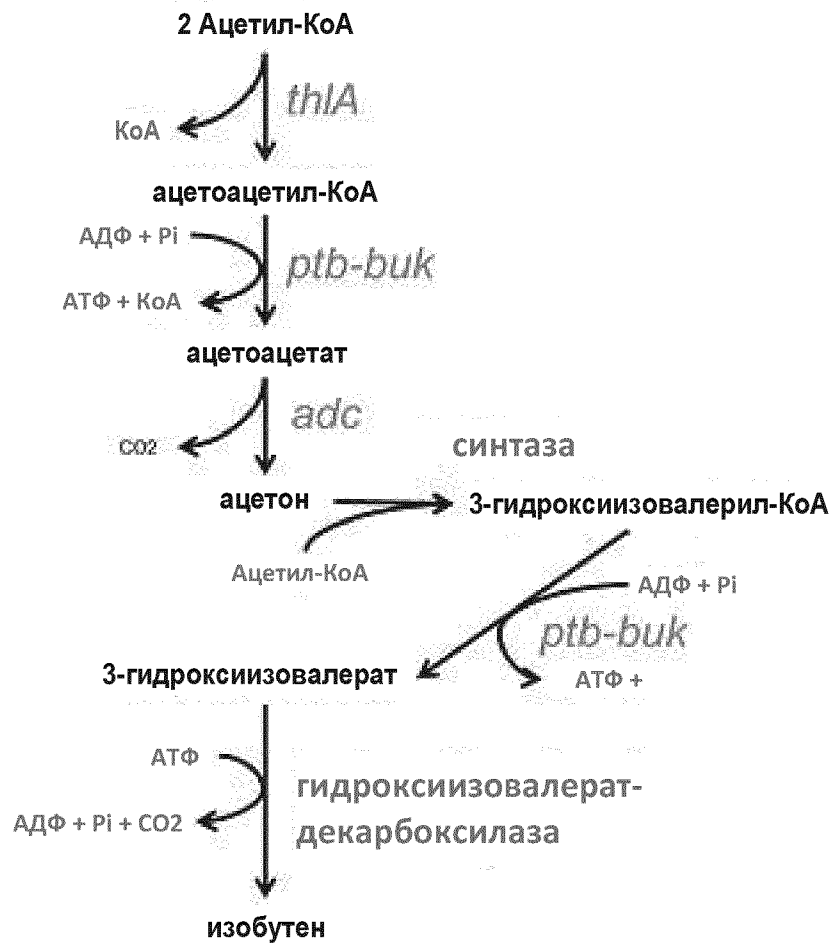
ФИГ. 6



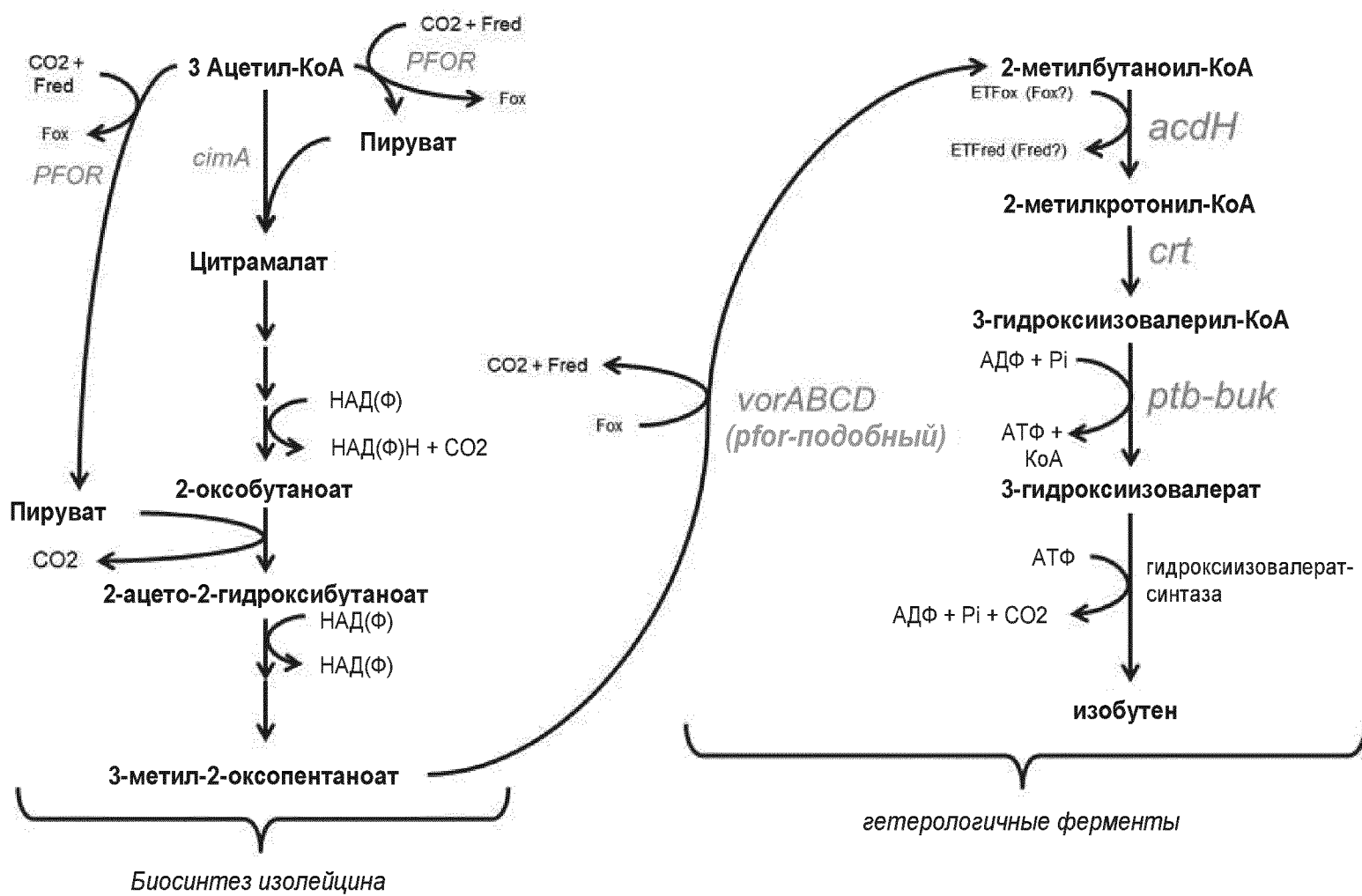
ФИГ. 7



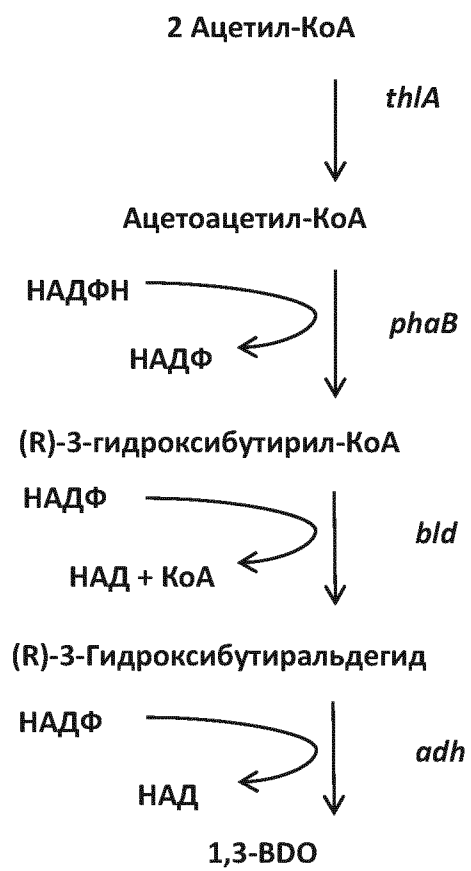
ФИГ. 8



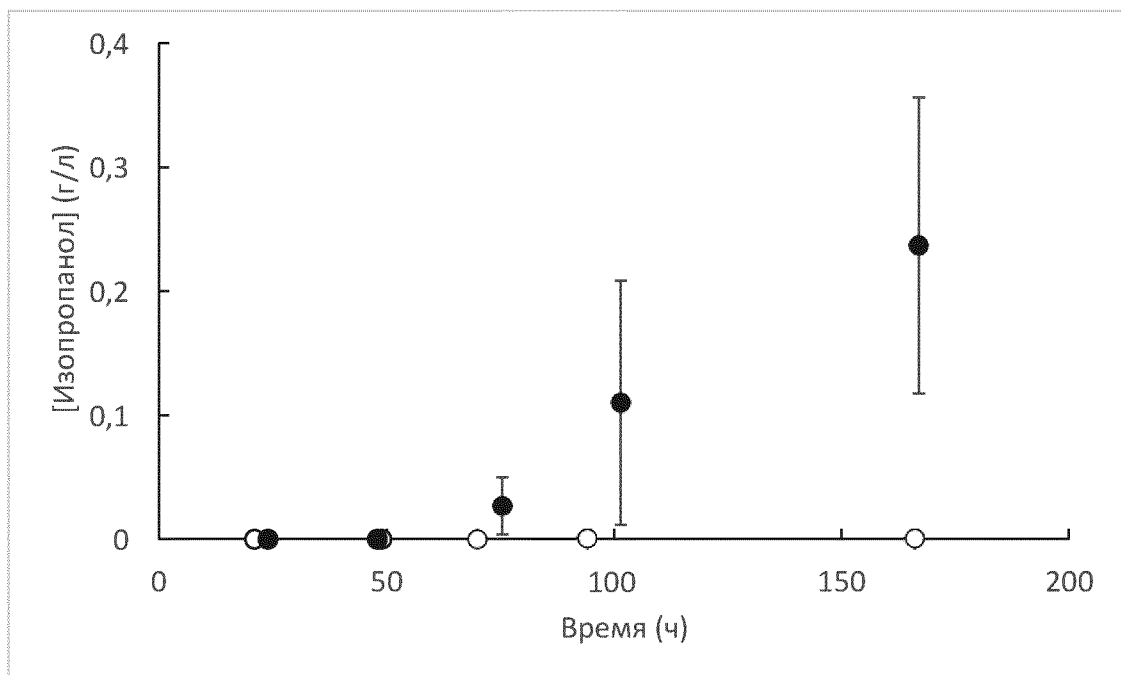
ФИГ. 9



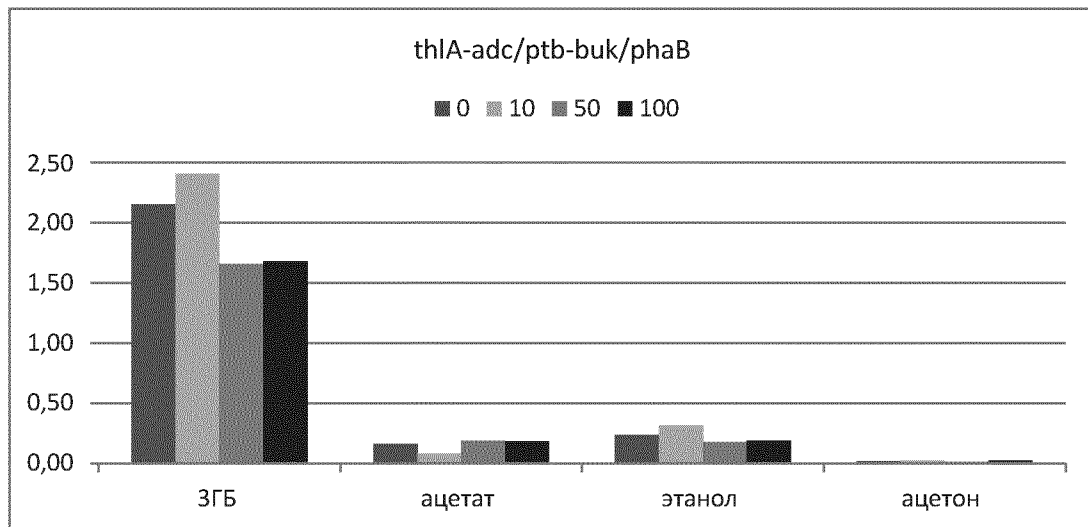
ФИГ. 10



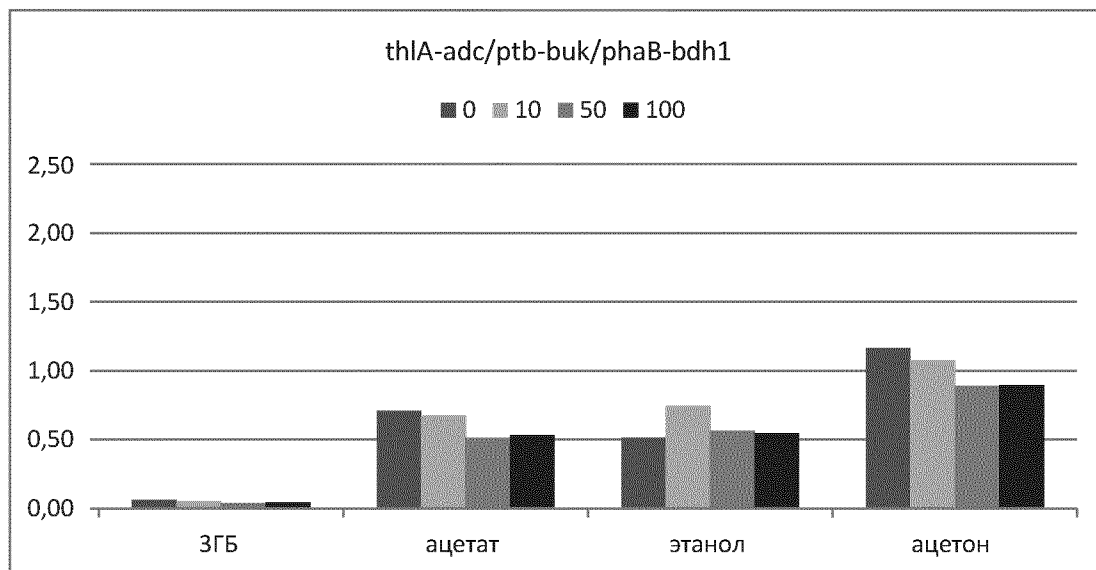
ФИГ. 11



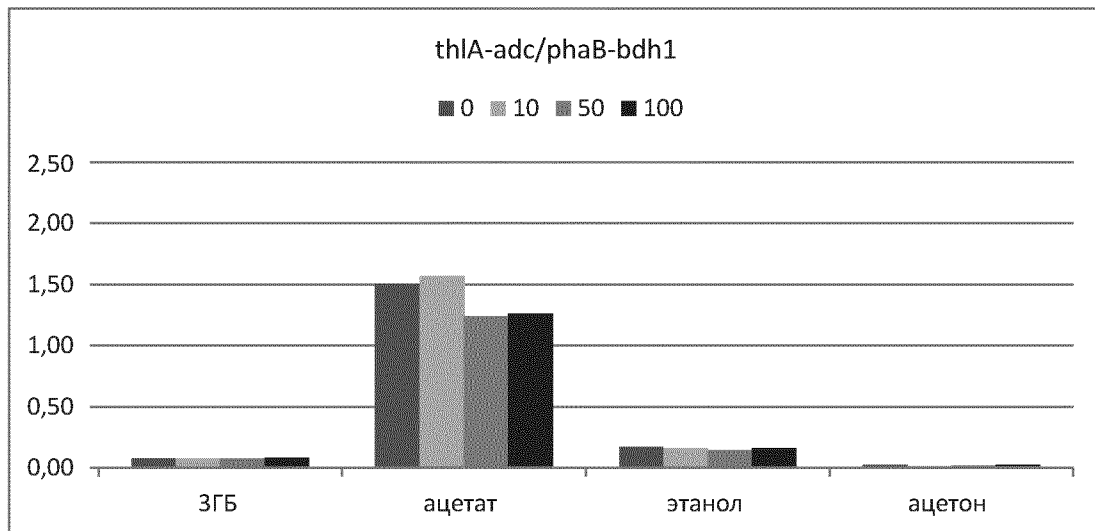
ФИГ. 12



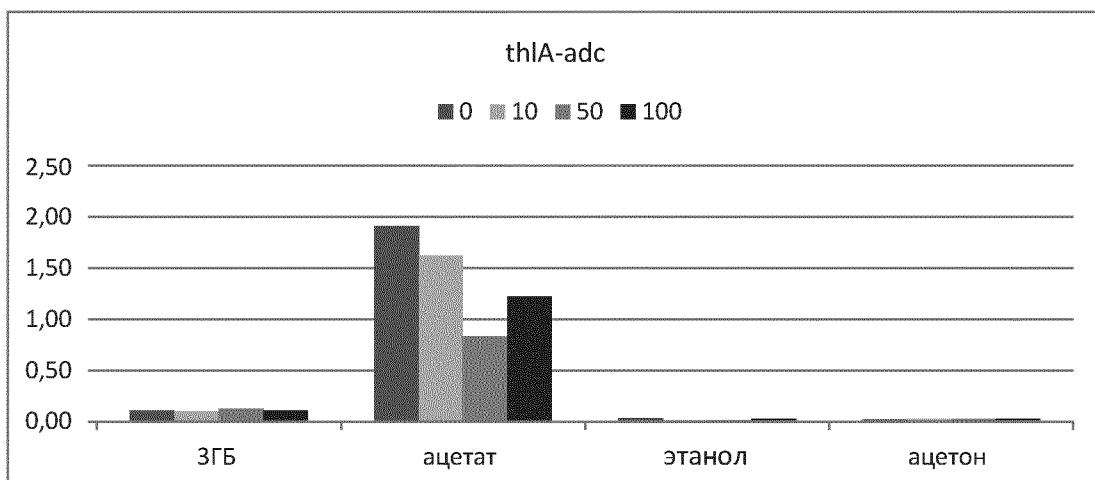
ФИГ. 13А



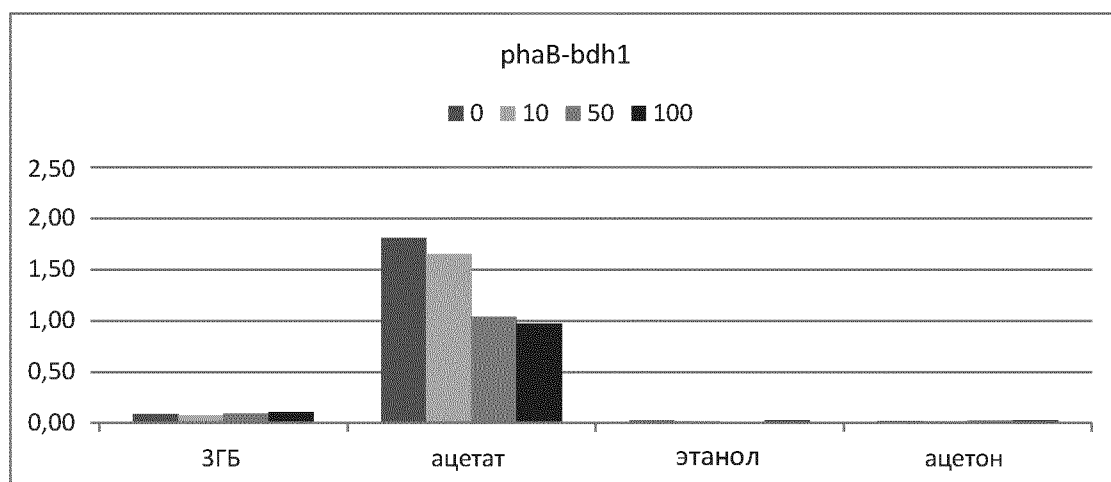
ФИГ. 13В



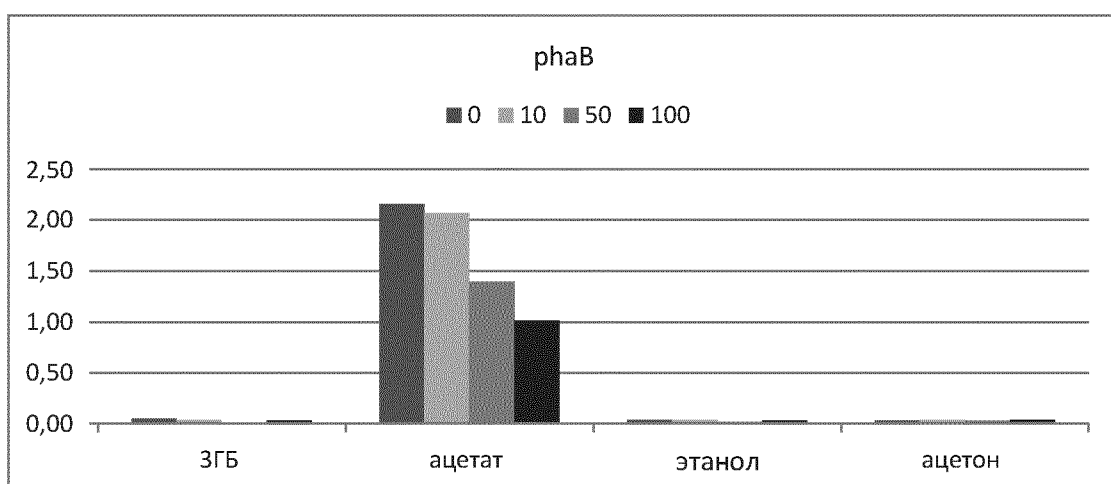
ФИГ. 13С



ФИГ. 13D



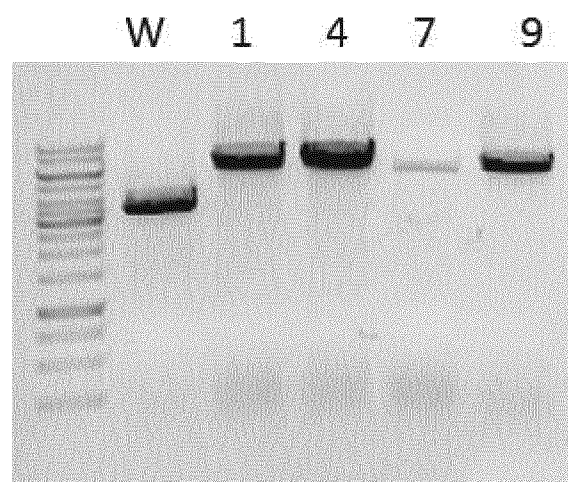
ФИГ. 13Е



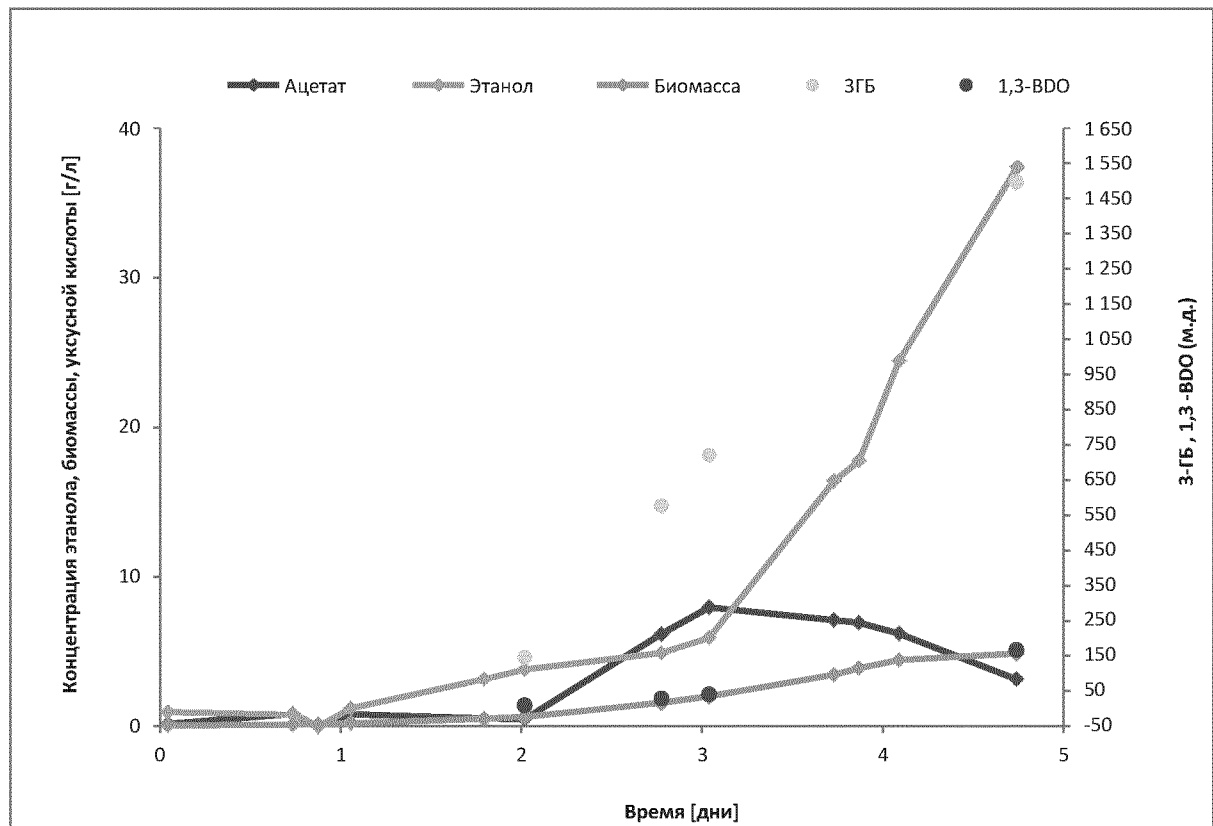
ФИГ. 13F



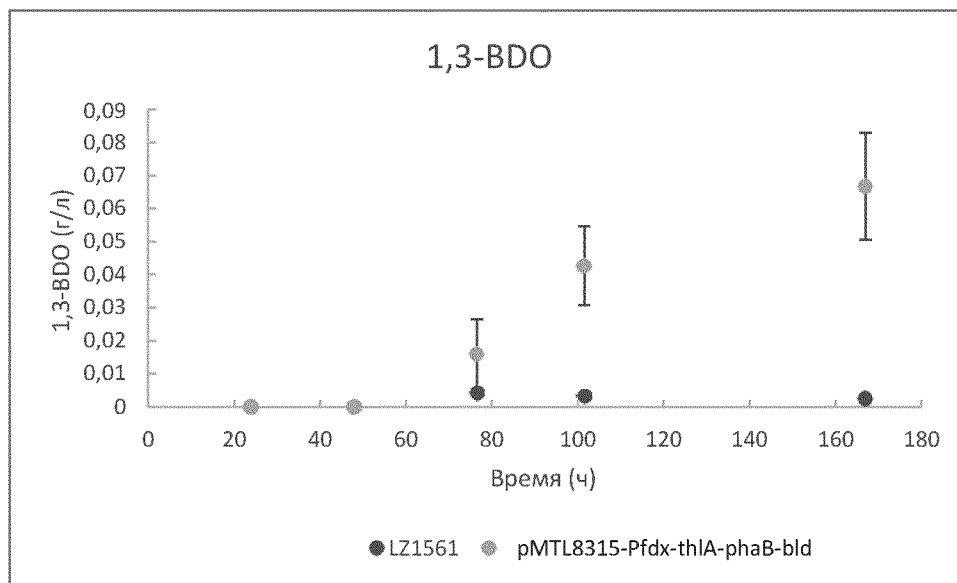
ФИГ. 14



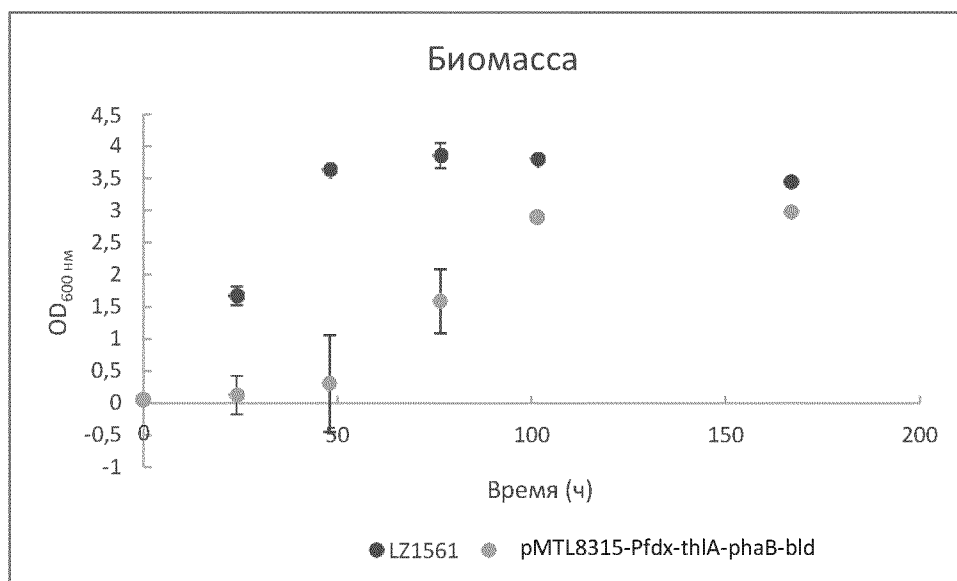
ФИГ. 15



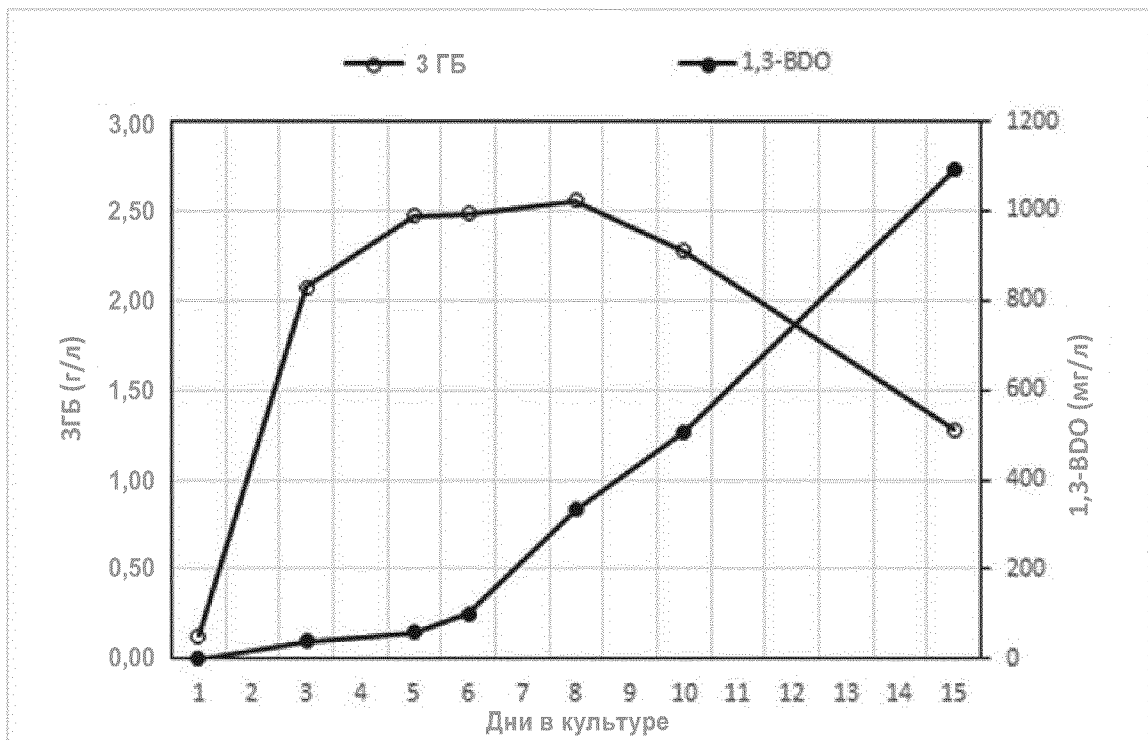
ФИГ. 16



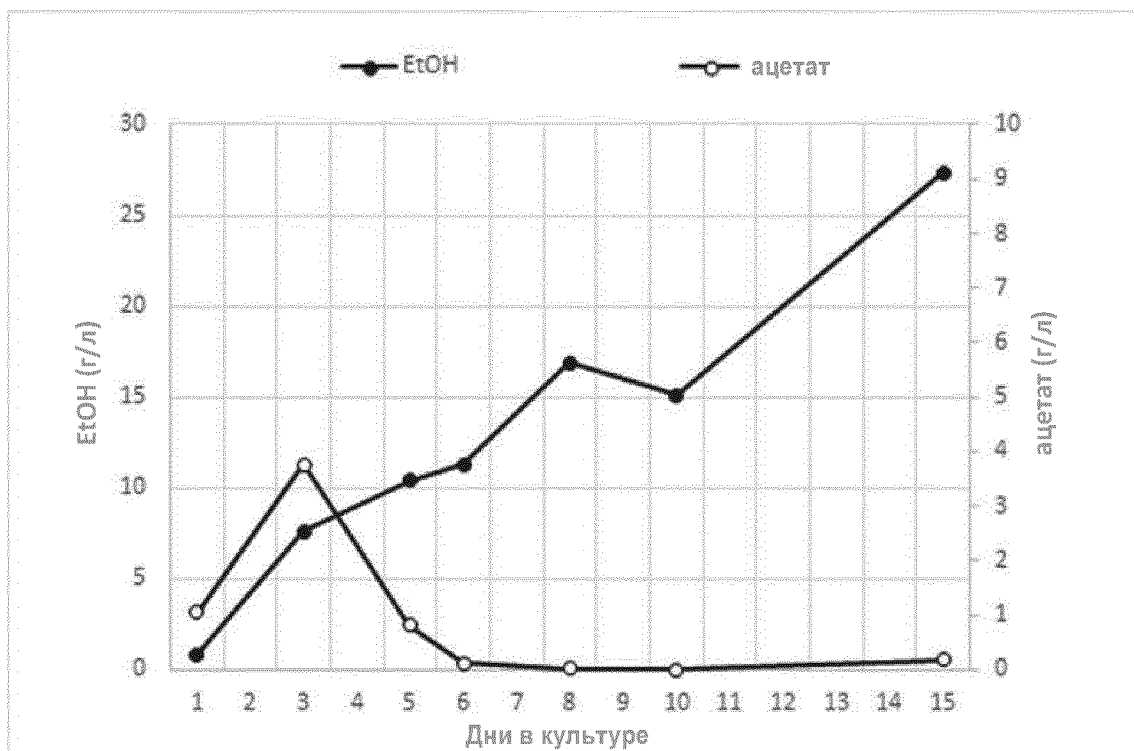
ФИГ. 17А



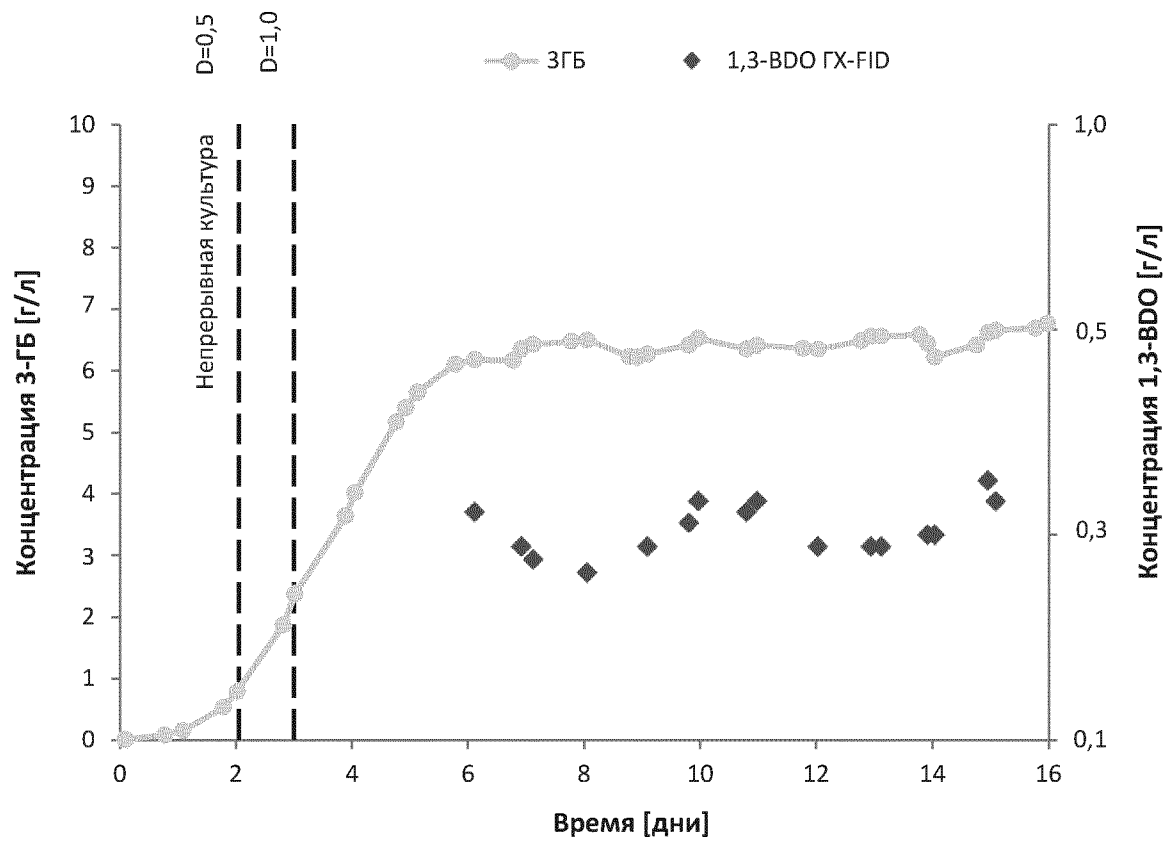
ФИГ. 17В



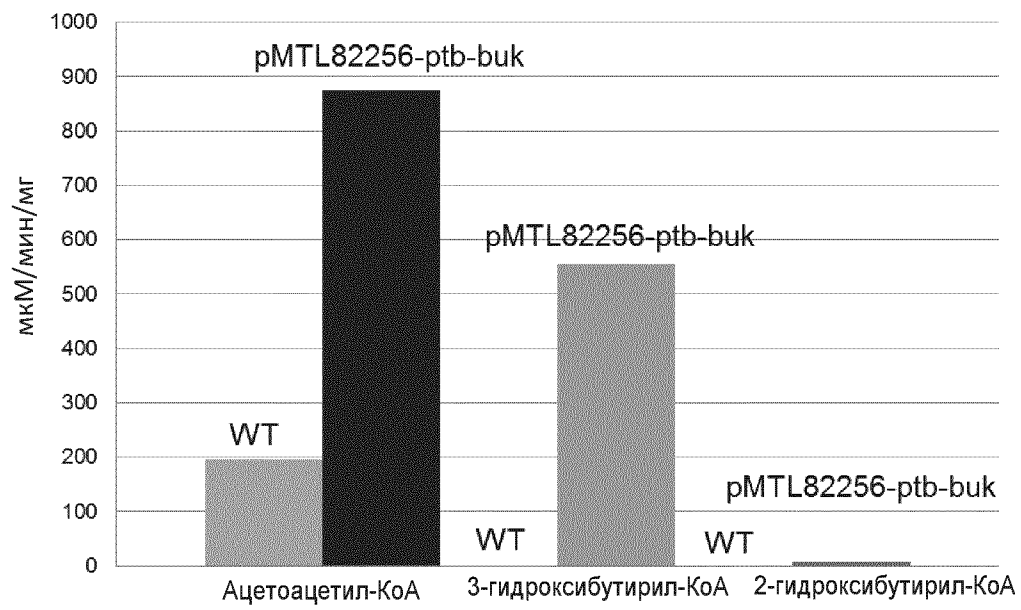
ФИГ. 18А



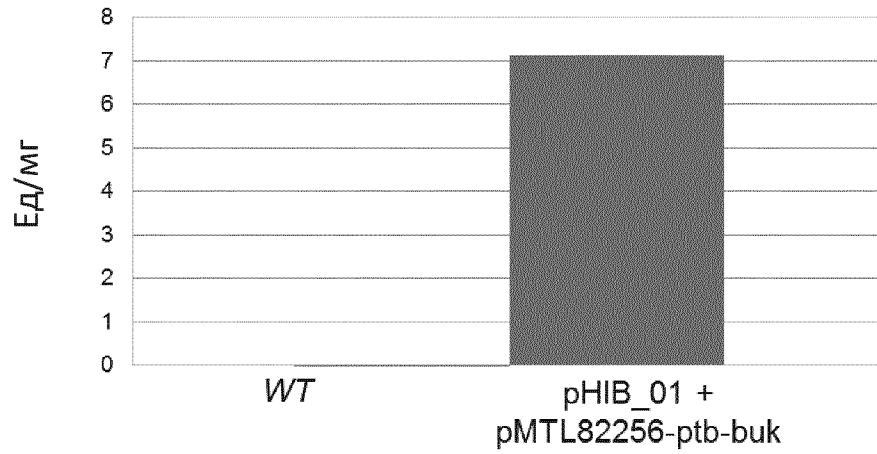
ФИГ. 18В



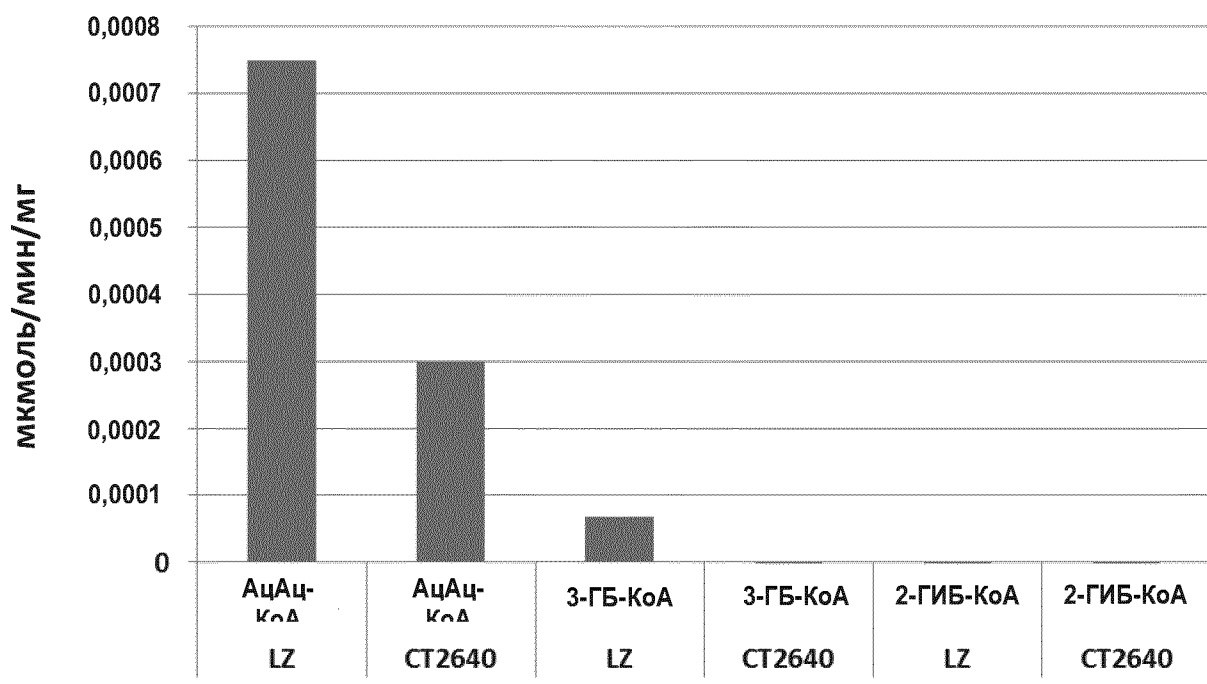
ФИГ. 19



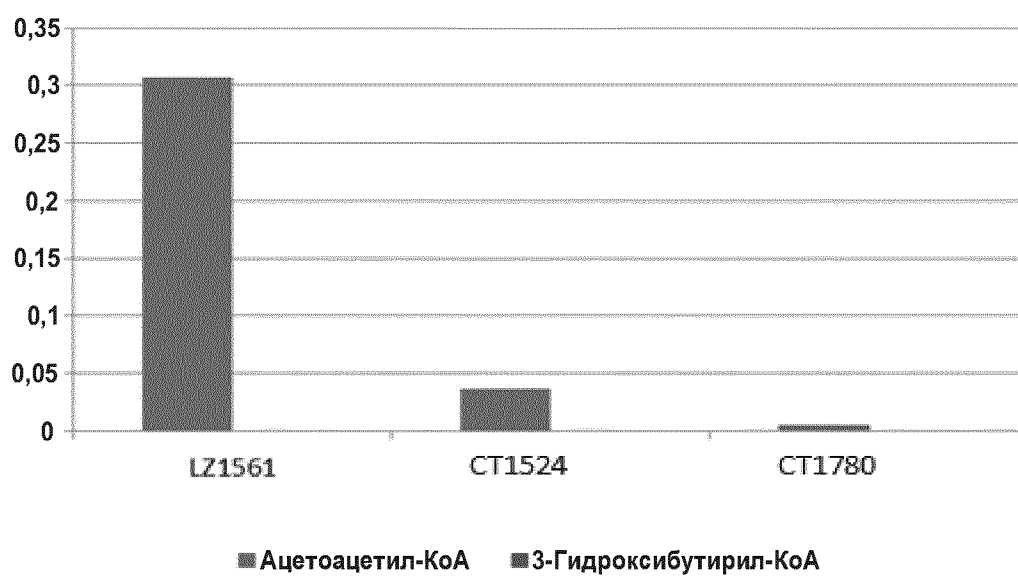
ФИГ. 20А



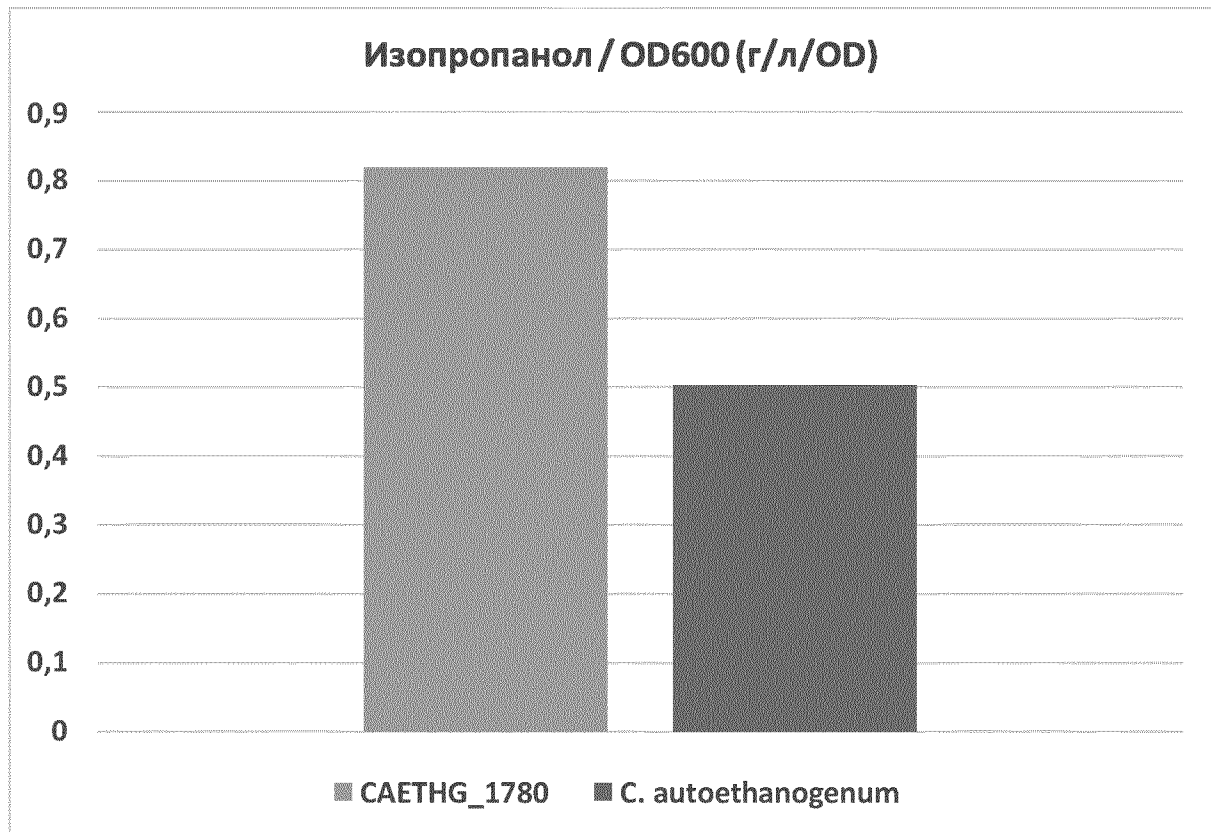
ФИГ. 20В



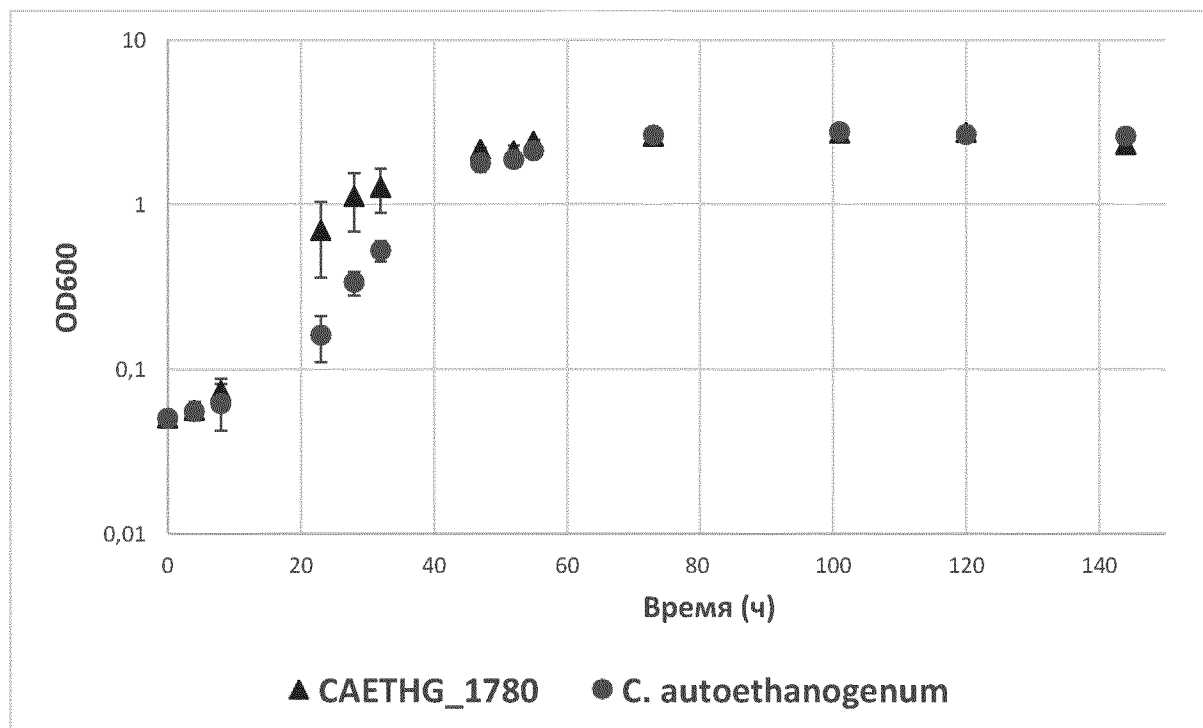
ФИГ. 21А



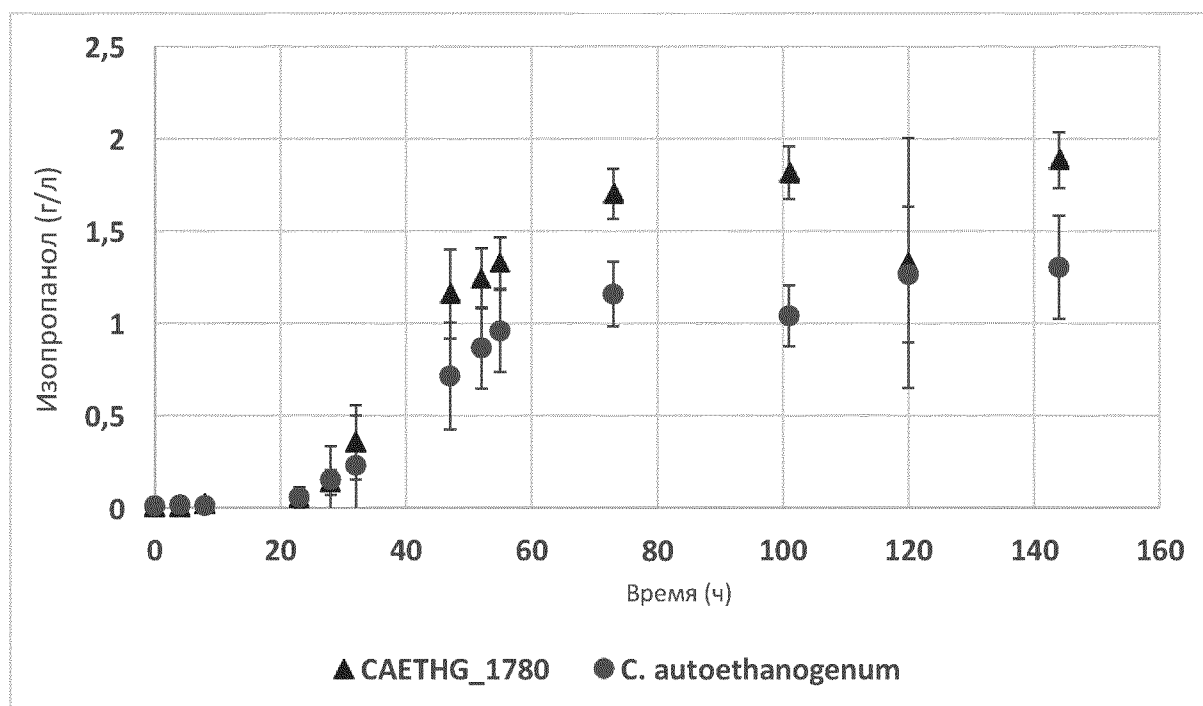
ФИГ. 21В



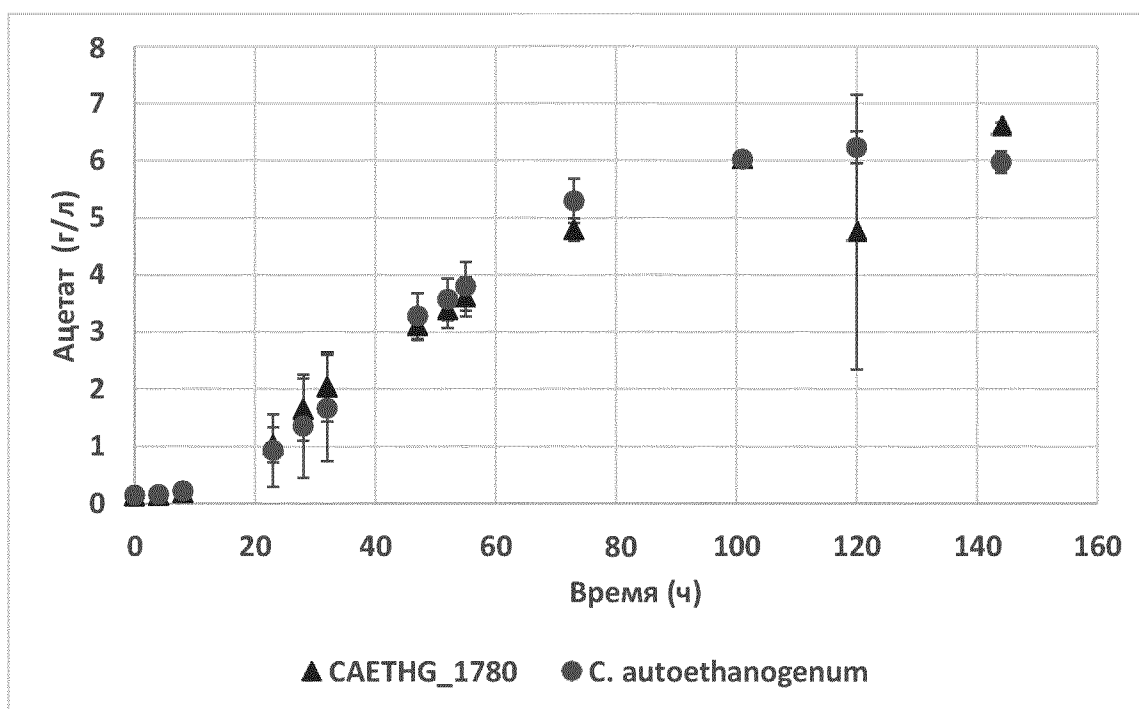
ФИГ. 22



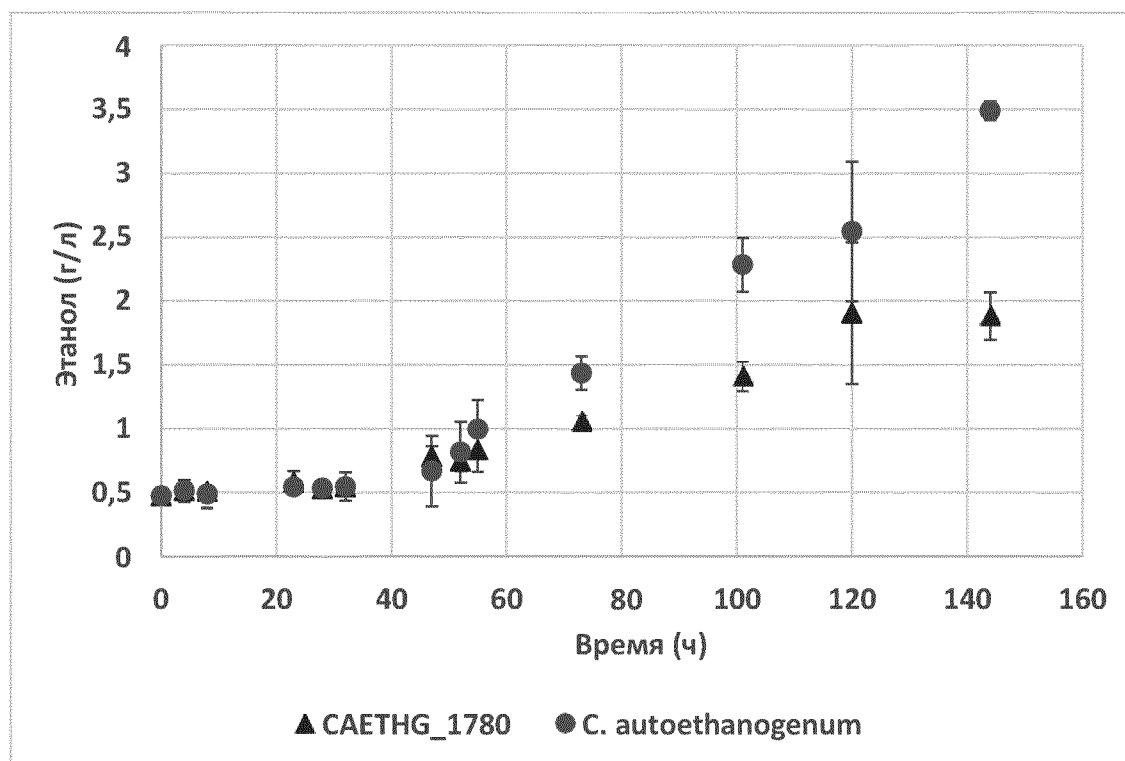
ФИГ. 23А



ФИГ. 23В



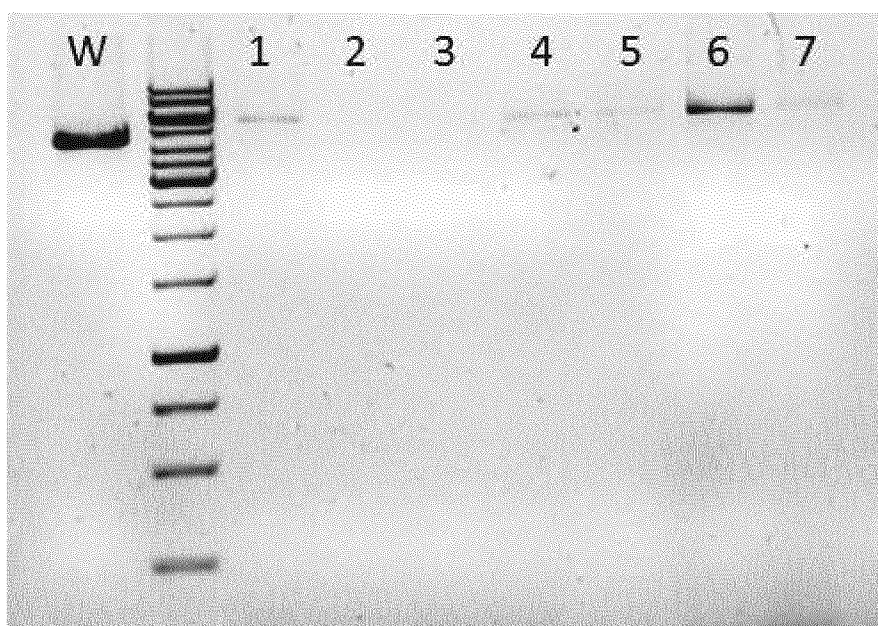
ФИГ. 23С



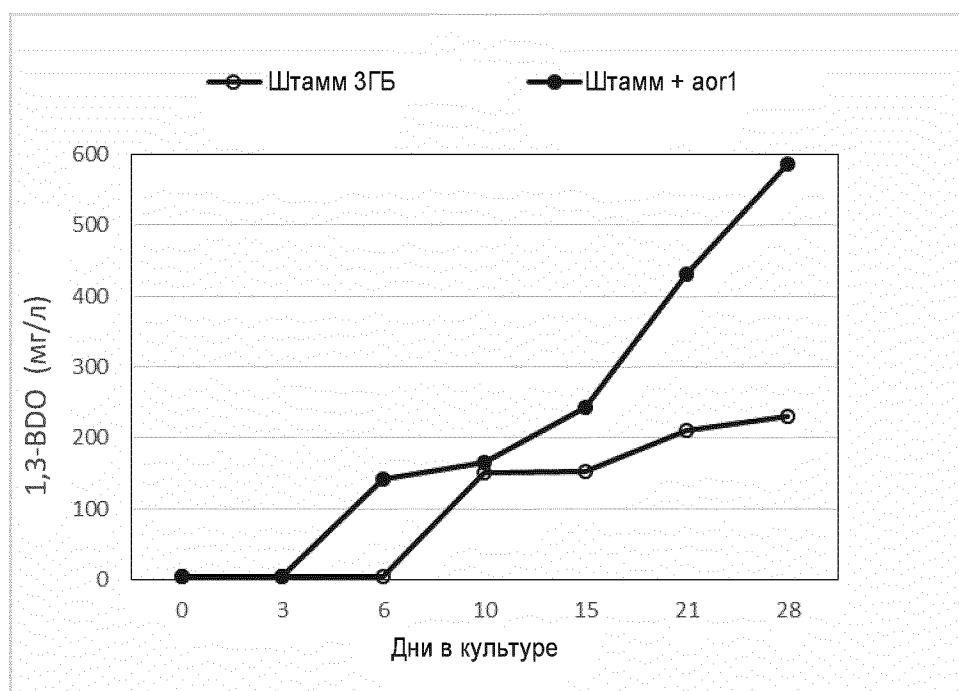
ФИГ. 23D



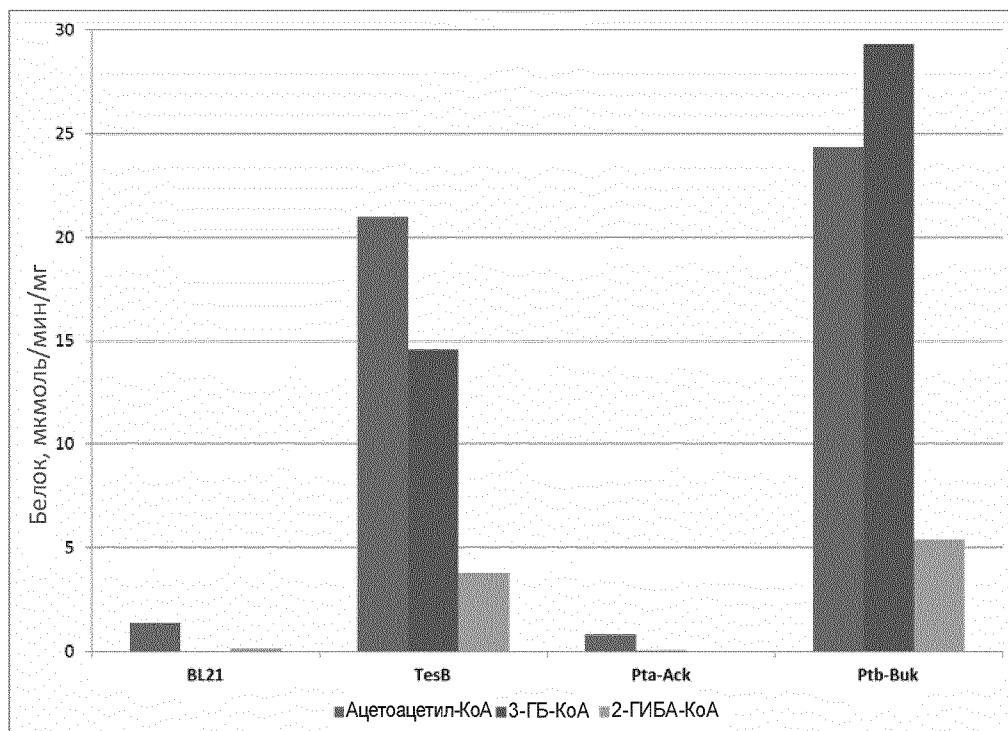
ФИГ. 24



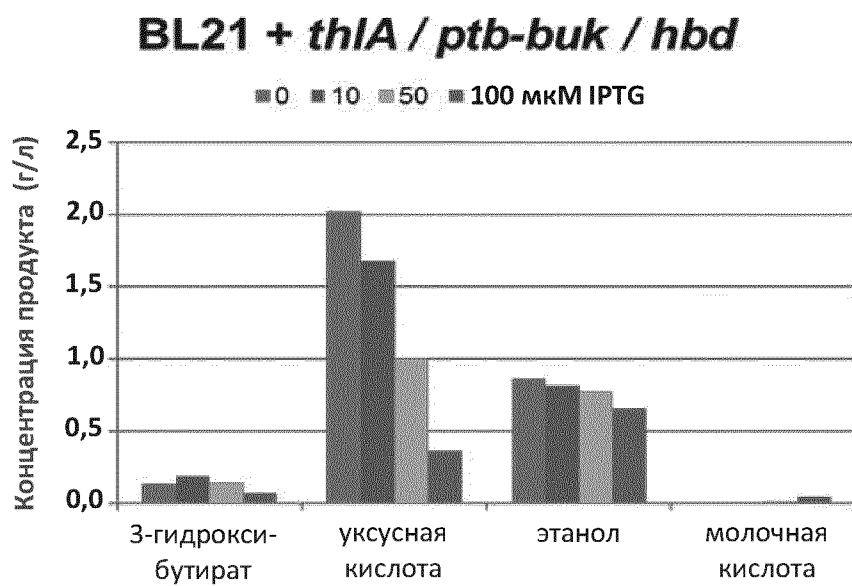
ФИГ. 25



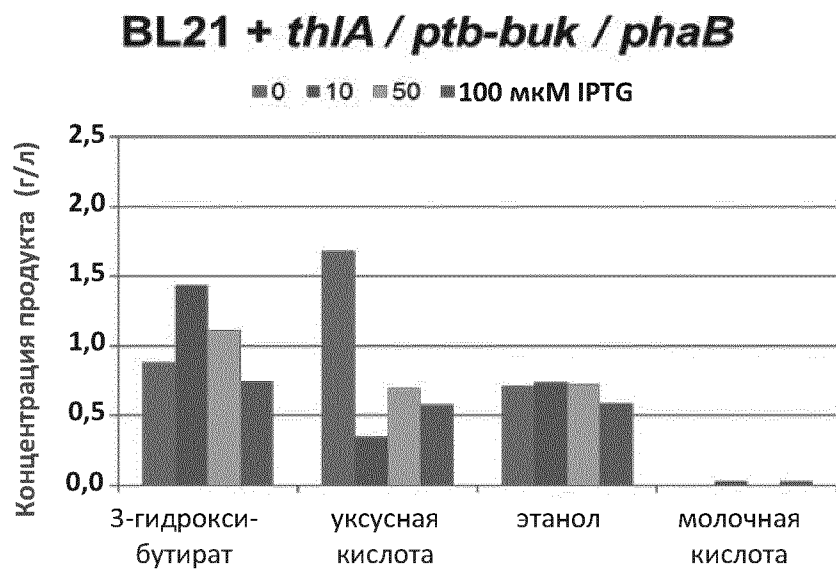
ФИГ. 26



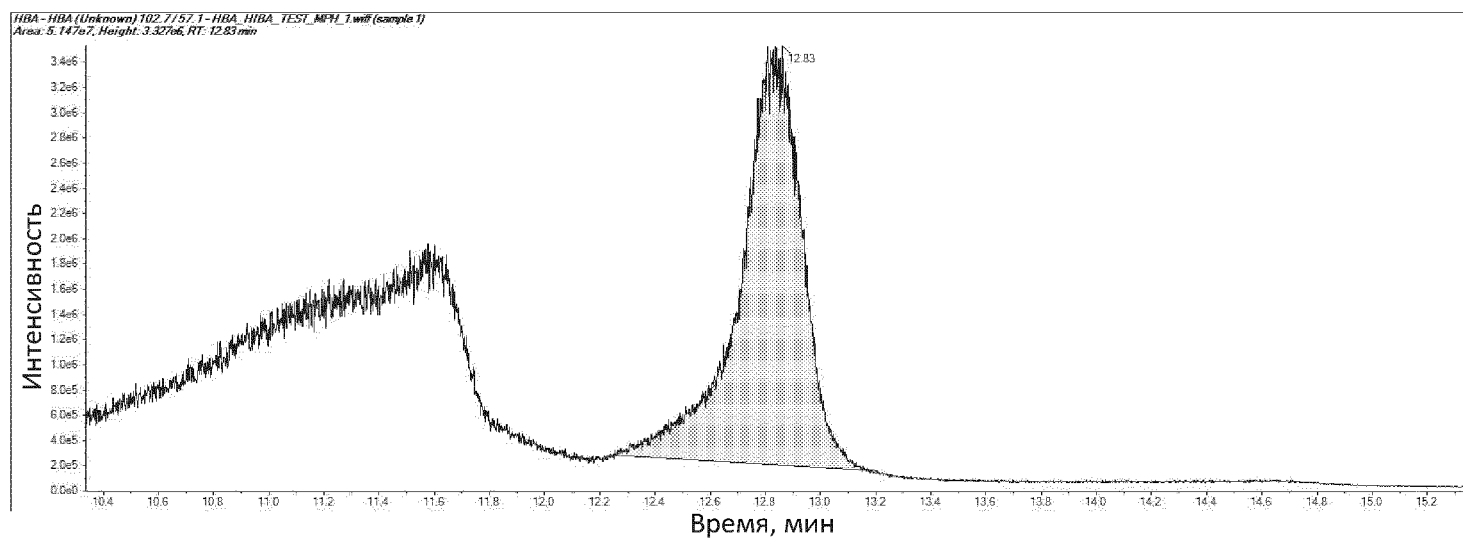
ФИГ. 27



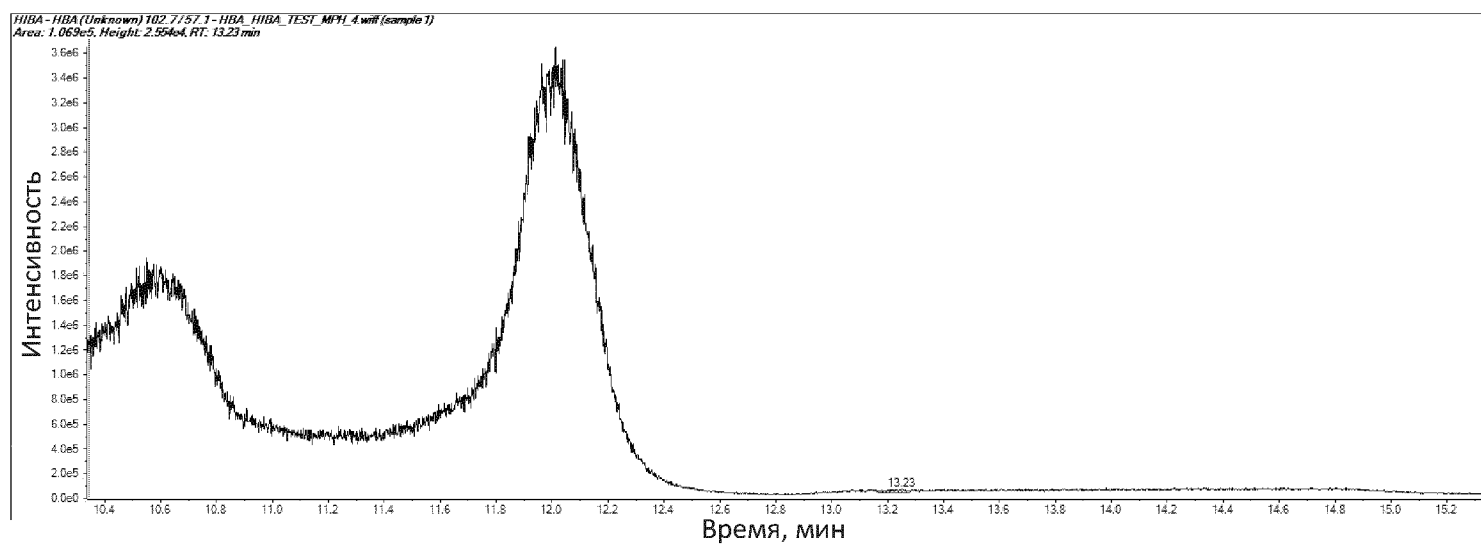
ФИГ. 28А



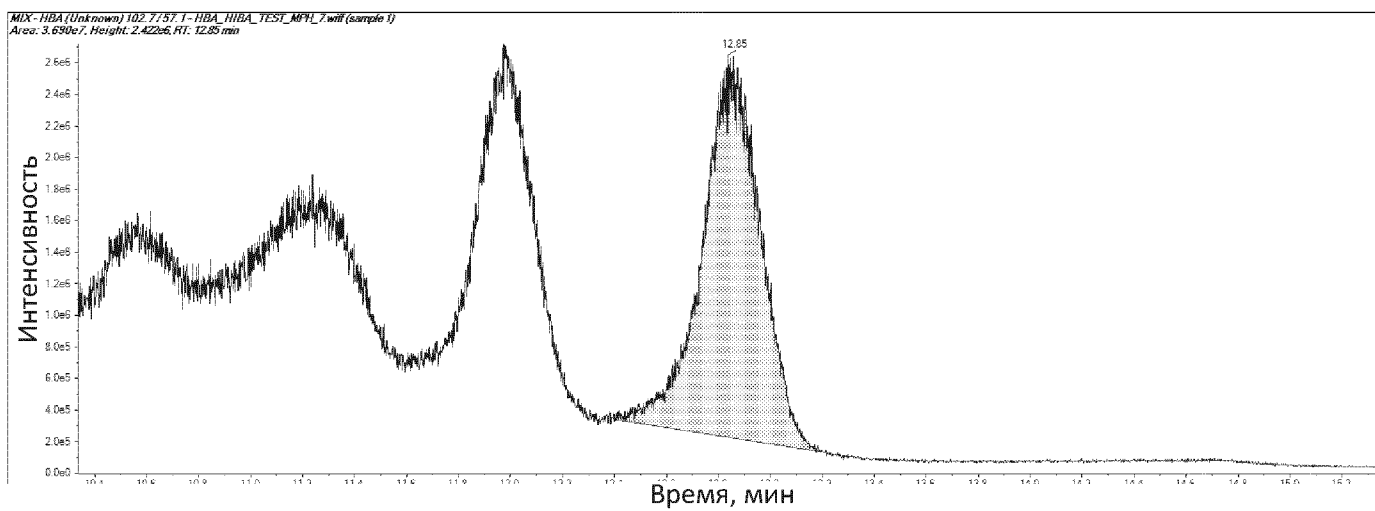
ФИГ. 28В



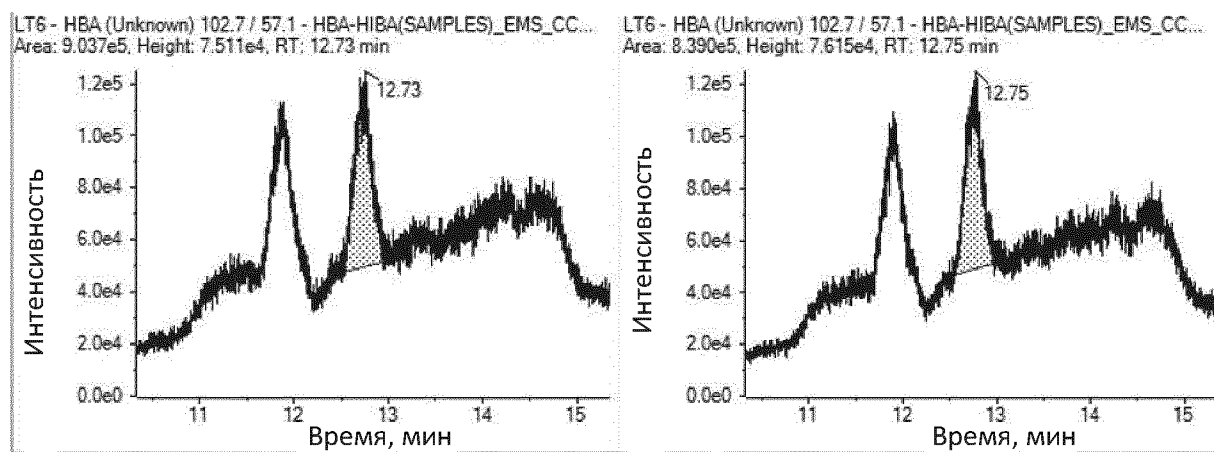
ФИГ. 29А



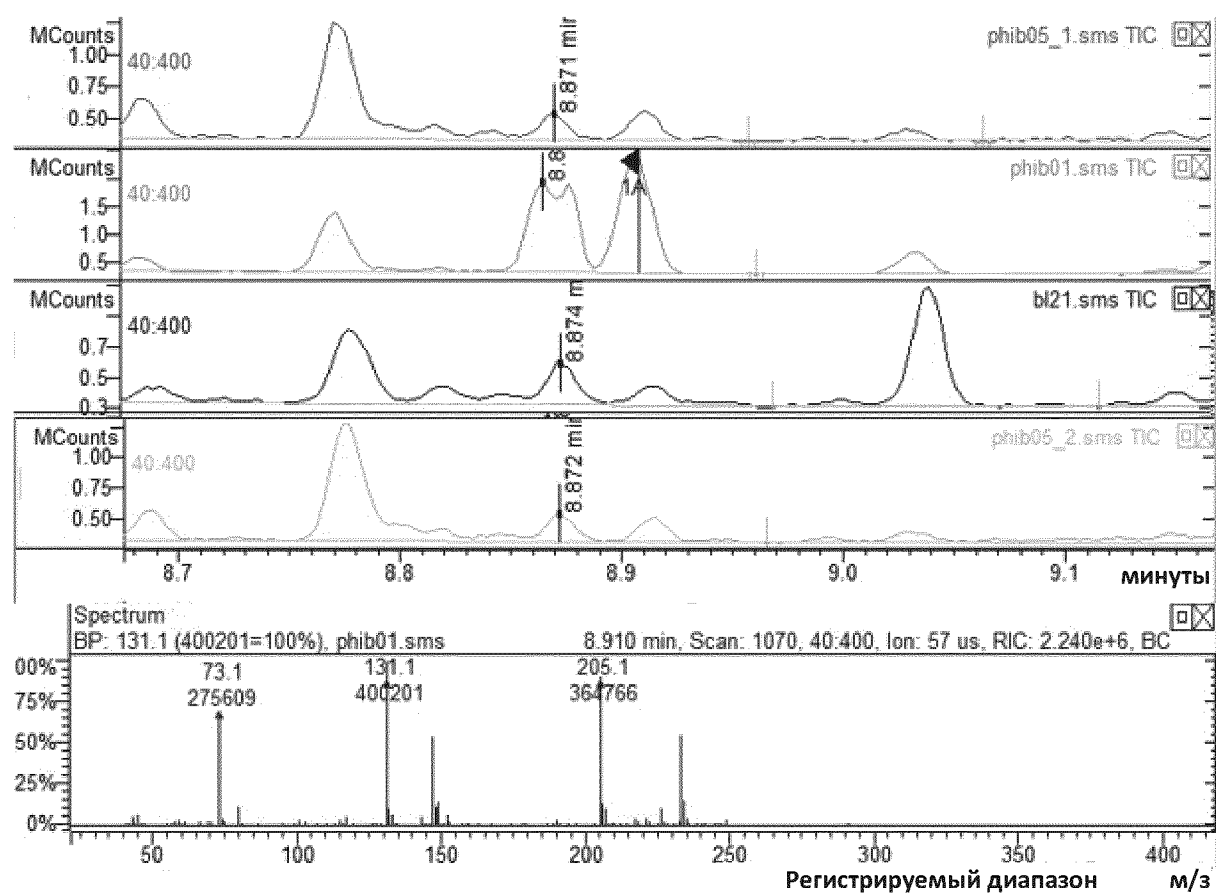
ФИГ. 29В



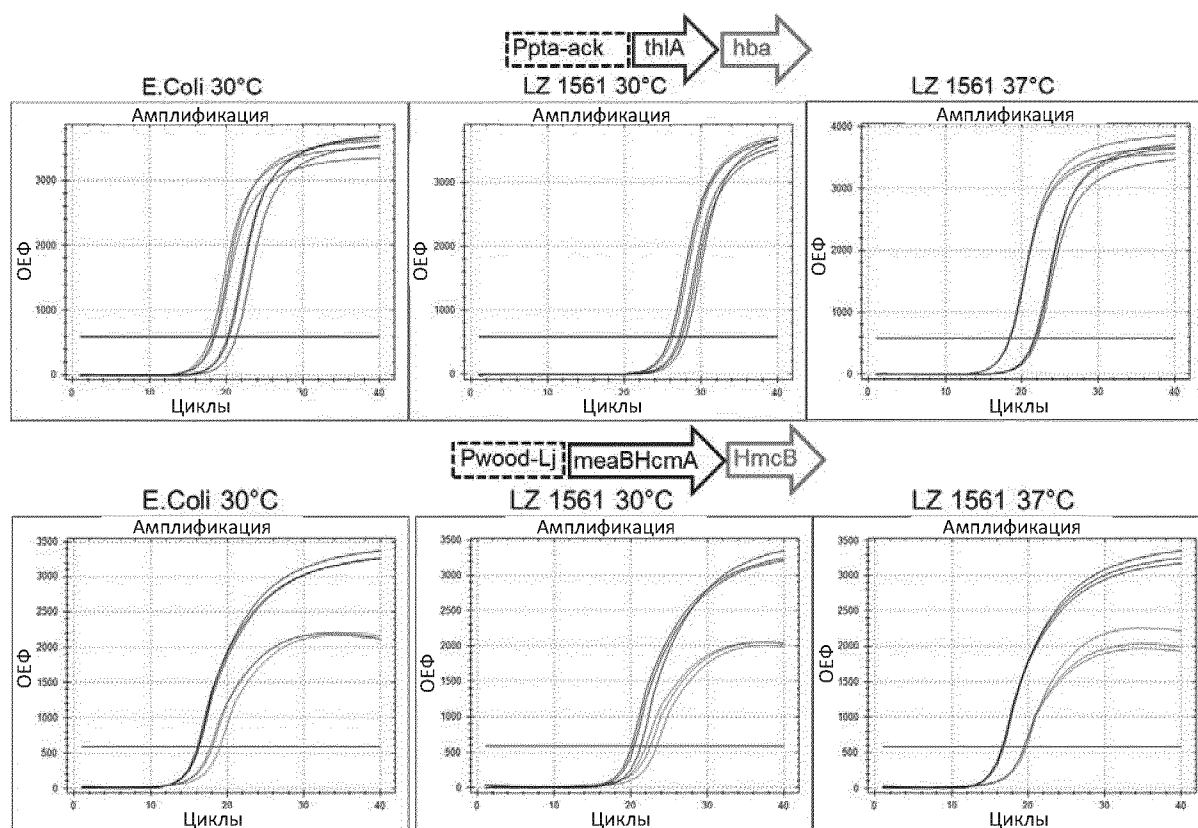
ФИГ. 29С



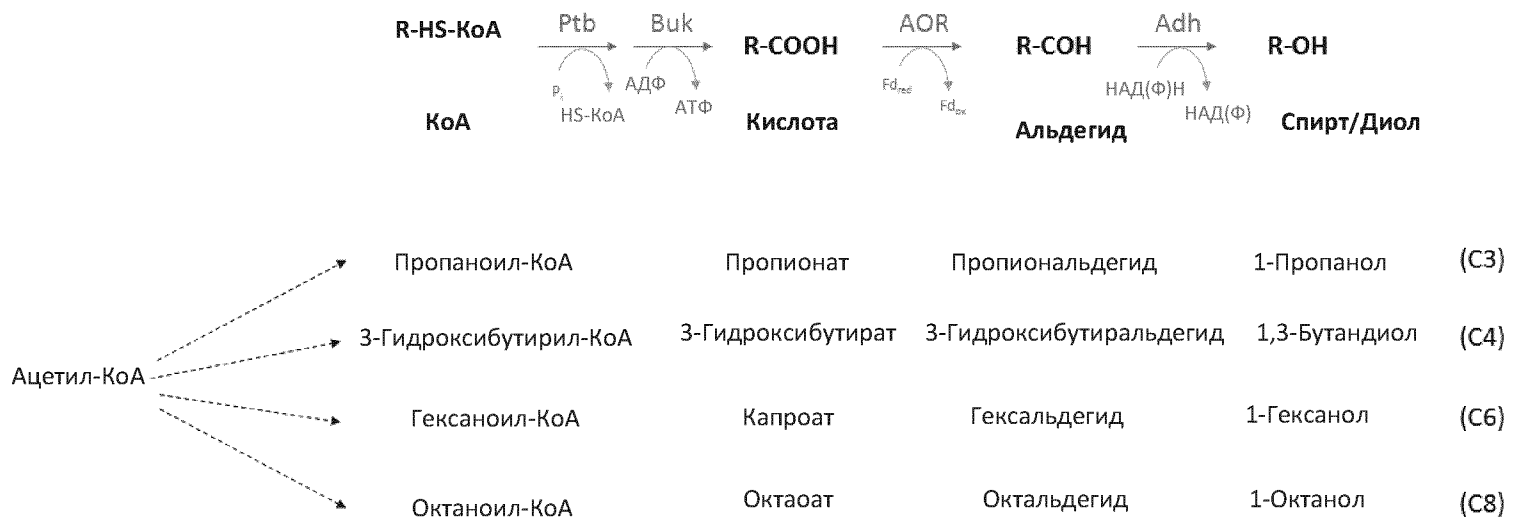
ФИГ. 29D



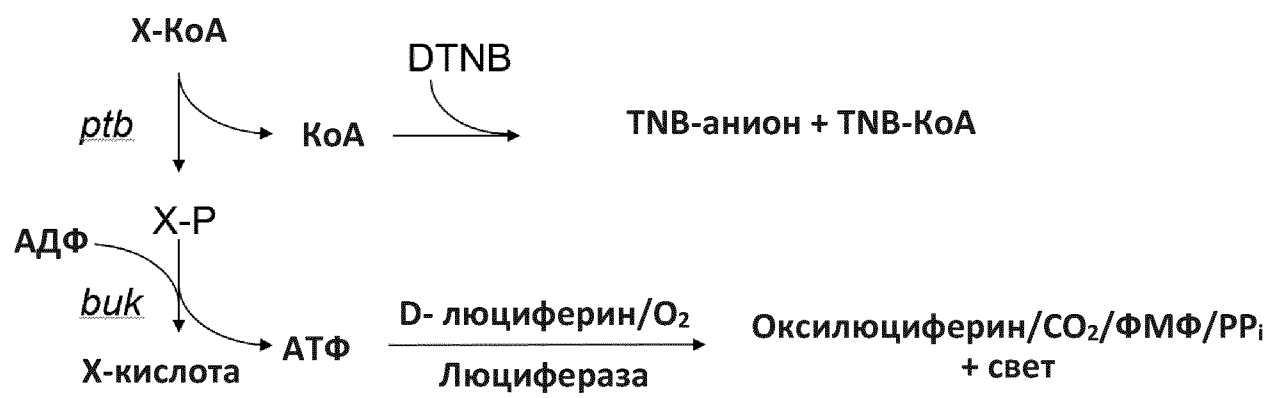
ФИГ. 30



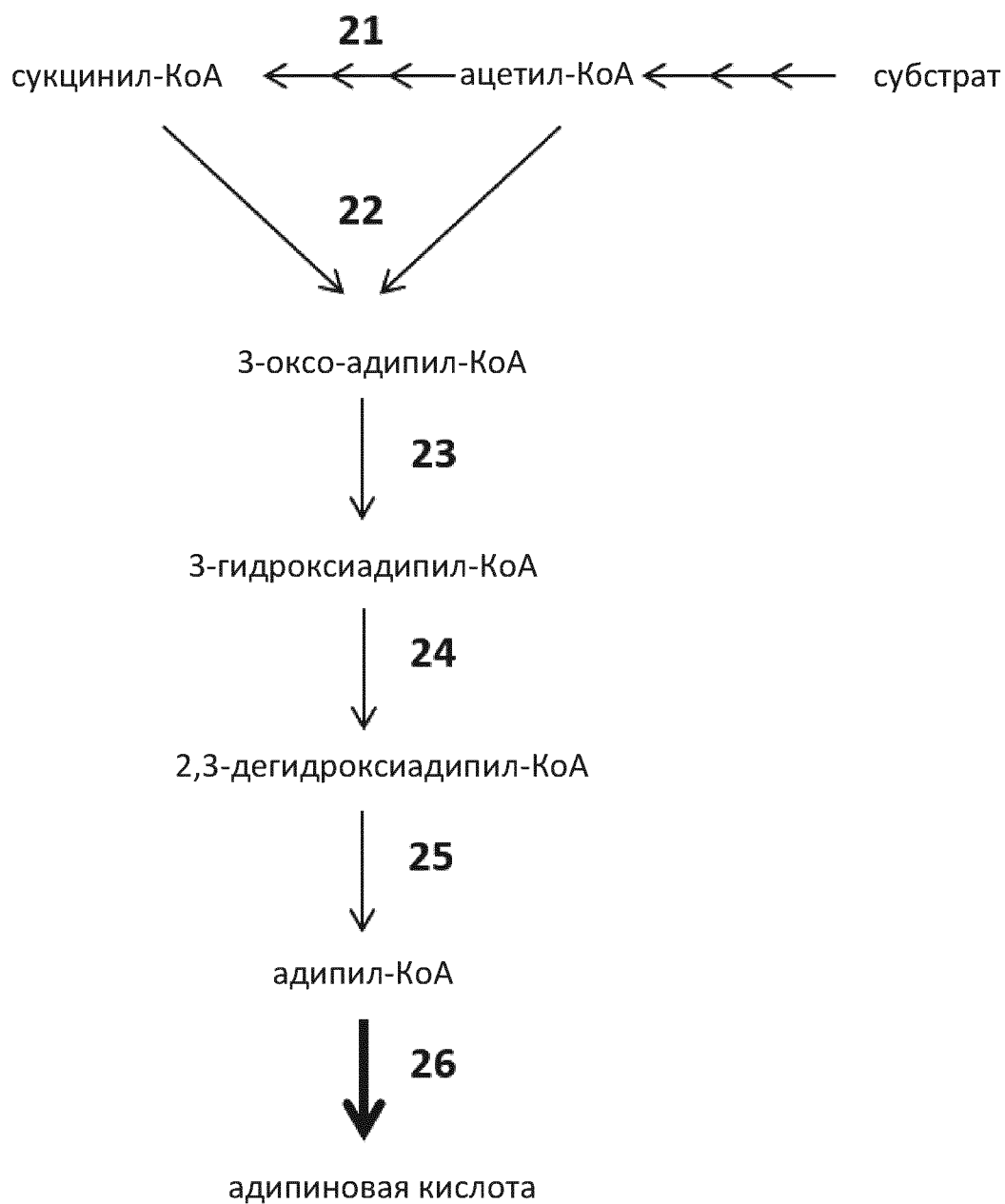
ФИГ. 31



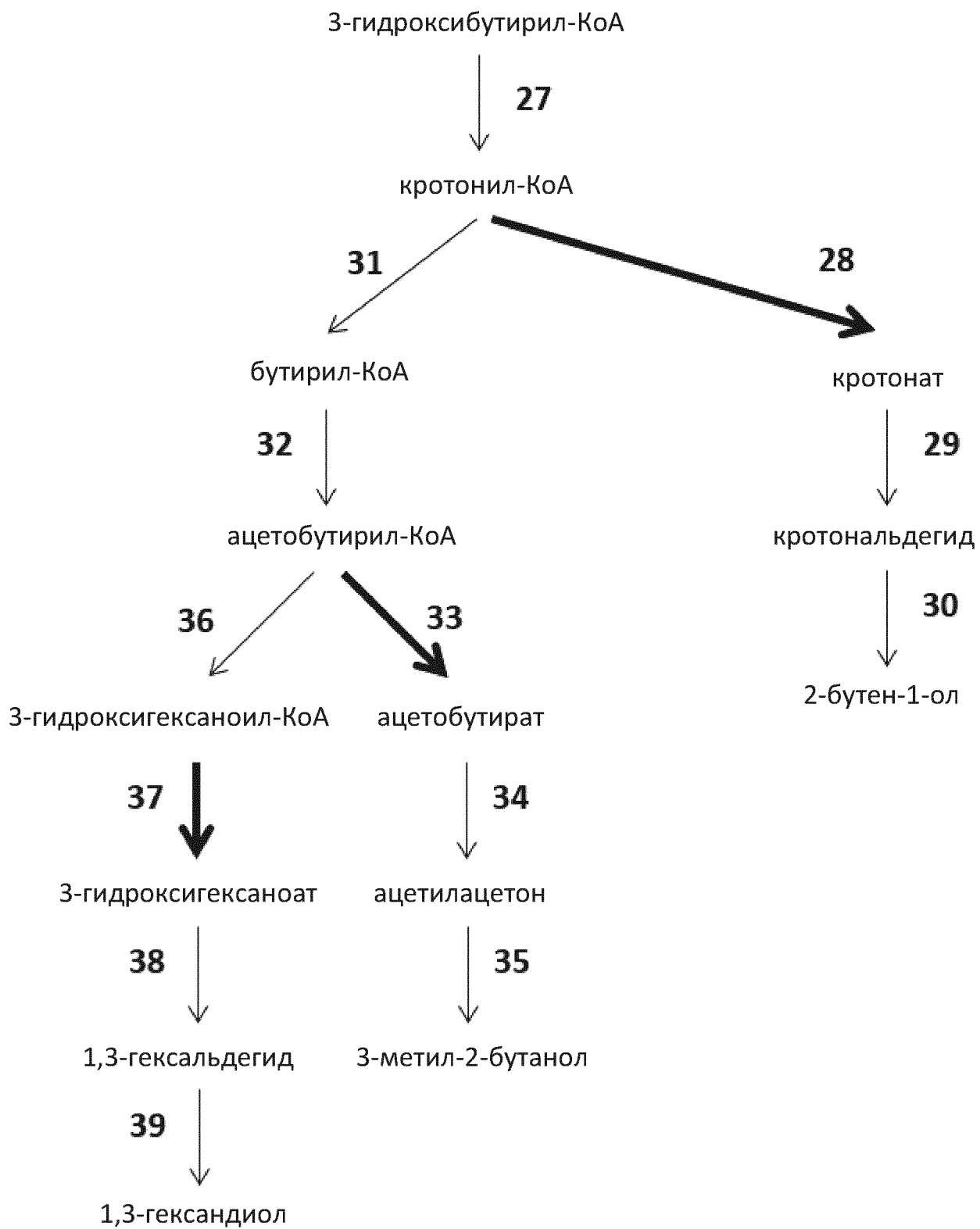
ФИГ. 32



ФИГ. 33



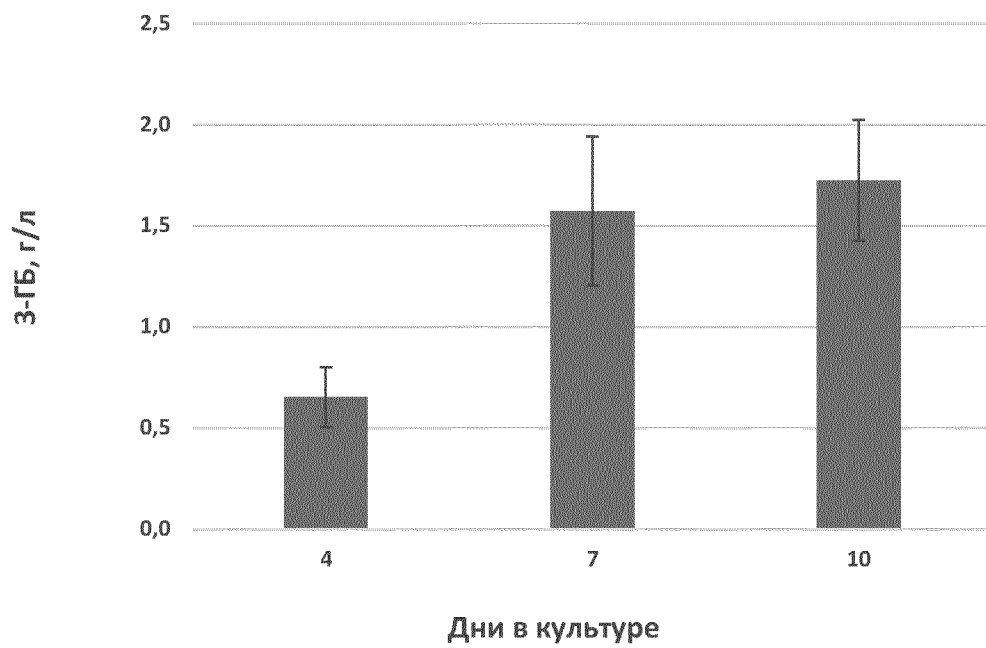
ФИГ. 34



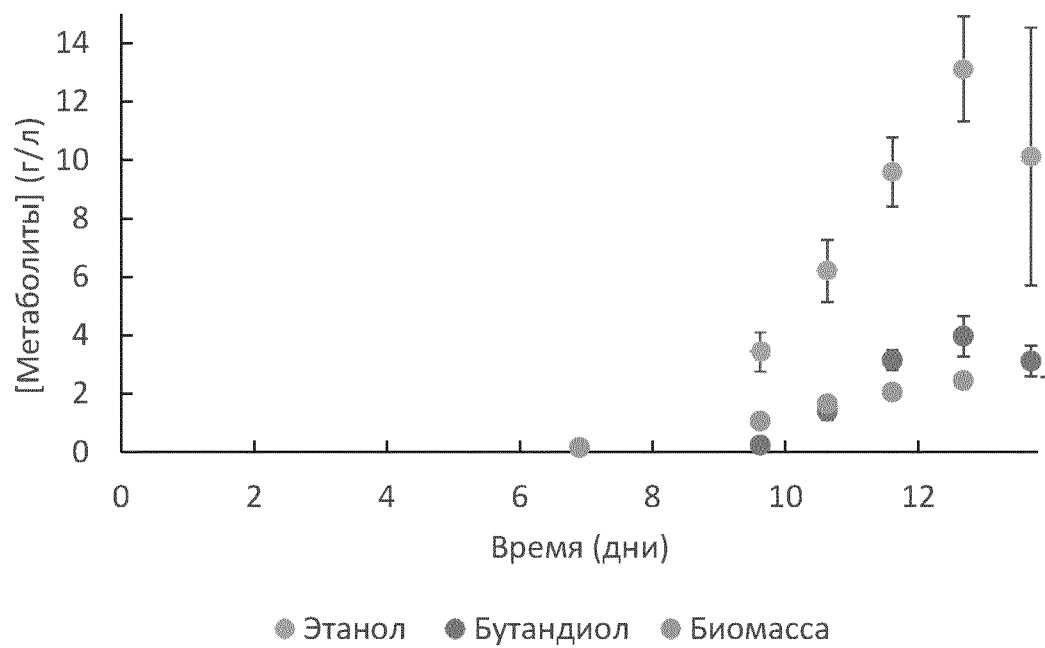
ФИГ. 35



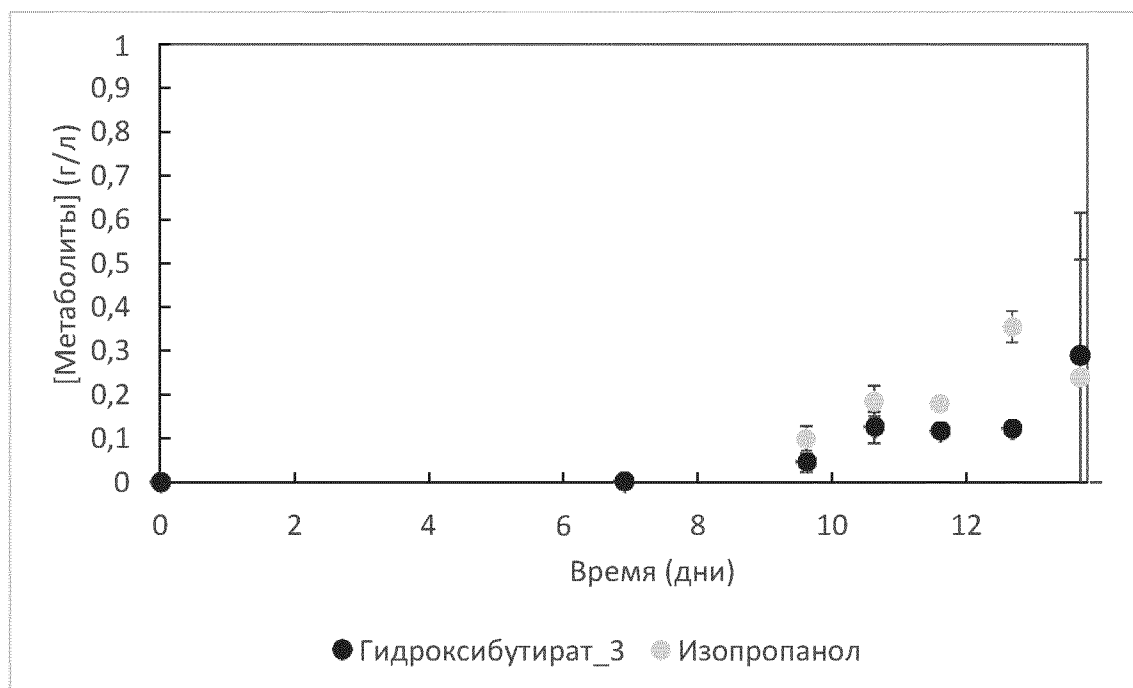
ФИГ. 36



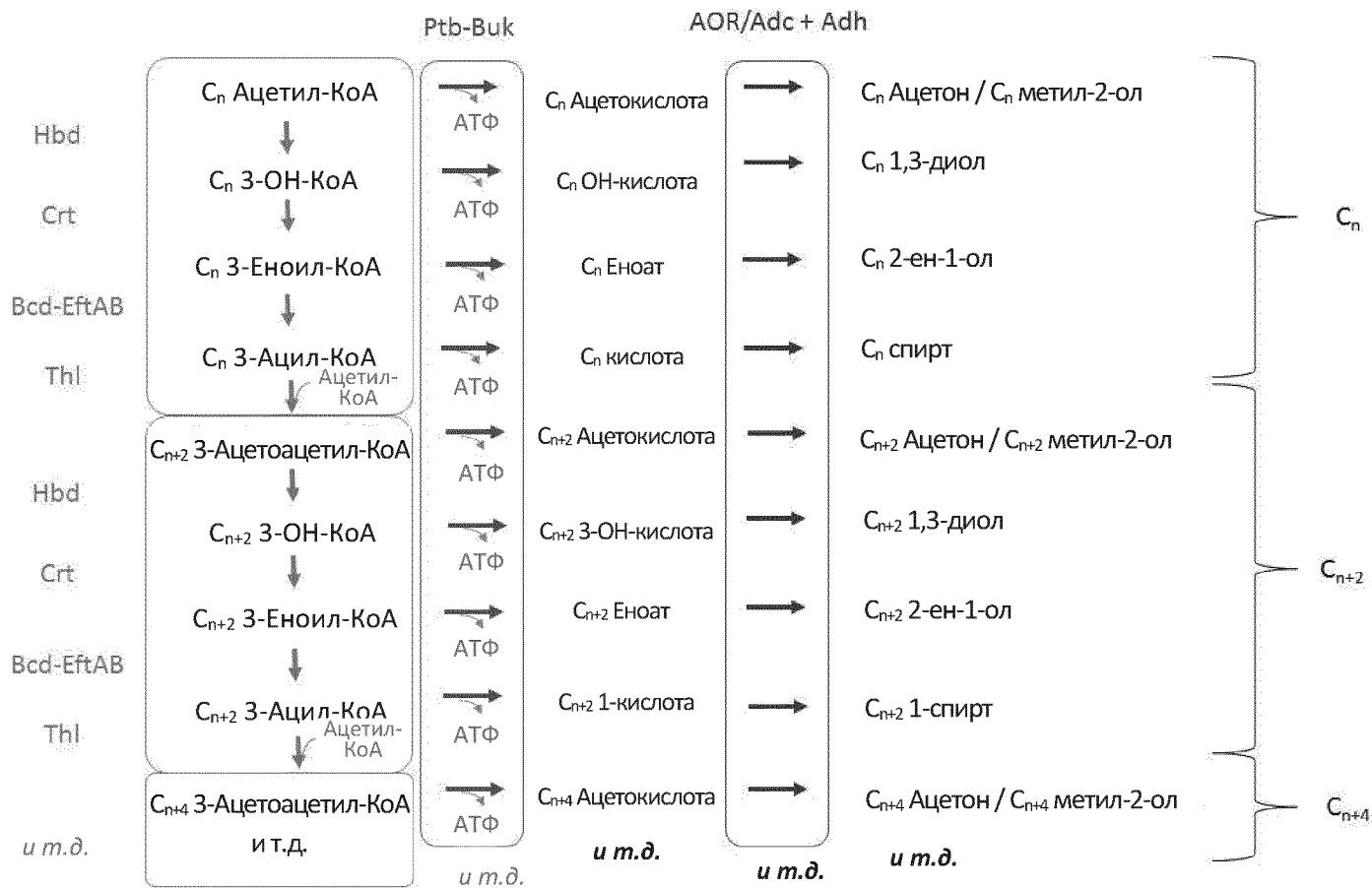
ФИГ. 37



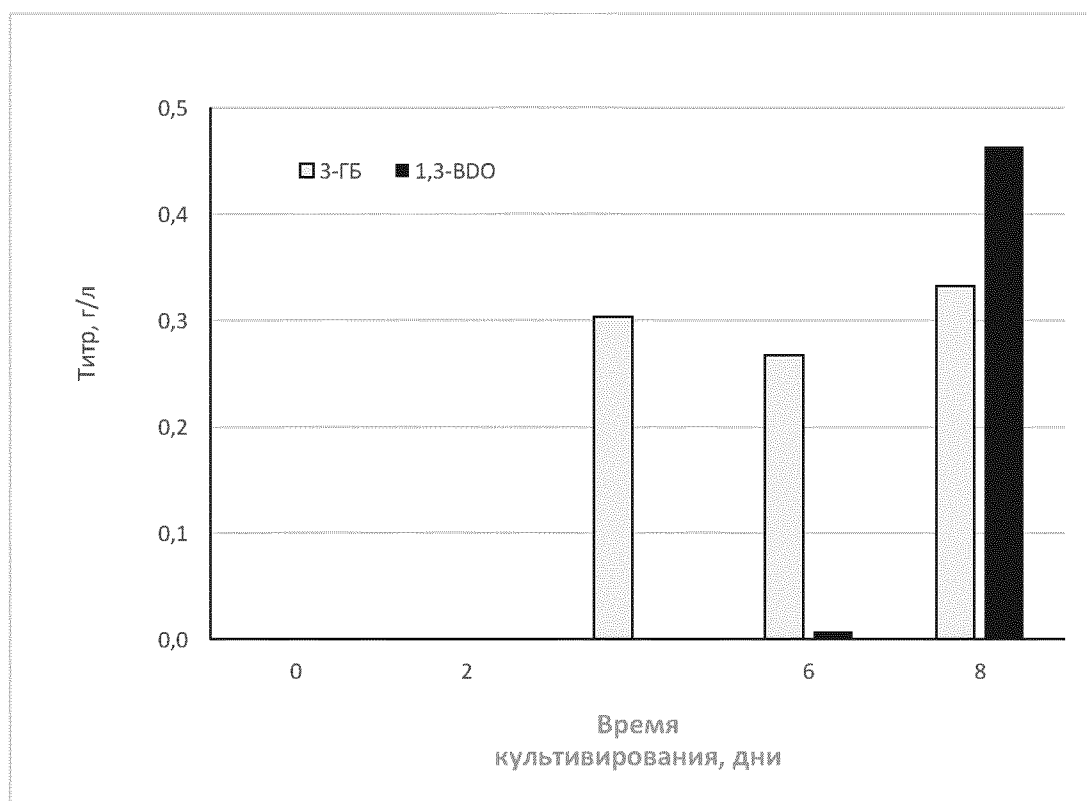
ФИГ. 38А



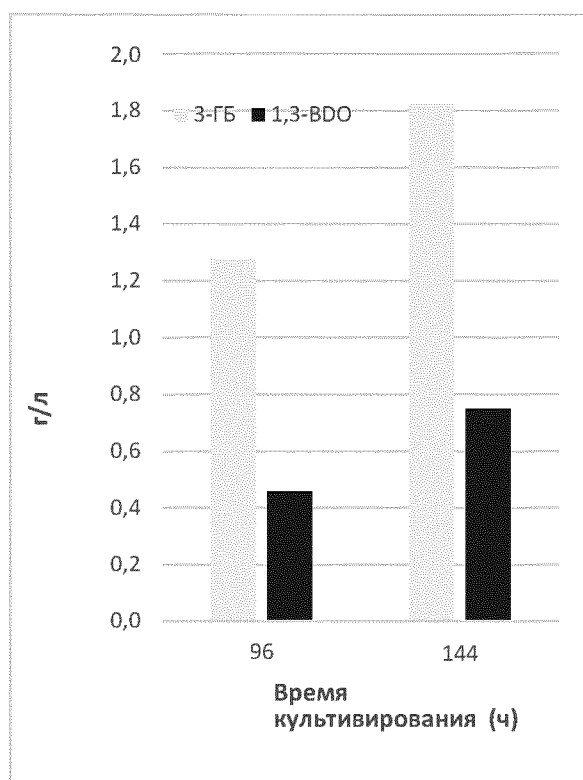
ФИГ. 38В



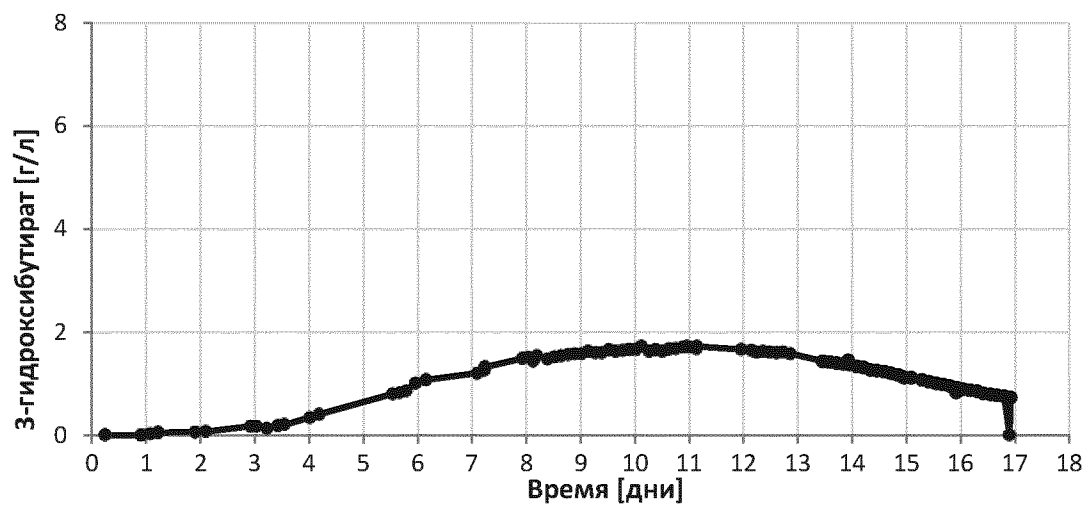
ФИГ. 39



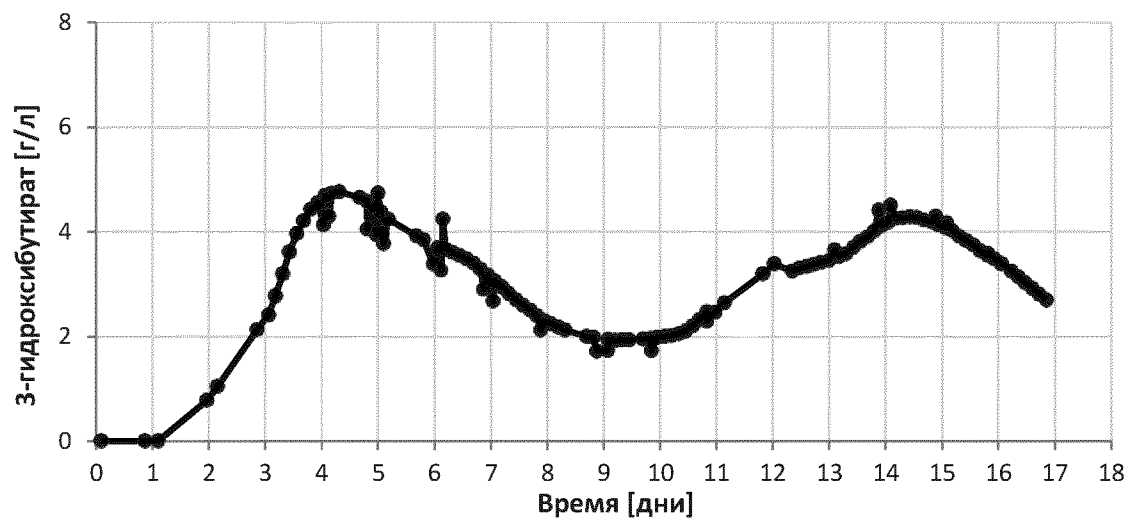
ФИГ. 40



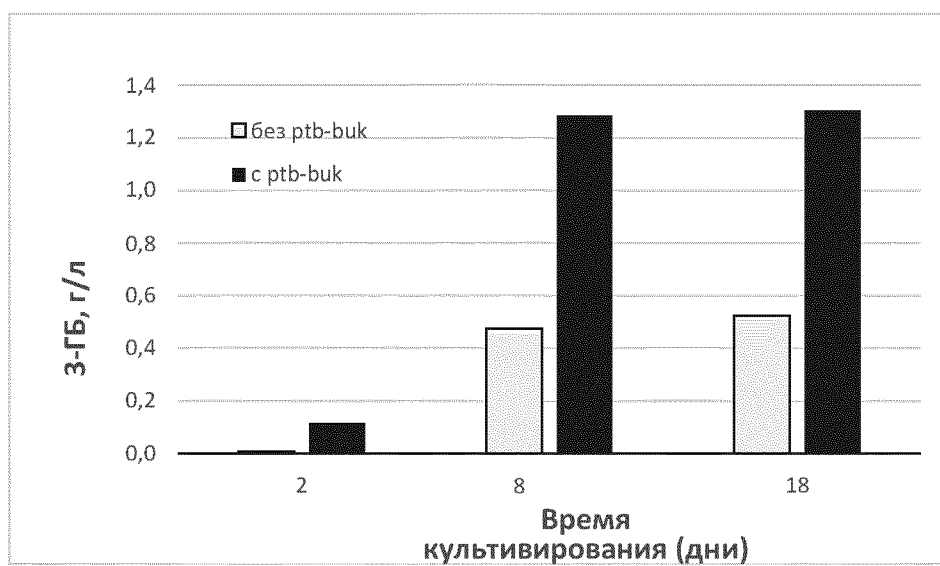
ФИГ. 41



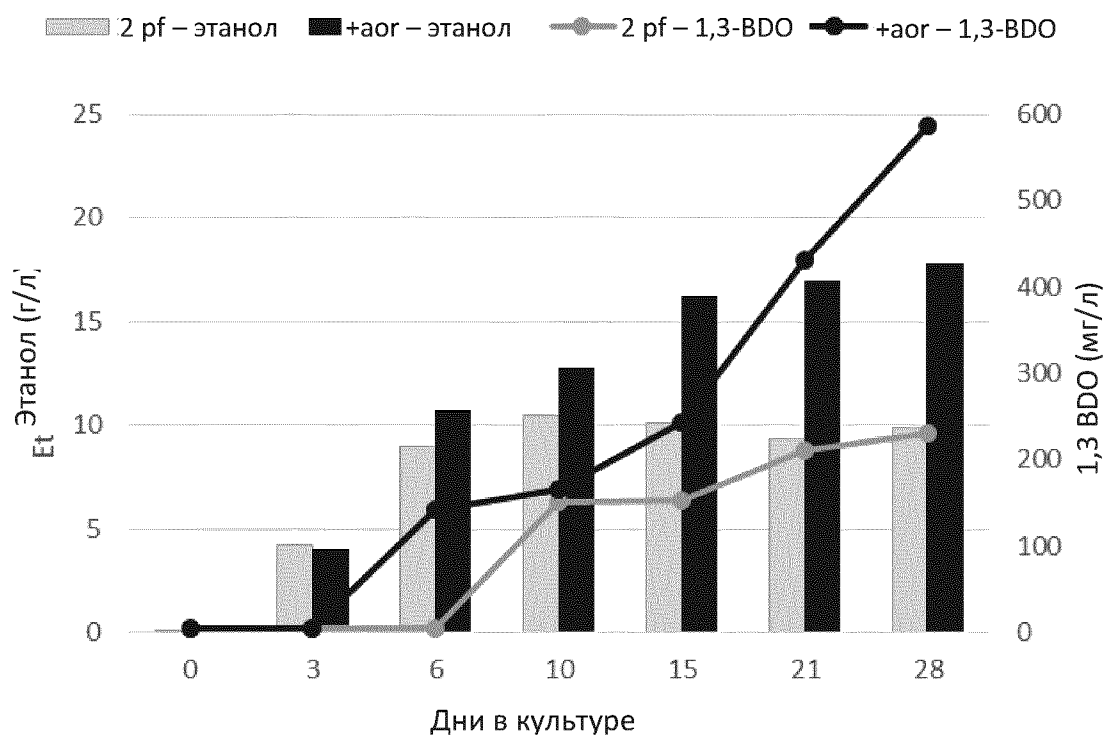
ФИГ. 42А



ФИГ. 42В



ФИГ. 43



ФИГ. 44

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202190729

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 15/74 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 1/20, 1/21, 15/74, 9/10, 9/12, C12P 5/02, 7/04, 7/40, 7/42, 7/44, C12R 1/01

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	US 7262037 B2 (CHEN GUOQIANG et al.) 28.08.2007, пункт 1 формулы, фигура 4 , пример 1	1-20
A	WO 2011/111638 A1 (MITSUI CHEMICALS, INC) 15.09.2011 реферат, пункты 1-12 формулы, фигура 1	1-20
A	US 2011/0201089 A1 (GENOMATICA, INC 18.08.2011, пункты 1, 14 формулы, фигура 1a	1-20
A	US 2011/0151530 A1 (METABOLIC EXPLORER) 23.06.2011, пункт 19 формулы, фигура 1	1-20

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

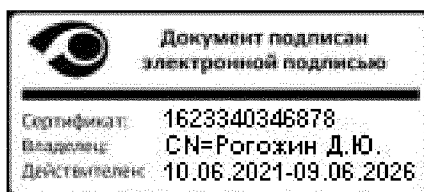
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **14/12/2021**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин