

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291748 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.18(51) Int. Cl. C12P 7/50 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.12.02

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛЕНА ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(31) 62/942,895

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.03

Карими Тахерех, Нгуен Труонг Хуу,
Куэва Мигель Эухенио (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/062938

(74) Представитель:

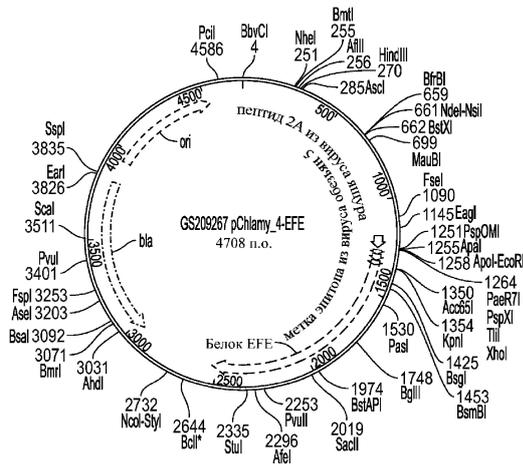
(87) WO 2021/113396 2021.06.10

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

СЕМВИТА ФЭКТОРИ, ИНК. (US)

(57) Изобретение относится к рекомбинантным микроорганизмам, обладающим улучшенной способностью продуцировать этилен, способам получения вышеуказанного и способам получения этилена. Польза от рекомбинантных микроорганизмов и способов, раскрытых в данном документе, может включать увеличенное получение этилена из микробных культур. Дополнительная польза может заключаться в использовании диоксида углерода в получении биоэтилена, полезного в качестве сырья для получения пластмассы, текстиля и химических веществ, и для использования в других применениях. Еще одна польза от способов и систем, раскрытых в данном документе, может включать уменьшение избытка диоксида углерода в окружающей среде.



A1

202291748

202291748

A1

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛЕНА ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Перекрестная ссылка

5 [0001] Данная заявка заявляет приоритет по первоначальной заявке США № 62/942895, поданной 03 декабря 2019 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Область изобретения

10 [0002] Настоящее раскрытие относится к рекомбинантным микроорганизмам, обладающим улучшенной способностью продуцировать этилен, способам получения вышеуказанного и способам сбора этилена из таких рекомбинантных организмов. Польза от данных рекомбинантных микроорганизмов и способов, раскрытых в данном документе, может включать увеличенную продукцию этилена
15 из микробных культур. Дополнительной пользой может являться применение диоксида углерода для получения биоэтилена, полезного в качестве сырья для производства пластмассы, текстиля и химических веществ, и для использования в других применениях. Еще одна польза раскрытых в данном документе способов и систем может включать уменьшение избытка диоксида углерода из окружающей
20 среды.

Предшествующий уровень техники

[0003] Увеличенная потребность в энергии во всем мире привела к избытку диоксида углерода в результате сгорания ископаемых видов топлива, таких как
25 нефть и газ, что по существу способствовало тому, что многие объявляют о кризисе глобального потепления. Промышленность так отчаялась предотвратить поступление диоксида углерода в атмосферу, что они прибегли к удалению диоксида углерода из потоков выхлопных газов и атмосферы. Затем они хранят диоксид углерода в подземной окружающей среде. Однако, все современные
30 известные способа только удаляют диоксид углерода из атмосферы посредством хранения его под землей. Они фактически не превращают диоксид углерода обратно ни в какое другое полезное вещество.

[0004] Ограниченный запас нефтепродукта и его вредные воздействия на окружающую среду подтолкнули к разработкам возобновляемых источников
35 топлива и химических веществ. Этилен представляет собой наиболее широко получаемое органическое соединение в мире, полезное в широком спектре отраслей

промышленности, включая пластмассу, растворители и текстиль. Этилен в настоящее время производится посредством парового крекинга ископаемых видов топлива или дегидрогенизации этана. При миллионах метрических тонн этилена, производимых каждый год, однако, более чем достаточно диоксида углерода
5 продуцируется посредством таких процессов, внося значительный вклад в мировой «углеродный след». Получение этилена посредством способов на основе возобновляемых источников, соответственно, поможет удовлетворить огромную потребность энергетической и химической отраслей промышленности, также одновременно помогая защитить окружающую среду.

10 [0005] Поскольку этилен представляет собой потенциально возобновляемое сырье, существует огромный интерес в разработке технологий для получения этилена из возобновляемых источников, таких как диоксид углерода и биомасса. Биоэтилен в настоящее время получают с использованием этанола, происходящего из кукурузы или сахарного тростника. Множество микробов, включая бактерии и
15 грибы, в природе производит этилен в маленьких количествах. Гетерологичная экспрессия фермента, производящего этилен, продемонстрирована в нескольких видах микробов, где хозяева способны утилизировать множество источников углерода, включая лигноцеллюлозу и диоксид углерода.

[0006] На основе современной истории, справедливо сказать, что избыток
20 диоксида углерода в атмосфере не будет уменьшен до тех пор, пока не станет выгодно его уменьшить. Остается необходимость в улучшениях в микробных системах и процессах, связанных с биоэтиленом, для получения этилена в коммерческом масштабе. Остается необходимость в получении углеводородов посредством более эффективных возобновляемых технологий. Остается
25 необходимость в удалении избытка диоксида углерода из атмосферы. Остается необходимость в улучшенных способах получения этилена из возобновляемого сырья для промышленных и коммерческих применений.

Краткое изложение сущности изобретения

30 [0007] Воплощения в данном документе направлены на рекомбинантный микроорганизм, обладающий улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE – от англ. ethylene forming enzyme), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID
35 NO: 1 (см. прилагаемое Приложение), посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, при этом количество

белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм также экспрессирует по меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP – от англ. alpha-ketoglutarate permease), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2 (см. прилагаемое Приложение), посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP, при этом количество белка AKGP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка AKGP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP. В одном воплощении количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0008] В разных воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку.

[0009] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp.

[0010] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность,

экспрессирующая АКРР, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Escherichia* sp.

[0011] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую АКРР, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus* sp. В еще одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую АКРР, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6 (см. прилагаемое Приложение), и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКРР, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus* sp.

[0012] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP – от англ. phosphoenolpyruvate synthase), имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной

нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и где количества АКГ, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество АКГ, продуцируемого контрольным микроорганизмом. В некоторых таких воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

[0013] В некоторых воплощениях рекомбинантный белок экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и где количество АКГ, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка АКГ, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

[0014] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок цитратсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

[0015] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок изоцитратдегидрогеназу (IDH – от англ. isocitrate dehydrogenase), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и

где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

5 [0016] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

10 [0017] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу, при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

20 [0018] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу, при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

30 [0019] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу, при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

[0020] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из белка сахарозофосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 26, белка сахарозо-6-фосфатазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 28, белка гликогенфосфорилазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 30, и белка UTP (от англ. uridine triphosphate – уридинтрифосфат)-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 32, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок, где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок, где количество сахарозы, продуцируемой рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое контрольным микроорганизмом.

[0021] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм содержит по меньшей мере одну делецию в по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один белок, выбранный из белка инвертазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 34, белка глюкозилглицеринфосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 36, и белка гликогенсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 38, где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество, продуцируемое контрольным микроорганизмом, не имеющим по меньшей мере одной делеции.

[0022] Воплощения в данном документе направлены на способы получения рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен. В одном воплощении способ включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, или ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, в бактериальную

плазмиду микроорганизма, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7 (см. Приложение).

[0023] В разных воплощенных способах микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку.

[0024] В одном воплощении способов в данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и микроорганизм представляет собой бактерию *Chlamydomonas* sp. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и микроорганизм представляет собой бактерию *Escherichia* sp. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp.

[0025] Способы получения этилена воплощены в данном документе. Воплощение такого способа включает предоставление рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE; культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования; и сбор этилена из сосуда биореактора для культивирования.

[0026] В одном воплощении способов получения этилена в данном документе рекомбинантный микроорганизм содержит ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, объединенную с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКGP, вставленную в бактериальную плазмиду микроорганизма, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКGP, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В еще одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКGP, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6.

[0027] В разных воплощениях получения этилена в данном документе рекомбинантный микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли,

микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку.

[0028] Воплощение способа получения этилена дополнительно включает увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенный в сосуде биореактора для культивирования. В одном воплощении такой способ включает добавление CO_2 к атмосфере культуры, содержащейся в пределах сосуда биореактора для культивирования, со скоростью от примерно 100 мл/минута до примерно 500 мл/минута. В одном воплощении такой способ дополнительно включает уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из клеточной культуры, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенный в сосуде биореактора для культивирования. В одном воплощении такой способ дополнительно включает осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из культуры микроба, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма. В одном воплощении концентрация по меньшей мере одного питательного вещества и количество по меньшей мере одного стимула находятся в соотношении от примерно 0,5-1,5 гр./литр до примерно 0,1 мМ в микробной культуре. В одном воплощении такой способ дополнительно включает удаление продуцируемого количества этилена из микробной культуры посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние, или когда количество выделенного этилена составляет от примерно 0,5 мл до примерно 10 мл/литр/ч.

[0029] Воплощения в данном документе направлены на рекомбинантный микроорганизм, обладающий способностью продуцировать альфа-кетоглутарат (AKG). В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP.

[0030] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – изоцитратдегидрогеназу (IDH),

имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH; где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

[0031] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – цитратсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

[0032] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка – глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка – глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

[0033] В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

Краткое описание графических материалов

[0034] Предшествующее краткое изложение сущности изобретения, а также следующее подробное описание воплощений будет лучше понятно при прочтении вместе с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации в графических материалах показаны некоторые воплощения, которые могут быть предпочтительными. Следует понимать, что изображенные воплощения не

ограничиваются показанными точными подробностями. Если не указано иное, графические материалы представлены не в масштабе.

[0035] Фиг. 1 представляет собой блок-схему, изображающую воплощение способа получения этилена в данном документе.

5 [0036] Фиг. 2 представляет собой иллюстрацию векторной плазмиды для экспрессии белка – фермента, образующего этилен (EFE), согласно воплощениям в данном документе.

10 [0037] Фиг. 3A представляет собой фотографию геля SDS-PAGE (от англ. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), показывающую экспрессию белка EFE согласно воплощениям в данном документе.

[0038] Фиг. 3B представляет собой фотографию вестерн-блоттинга, показывающую экспрессию белка EFE согласно воплощениям в данном документе.

15 [0039] Фиг. 4A представляет собой график, показывающий скорость роста *E.coli* BL 21 PUC19 EFE с течением времени согласно воплощениям в данном документе.

[0040] Фиг. 4B представляет собой график, показывающий выход этилена с течением времени для культуры *E.coli* BL 21 PUC19 EFE согласно воплощениям в данном документе.

20 [0041] Фиг. 5A представляет собой фотографию, показывающую рост колоний бактерий согласно воплощениям в данном документе.

[0042] Фиг. 5B представляет собой фотографию, показывающую рост колоний бактерий согласно воплощениям в данном документе.

25 [0043] Фиг. 6 представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции АКГ и сахарозы согласно воплощениям в данном документе.

[0044] Фиг. 7A представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции сахарозы согласно воплощениям в данном документе.

30 [0045] Фиг. 7B представляет собой фотографию культуры бактерий, выращиваемой в колбе, согласно воплощениям в данном документе.

[0046] Фиг. 8A представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции этилена согласно воплощениям в данном документе.

[0047] Фиг. 8В представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции этилена согласно воплощениям в данном документе.

5 [0048] Фиг. 9А представляет собой фотографию саузерн-блоттинга, показывающую результаты эксперимента по клонированию в отношении продукции АКГ согласно воплощениям в данном документе.

[0049] Фиг. 9В представляет собой фотографию культуры бактерий, выращиваемой в колбе, согласно воплощениям в данном документе.

10 **Подробное описание**

[0050] Если не указано иное, все измерения представлены в стандартных метрических единицах.

[0051] Если не указано иное, все примеры слов в единственном числе могут относиться к одному или более чем одному слову, которое они модифицируют.

15 [0052] Если не указано иное, фраза «по меньшей мере один» означает один или более чем один объект. Например, «по меньшей мере одно питательное вещество» означает одно питательное вещество, больше чем одно питательное вещество или любую их комбинацию.

20 [0053] Если не указано иное, термин «примерно» относится к $\pm 10\%$ числа, не выраженного в процентах, которое описано, округлено до ближайшего целого числа. Например, примерно 100 мл/минута будет включать 90-110 мл/минута. Если не указано иное, термин «примерно» относится к $\pm 5\%$ числа, выраженного в процентах. Например, примерно 95% будет включать от 90 до 100%. Когда термин «примерно» обсуждается с точки зрения интервала, тогда термин относится к соответствующему
25 количеству, меньше чем нижняя граница и больше чем верхняя граница. Например, от примерно 100 до примерно 500 мл/минута будет включать от 90 до 550 мл/минута.

[0054] Если не указано иное, под поддающимися измерению свойствами (высота, ширина, длина, степень и т.д.), как описано в данном документе, понимают усредненные измерения.

30 [0055] Если не указано иное, термины «предоставляют», «предоставленный» или «предоставление» относятся к снабжению, продукции, приобретению, изготовлению, сборке, образованию, выбору, конфигурации, превращению, введению, добавлению или включению какого-либо элемента, количества, компонента, реагента, количества, измерения или анализа
35 какого-либо состава вещества, способа или системы какого-либо воплощения в данном документе.

[0056] Идентичность последовательностей в данном документе определяется, как взаимосвязь между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более нуклеотидными (полинуклеотидными) последовательностями, как определено посредством сравнения последовательностей.

5 Обычно, идентичности или сходства последовательностей сравнивают по всей длине сравниваемых последовательностей. В данной области «идентичность» также означает степень родства последовательностей между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями, в зависимости от ситуации, как определено совпадением между цепями таких последовательностей. «Сходство» между двумя аминокислотными

10 последовательностями определяется сравнением аминокислотной последовательности и ее консервативных замен аминокислот одного полипептида с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» можно легко рассчитать разными способами, известными специалистам в данной области. В одном воплощении идентичность последовательностей определяется сравнением всей длины последовательностей, как

15 идентифицировано в данном документе.

[0057] Иллюстративные способы определения идентичности созданы для получения самого большого совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства систематизированы в общедоступных компьютерных программах. Иллюстративные компьютерные программы способов определения

20 идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, например, BestFit, BLASTP (от англ. Protein Basic Local Alignment Search Tool - средство поиска основного локального выравнивания для белков), BLASTN (от англ. Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool - средство поиска основного локального выравнивания для нуклеотидов) и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), общедоступные у NCBI и

25 других источников (BLAST.RTM. Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894). Наиболее типичным используемым алгоритмом является EMBOSS (от англ. European Molecular Biology Open Software Suite). Иллюстративные параметры для сравнения аминокислотных последовательностей с использованием EMBOSS представляют собой открытие гэпа 10.0, продолжение гэпа 0,5, матрицу Blosum.

30 Иллюстративные параметры для сравнения последовательностей нуклеиновой кислоты с использованием EMBOSS представляют собой открытие гэпа 10.0, продолжение гэпа 0,5, полную матрицу ДНК (матрица идентичности ДНК). В воплощениях возможно сравнивать последовательности ДНК/белков у разных видов для определения гомологии последовательностей с использованием онлайн-

35 данных, таких как Gene bank, KEG, BLAST и Ensemble.

[0058] Возможно, в определении степени сходства аминокислот специалист может также принимать во внимание так называемые «консервативные» замены аминокислот, как будет понятно специалисту. Консервативные замены аминокислот относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих похожие боковые цепи.

5 Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксил-содержащие боковые цепи, представляет собой серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амид-содержащие боковые цепи, представляет собой аспарагин и глутамин;

10 аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин.

15 Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Варианты замен аминокислотной последовательности, раскрытые в данном документе, представляют собой варианты, в которых по меньшей мере один остаток в раскрытых последовательностях удален, и другой остаток вставлен на его место.

20 Предпочтительно, замена аминокислоты является консервативной. Предпочтительные консервативные замены для каждой из встречающихся в природе аминокислот выглядят следующим образом: Ala на ser; Arg на lys; Asn на gln или his; Asp на glu; Cys на ser или ala; Gln на asn; Glu на asp; Gly на pro; His на asn или gln; Ile на leu или val; Leu на ile или val; Lys на arg; gln или glu; Met на leu или

25 ile; Phe на met, leu или tyr; Ser на thr; Thr на ser; Trp на tyr; Tyr на trp или phe; и Val на ile или leu.

[0059] Если не указано иное, термин «адаптированный» или «адаптированный в отношении кодона» относится к «оптимизации кодонов» полинуклеотидов, как раскрыто в данном документе, последовательность которых может быть нативной или ненативной, или

30 может быть адаптирована для экспрессии в других микроорганизмах. Оптимизация кодонов адаптирует частоту использования кодона для кодируемого полипептида к предпочтению кодонов организма, в котором должен экспрессироваться полипептид. Оптимизация кодонов обычно помогает повысить уровень продукции кодируемого полипептида в клетке-хозяине.

[0060] Выбросы диоксида углерода, происходящие в результате применения

35 ископаемых видов топлива, продолжают расти в глобальном масштабе. Уменьшение уровней диоксида углерода в атмосфере является ключевым

фактором для уменьшения или обращения изменения климата. Улавливание и хранение углерода (CCS – от англ. carbon capture and storage) является выдающейся технологией для удаления промышленного диоксида углерода из атмосферы; оценивается, что более 20 триллионов тонн диоксида углерода, улавливаемого в результате очистки и других производственных процессов, можно транспортировать и хранить в разных типах подземной окружающей среды или резервуаров для хранения. Несмотря на то, что CCS является экономически эффективным и доступным путем уменьшения выбросов диоксида углерода, по сравнению с другими доступными в настоящее время способами, остается проблема, заключающаяся в том, что диоксид углерода только хранится под землей до тех пор, пока не улетучится. Таким образом, способы CCS не обеспечивают надежного решения для уменьшения избытка диоксида углерода в атмосфере. Кроме того, у отраслей промышленности существует маленький финансовый стимул для закачивания диоксида углерода в подземную окружающую среду, если их не вынуждает это делать природоохранное законодательство, или им не платят за то, чтобы это делать в рамках их модели коммерческой деятельности. Спорно, глобальное потепление является критическим моментом, поскольку оно более перспективно в продукции диоксида углерода, чем в устранении диоксида углерода.

[0061] Остается необходимость в удалении избытка диоксида углерода из атмосферы более эффективными и надежными путями. Остается необходимость в технологиях, которые могут взять под контроль переизбыток диоксида углерода, создавая полезные продукты, и для других применений, которые являются полезными для промышленности и окружающей среды.

[0062] Проблемы ограниченного запаса нефти и вредные воздействия операций с нефтью на окружающую среду простимулировали растущую значимость максимизации выхода из существующих источников и в разработке возобновляемых источников топлива и химических веществ, что могло бы минимизировать воздействия на окружающую среду. Поскольку этилен представляет собой потенциально возобновляемое сырье, существует большой интерес к разработке технологий для получения этилена из возобновляемых источников, таких как диоксид углерода и биомасса. Этилен является наиболее широко производимым органическим соединением в мире, полезным в широком диапазоне отраслей промышленности, включая пластмассу, растворители и текстиль. Этилен в настоящее время производится посредством парового крекинга ископаемых видов топлива или дегидрогенизации этана. При миллионах метрических тонн этилена, производимых каждый год, однако, более чем достаточно диоксида углерода

5 продуцируется посредством таких процессов, оказывая значительное содействие мировому «углеродному следу». Получение этилена способами на основе возобновляемых источников, соответственно, поможет удовлетворить огромную потребность энергетической и химической отраслей промышленности, одновременно также помогая защитить окружающую среду.

[0063] Разработаны традиционные способы получения биоэтилена с использованием этанола, происходящего из кукурузы или сахарного тростника. Однако, получение биоэтилена из биомассы (например, кукурузы и сахарного тростника) является времязатратным и экономически нерентабельным способом, требующим высаживания, транспортировки и расщепления биомассы. Например, существуют огромные неэффективности, ассоциированные с ростом и транспортировкой кукурузы и сахарного тростника, которые сами вызывают эмиссию CO₂. Множество микробов, включая бактерии и грибы, в природе продуцируют этилен в небольших количествах. Такие микробы используют фермент, образующий этилен (EFE). В типе пути этилена, таком как обнаружен в *Pseudomonas syringae* и *Penicillium digitatum*, используется альфа-кетоглутарат (AKG) и аргинин в качестве субстрата в реакции, катализируемой ферментом, образующим этилен. Этилен-образующие ферменты обеспечивают перспективную мишень, поскольку экспрессии одного гена может быть достаточно для продукции этилена. Методики, использующие гетерологичную экспрессию EFE, продемонстрированы в нескольких видах микробов, где микробные хозяева способны использовать множество источников углерода в цикле Кальвина, включая лигноцеллюлозу и диоксид углерода. Кроме того, недавние разработки в экономически эффективных технологиях генетического секвенирования с высокой пропускной способностью привели к повышенному уровню понимания экспрессии генов микробов. Однако, доступные в настоящее время технологии не приводят к получению релевантных с промышленной точки зрения количеств этилена посредством микробной активности. Остается необходимость в улучшениях в продукции биоэтилена микробами, которые могут продуцировать этилен в коммерческом масштабе. Остается необходимость в способах получения этилена, полезного для применений в промышленности и других применений с использованием сырья на основе диоксида углерода.

[0064] Согласно воплощениям настоящего раскрытия может быть обеспечена польза, заключающаяся не только в удалении диоксида углерода из окружающей среды, наряду с пользой, заключающейся в получении ценного органического соединения, способного продаваться в промышленных масштабах.

Таким образом, согласно воплощениям настоящего раскрытия может быть предложена возобновляемая альтернатива традиционному хранению диоксида углерода посредством использования технологии на основе рекомбинантных микроорганизмов для превращения диоксида углерода в этилен в качестве полезного органического соединения. Одна польза воплощений настоящего раскрытия заключается в том, что данные способы могут делать для нефтяных компаний или компаний по снабжению природным газом экономически выгодным удалять диоксид углерода из окружающей среды. Нефтяная компания или ее подрядчик мог бы, вместо закачивания диоксида углерода в подземную окружающую среду или оставления удаленного диоксида углерода под землей, использовать диоксид углерода в качестве источника углерода для культивирования рекомбинантных микроорганизмов для превращения диоксида углерода в этилен экономически эффективным путем. Кроме того, значительную часть диоксида углерода, образуемого в результате транспортировки, можно избежать, поскольку данный способ может быть осуществлен на месте или, как будут ожидать, потребляет больше диоксида углерода, чем он производит.

[0065] Наиболее эффективными способами защиты окружающей среды являются такие способы, которые люди фактически используют. Чем более выгодными данные способы являются, тем с большей вероятностью люди должны их использовать. Одним из преимуществ способов, раскрытых в данном документе, является экономическая эффективность использования биореакторной системы. Согласно воплощениям настоящего раскрытия может быть обеспечена польза конструирования фотосинтезирующего микроорганизма, продуцирующего этилен, посредством адаптации релевантных метаболических сигнальных путей к продукции этилена в промышленном масштабе. Такие воплощения могут сделать выгодным удаление диоксида углерода из атмосферы и пассивное образование ценных органических соединений, в то время как микробы осуществляют работу в масштабе, ранее невообразимом.

[0066] Что бы случилось с кризисом глобального потепления, если бы стало более выгодно, или настолько же выгодно, превращать диоксид углерода в ценные органические соединения, как изначально было с образованием диоксида углерода? Раскрытые в настоящее время способы могли бы превращать производителей энергии из компаний глобального потепления в компании глобального охлаждения.

[0067] Настоящее раскрытие относится к рекомбинантным микроорганизмам, обладающим улучшенной способностью продуцировать этилен. Настоящее раскрытие относится к способам получения этилена, включающим предоставление

рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен согласно разным воплощениям в данном документе. В качестве общего обзора способа, раскрытого в данном документе, ссылаясь на Фиг. 1, способ включает предоставление рекомбинантного микроорганизма, экспрессирующего по меньшей мере один белок EFE согласно воплощениям, раскрытым в данном документе 102; культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для продукции этилена в сосуде биореактора для культивирования 104; увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре в пределах сосуда биореактора для культивирования 106; уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из клеточной культуры 108; осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из культуры микроба, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма 110; и удаление количества этилена, продуцируемого из микробной культуры посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние 112. В качестве иллюстрации векторной плазмиды для экспрессии белка EFE согласно воплощениям в данном документе, ссылаясь на Фиг. 2, ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp. В качестве иллюстрации рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, ссылаясь на иллюстрацию геля SDS-PAGE на Фиг. 3А и иллюстрацию вестерн-блоттинга на Фиг. 3В, белок EFE экспрессируется с векторной плазмиды бактерии *Escherichia* sp., имеющей ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, вставленную в векторную плазмиду, как показано стрелками.

Воплощения рекомбинантных микроорганизмов

[0068] Настоящее раскрытие относится к рекомбинантному микроорганизму, обладающему улучшенной способностью продуцировать этилен. В таких воплощениях рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая EFE, кодирует EFE *Pseudomonas savastanoi*. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В разных воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 50% до примерно 150% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 75% до примерно 100% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0069] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм также экспрессирует по меньшей мере один белок – альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP) посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP. В одном воплощении белок AKGP имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении белок AKGP имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении белок AKGP имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении исходная последовательность для SEQ ID NO: 2 была из AKGP из *Pseudomonas syringe*, но для улучшения экспрессии данной последовательности в *Synechococcus elongatus* проводили инновацию последовательности. В разных воплощениях количество белка AKGP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка AKGP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP.

В некоторых воплощениях количество белка АКРР, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка АКРР, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей АКРР. В некоторых воплощениях количество белка АКРР, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 50% до примерно 150% или более больше, чем количество белка АКРР, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей АКРР. В некоторых воплощениях количество белка АКРР, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 75% до примерно 100% или более больше, чем количество белка АКРР, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей АКРР.

[0070] В разных воплощениях рекомбинантный микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку. В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм может включать *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и табак.

[0071] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном

воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas sp.*

[0072] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* или в бактерии *Escherichia coli*.

[0073] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP. В некоторых таких воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

Воплощения способов получения рекомбинантного микроорганизма

[0074] Воплощения в данном документе направлены на способы получения рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен. В одном воплощении способ включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, в бактериальную плазмиду микроорганизма. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, кодирует EFE *Pseudomonas savastanoi*.

В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, является адаптированной в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas sp.* В одном воплощении бактерия *Chlamydomonas sp.* включает *Chlamydomonas reinhardtii*.

[0075] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, является адаптированной в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении бактерия *Escherichia sp* включает *E. coli*. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает N-концевой сайт клонирования NdeI (SEQ ID NO. 8 (См. Приложение)). В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку на С-конце с последующим стоп-кодоном и сайтом клонирования HindIII (SEQ ID NO. 9 (См. Приложение)).

[0076] В одном воплощении способ включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, в бактериальную плазмиду микроорганизма. В одном таком воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, экспрессируют объединенную

5 аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV

10 включает SEQ ID NO. 10 (см. Приложение). В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная

15 нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная

20 нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID

25 NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная

30 нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в

35 цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая АКГР, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

[0077] В разных воплощенные способах микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку. В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм может включать *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и табак.

[0078] В воплощениях способов в данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas sp.*

[0079] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность,

экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* или в бактерии *Escherichia coli*.

10 [0080] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP. В некоторых таких воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная

нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

Воплощения способов получения этилена

[0081] Способы получения этилена воплощены в данном документе. Одно воплощение такого способа включает предоставление рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен. В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок - фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE; культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования; и сбор этилена из сосуда биореактора для культивирования.

[0082] В некоторых воплощениях способов получения этилена ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, кодирует EFE *Pseudomonas savastanoi*. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей

мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В одном воплощении белок EFE имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В разных воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 50% до примерно 150% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 75% до примерно 100% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0083] В одном воплощении способов получения этилена ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas* sp. В одном воплощении бактерия *Chlamydomonas* sp. включает *Chlamydomonas reinhardtii*.

[0084] В одном воплощении способов а данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная

последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia sp.* В одном воплощении бактерия *Escherichia sp* включает *E. coli*. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает N-концевой сайт клонирования NdeI (SEQ ID NO. 8). В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, включает одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку на С-конце с последующим стоп-кодоном и сайтом клонирования HindIII (SEQ ID NO. 9).

[0085] В одном воплощении способ получения этилена включает получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, в бактериальную плазмиду микроорганизма. В одном таком воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая АКГР, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых

воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

[0086] В разных воплощенных способах микроорганизм включает цианобактерии, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерии, водоросли, микроводоросли, бактерии, осуществляющие электросинтез, фотосинтезирующий микроорганизм, дрожжи, нитчатые грибы или растительную клетку. В некоторых воплощениях рекомбинантный микроорганизм может включать *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и табак.

[0087] В воплощениях способов в данном документе ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и

ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas* sp. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 3. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Chlamydomonas* sp.

10 [0088] В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлена в бактериальную векторную плазмиду, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia* sp. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 4. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, адаптирована в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Escherichia* sp или в бактерии *Escherichia coli*.

[0089] В одном воплощении рекомбинантный микроорганизм дополнительно включает ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP. В некоторых таких воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5. В некоторых воплощениях ненативная экспрессирующая нуклеотидная последовательность и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 6. В таких воплощениях объединенная аминокислотная последовательность может включать одну или более меток очистки; в одном воплощении метка очистки включает гистидиновую метку. В одном воплощении метка очистки включает последовательность His-TEV; в одном воплощении последовательность His-TEV включает SEQ ID NO. 10. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В других воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6. В некоторых воплощениях ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.* В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, включают нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO. 7. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в цианобактериях. В одном воплощении ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, адаптированы в отношении кодона для экспрессии в бактерии *Synechococcus sp.*

35 [0090] Воплощения получения этилена в данном документе включают культивирование рекомбинантного микроорганизма в культуре

биореактора в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования. Культура биореактора согласно воплощенным способам может включать один или более подходящих реагентов или сред для выращивания для поддержки роста культуры рекомбинантного микроорганизма. Такие реагенты или культуральные среды могут включать воду, один или более углеводов, одну или более аминокислот или производных аминокислот, один или более буферов, морскую воду, бульон Луриа, бульон Луриа-Бертани, среды BG-11, диоксид углерода, свет, температуру, электричество или их комбинации.

[0091] Воплощение способа получения этилена включает увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования. Добавление такого активатора может включать повышение концентрации одного или более субстратов фермента EFE, экспрессируемого культурой рекомбинантного микроорганизма. Такой субстрат может включать альфа-кетоглутарат или аргинин или их комбинации, а также другие источники углерода, такие как глицерин и глюкоза. В других воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора может включать добавление молекулярного переключателя. В некоторых воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора может включать вставку индуцибельного промотора выше гена EFE; один такой промотор включает промотор IPTG. В таких воплощениях IPTG можно добавлять в качестве молекулярного переключателя к культуральным средам. В некоторых воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора может включать добавление к культуре одного или более питательных веществ или стимулов. Такие питательные вещества или стимулы могут включать один или более углеводов, одну или более аминокислот или производных аминокислот, один или более субстратов EFE, сукцинат, диоксид углерода, свет, температуру, электричество, глицерин, сахара или их комбинации. В таких воплощениях добавление по меньшей мере одного активатора к культуре может обеспечивать пользу, заключающуюся в осуществлении контроля над циклами продукции этилена и усилении скорости продукции этилена. В некоторых воплощениях продуцируемый этилен можно удалять из сосуда биореактора для культивирования, когда он образуется. В таких воплощениях удаление этилена может включать конденсацию этилена, продуцируемого в виде газа, в жидкую форму для удаления из сосуда биореактора для культивирования.

[0092] В одном воплощении способ получения этилена включает добавление CO_2 в атмосферу культуры, содержащуюся в сосуде для культивирования биореактора, со скоростью от примерно 100 мл/минута до примерно 500 мл/минута. В одном воплощении способ включает добавление CO_2 к атмосфере культуры, содержащейся в сосуде биореактора для культивирования со скоростью от примерно 150 мл/минута до примерно 450 мл/минута. В одном воплощении способ включает добавление CO_2 к атмосфере культуры, содержащейся в сосуде биореактора для культивирования, со скоростью от примерно 250 мл/минута до примерно 350 мл/минута. Такие воплощения могут обеспечивать пользу, заключающуюся в усилении или осуществлении контроля над скоростью продукции этилена в сосуде биореактора для культивирования, а также обеспечении пользы, заключающейся в превращении CO_2 в полезный продукт.

[0093] В одном воплощении способ получения этилена включает уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из микробной культуры, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования. В одном воплощении такой способ дополнительно включает осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из микробной культуры, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма. В одном воплощении концентрация по меньшей мере одного питательного вещества или количество по меньшей мере одного стимула находятся в соотношении от примерно 0,5-1,5 гр./литр до примерно 0,1 мМ в микробной культуре. В одном воплощении такой способ дополнительно включает удаление количества этилена, продуцируемого из микробной культуры, посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние, или где количество выделенного этилена составляет от примерно 0,5 мл до примерно 10 мл/литр/ч. Такие воплощения могут обеспечивать пользу, заключающуюся в осуществлении контроля над количеством продукции этилена, посредством осуществления контроля над степенью активности цикла Кальвина в микробной культуре. Например, возможно осуществлять переход с экспрессионной системы на систему роста, когда клеткам дают расти в течение 5-7 суток, и следят за условиями их роста. Когда клетки достигают состояния экспоненциального роста (что означает, что клетки метаболически активны), возможно осуществлять переход с системы роста на экспрессионную систему, когда клетки переходят на цикл продукции этилена с продукцией этилена для

осуществления сбора. Данная экспрессионная система может поддерживаться в течение 7 или более суток.

Примеры

5 **Пример 1. Клонирование последовательности гена фермента, образующего этилен, в векторную плазмиду *Chlamydomonas reinhardtii***

 [0094] Белок EFE (фермент, образующий этилен) будет экспрессироваться и продуцироваться в *Chlamydomonas reinhardtii*. Плазмиду pChlamy_4-EFE успешно создавали для использования в экспрессии белка EFE
10 (Creative Enzymes, Shirley, NY).

 [0095] Полинуклеотид, кодирующий белок EFE *Pseudomonas savastanoi pv. Phaseolicola* (GenBank: KPB44727. 1, SEQ ID NO: 1), клонировали в векторную плазмиду pChlamy_4 (ThermoFisher). Другие реагенты и применение проборов предоставлены Creative Biostructure.

15 [0096] Последовательность гена фермента, образующего этилен (EFE), из штамма *Pseudomonas savastanoi pv. Phaseolicola* (GenBank: KPB44727. 1) использовали для получения рекомбинантного белка EFE. Соответствующие нуклеотидные последовательности адаптировали в отношении кодона для экспрессии в *Chlamydomonas reinhardtii* и синтезировали (SEQ ID NO: 3).
20 Конструкцию EFE клонировали в вектор pChlamy_4 с сайтами рестрикции *KpnI* и *PstI*.

 [0097] В соответствии с характеристикой вектора pChlamy_4 конструировали и получали EFE с N-меткой. Вектор pChlamy_4 содержит инициаторный кодон ATG (вектор ATG) для соответствующей инициации трансляции в положении 497-499, обнаруженном в начале гена *Sh ble* после
25 удаления интрона-1 Rbc S2. Ген пептида FMDV 2A, фланкирующий сайт множественного клонирования 1 (MCSI), находится внутри рамки с геном *Sh ble*. Для применения N-концевой метки 6x His-V5-TEV последовательность EFE клонировали внутри рамки после сайта TEV в вектор pChlamy_4, расщепляемый *KphI/PstI*. TAA (стоп-кодон) конструировали для соответствующей терминации трансляции.
30 Полученная хроматограмма последовательностей показана на Фиг. 2; ссылаясь на Фиг. 2, кодирующие последовательности гена белка EFE показаны в стрелке с надписью «EFE-белок». Ориентацию открытой рамки считывания подтверждали проверкой плазмиды посредством секвенирования последовательности.

35 **Пример 2: Оценка экспрессии белка EFE в *E. coli***

[0098] Полинуклеотид, кодирующий белок EFE *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* (GenBank: KPB44727.1, SEQ ID NO: 1), клонировали в векторную плазмиду pET-30a(+). Соответствующие нуклеотидные последовательности подвергали адаптации кодонов для экспрессии в *E. coli* (SEQ ID NO: 4), содержащие возможную His-метку на С-концевом конце с последующим стоп-кодоном и сайтом HindIII (SEQ ID NO: 9). Сайт NdeI использовали для клонирования на 5'-конце, где сайт NdeI содержит старт-кодон ATG (SEQ ID NO: 8). Компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидой. Единичную колонию инокулировали в среду LB, содержащую канамицин; культуры инкубировали при 37°C при 200 об./мин. Как только плотность клеток достигала OD (от англ. optical density - оптическая плотность), равной 0,6-0,8 при 600 нм, 0,5 мМ IPTG вводили для индукции. Проводили пилотную экспрессию EFE (примерно 44,5 кДа)_BL21(DE3). SDS-PAGE (Фиг. 3А) и вестерн-блоттинг (Фиг. 3В) использовали для отслеживания экспрессии белка EFE (GenScript USA, Inc., Piscataway, NJ). Со ссылкой на Фиг. 3А и Фиг. 3В:

[0099] Анализ SDS PAGE (слева) и вестерн-блоттинг (справа, с использованием антитела против His (GenScript , кат. № A00186)) пилотной экспрессии EFE при экспрессии в *E. coli* в конструкции pET 30a(+).

Дорожка M1: Белковый маркер
 Дорожка M2: Маркер вестерн-блоттинга
 Дорожка PC1: BSA (от англ. bovine serum albumin - бычий сывороточный альбумин) (1 мкг)
 Дорожка PC2: BSA (2 мкг)
 Дорожка NC: клеточный лизат без индукции
 Дорожка 1: клеточный лизат с индукцией в течение 16 ч при 15°C
 Дорожка 2: клеточный лизат с индукцией в течение 4 ч при 37°C
 Дорожка NC₁: Супернатант клеточного лизата без индукции
 Дорожка 3: Супернатант клеточного лизата с индукцией в течение 16 ч при 15°C
 Дорожка 4: Супернатант клеточного лизата с индукцией в течение 4 ч при 37°C
 Дорожка NC₂: Осадок клеточного лизата без индукции
 Дорожка 5: Осадок клеточного лизата с индукцией в течение 16 ч при 15°C
 Дорожка 6: Осадок клеточного лизата с индукцией в течение 4 ч при 37°C

[00100] Результаты SDS-PAGE и вестерн-блоттинга показали, что EFE экспрессировался в *E. coli*. Были обнаружены условия самого высокого уровня

экспрессии EFE с индукцией в течение 16 ч при 15°C, что приводило к уровню экспрессии 5 мг/л и растворимости 30%.

Пример 3: Нуклеотидные последовательности, экспрессирующие рекомбинантный EFE и AKGP, адаптированные для экспрессии в бактериях *Synechococcus spp.*

[00101] Получали объединенную полинуклеотидную последовательность (EFE_-P2A-aKGP, SEQ ID NO: 7) для экспрессии белка EFE и для экспрессии белка AKGP (SEQ ID NO. 2), после адаптации нуклеотидной последовательности для экспрессии в видах цианобактерий *Synechococcus elongatus* и *Synechococcus leopoliensis* (GenScript, Piscataway, NJ). Использовали алгоритм анализа адаптации кодонов, который адаптирует множество параметров, которые являются особо важными для эффективности экспрессии гена, включая, но, не ограничиваясь предпочтением кодонов, содержанием GC, содержанием динуклеотидов CpG, вторичной структурой мРНК, криптическими сайтами сплайсинга, сайтами преждевременного полиА, внутренними chi-сайтами и сайтами связывания рибосомы, отсутствием CpG-островков, мотивом нестабильности РНК (ARE), последовательностями повторов (прямой повтор, обратный повтор и повтор диада) и сайтами рестрикции, которые могут мешать клонированию. Регуляцию предпочтения кодонов осуществляли с использованием распределения частоты использования кодона по всей длине последовательности гена с полученным индексом адаптации кодонов (CAI - от англ. Codon Adaptation Index), равным 0,95. Считается, что CAI 1,0 прекрасен в желательном организме экспрессии, и CAI больше чем 0,8 считается хорошим с точки зрения высокого уровня экспрессии гена. Частоту встречаемости оптимальных кодонов (FOP – от англ. Frequency of Optimal Codons) оценивали, как выраженное в процентах распределение благоприятных кодонов в группах рассчитанного качества кодонов, со значением 100, установленным для кодона с наиболее высокой частотой использования для данной аминокислоты в желательном организме экспрессии. Результат 80% кодонов был обнаружен в группе с самым высоким качеством кодонов 91-100, 3% - в группе со вторым по высоте качеством кодонов 81-90 и 14% - в третьей группе по высоте качества кодонов 71-80. Регуляцию содержания GC проводили, приводя к получению среднего содержания GC 56,46%, с идеальным выраженным в процентах интервалом содержания GC, составляющим от 30 до 70%. Один возможный сайт клонирования HindIII (SEQ ID NO: 12) включали на 5'-конце в положении 1

последовательности; один возможный сайт клонирования KpnI (SEQ ID NO: 13) включали на 3'-конце в положении 2524 последовательности.

[00102] Соответствующие объединенные аминокислотные последовательности EFE и AKGP, экспрессируемые SEQ ID. NO. 7, имеют последовательность расщепления P2A (SEQ ID NO: 11), вставленную между аминокислотными последовательностями EFE и AKGP. Кодируемая аминокислотная последовательность, имеющая одновременно последовательности EFE и AKGP, показана в SEQ ID NO. 5 (EFE-P2A_pSyn_6 (без His). Возможная последовательность His-TEV может быть включена на N-конце (SEQ ID NO: 10), приводя к получению аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 6 (EFE-P2A-aKGP_pSyn_6).

Пример 4: Экспериментальные методики в лабораторном масштабе

[00103] 1. Будут получены «сшитые»-сконструированные ДНК-конструкции, которые кодируют крайне важные промежуточные соединения пути синтеза биоэтилена. 2. Затем аккуратно отобранные фотосинтезирующие микроорганизмы будут размножены для клонирования и экспрессии гена. 3. Генетическое и метаболическое конструирование микроорганизмов будут затем осуществлять для непрерывной продукции биоэтилена. 4. Затем биосконструированные микроорганизмы будут отобраны и размножены в фотобиореакторе. 5. Условия культивирования в биореакторе (включая концентрацию CO₂, время световой экспозиции и длину волны излучения, температуру, pH) будут адаптированы. 6. Образцы будут собирать и анализировать посредством ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) для измерения синтеза биоэтилена. 7. Продукция биоэтилена в генетически модифицированных микроорганизмах будет адаптирована. 8. Способы получения этилена будут масштабированы.

Пример 5: Конструирование продукции АКГ в цианобактериях

[00104] Предыдущая работа показала, что удаление гена glgC приводит к увеличению продукции АКГ в цианобактериях. Также показано, что сверхэкспрессия гена pps (SEQ ID NO. 14, Genbank P74299), который кодирует фосфоенолпируватсинтазу (SEQ ID NO. 15), и гена gltA (SEQ ID NO. 16, Genbank Q59977), который кодирует цитратсинтазу (SEQ ID NO. 17), может усиливать продукцию АКГ в качестве субстрата для продукции других соединений. На основе данного исследования, выбирали две категории генов, включая гены, которые

непосредственно связаны с путями синтеза и секреции АКГ, включая *ppc* и *glfA* (сверхэкспрессия), и гены, которые участвуют в путях накопления энергии, включая *ggC* (делеция), который играет решающую роль в пути синтеза гликогена. Конструкцию *ppc-p2A-glfA* (SEQ ID NO. 18) создавали для клонирования в плазмиду рSyn6 перед интеграцией в *Synechococcus elongatus* и ростом трансформированных колоний. ПЦР (полимеразная цепная реакция) проводили на колониях рSyn6-PPC-*glfA* для подтверждения экспрессии конструкции в цианобактериях; наблюдали ожидаемый размер полос для PPC-*glfA* из 4621 пар оснований.

[00105] Для сверхэкспрессии АКГ в цианобактериях конструкцию гена IDH (SEQ ID NO: 19), который кодирует изоцитратдегидрогеназу (SEQ ID NO. 20), получали посредством клонирования гена IDH в плазмиду рSyn6. Успешное клонирование гена IDH в плазмиду рSyn6-IDH подтверждали посредством роста бактериальных колоний (Фиг. 5А) и посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг. 6). Штамм *Synechococcus elongatus* S2434-IDH, включающий конструкцию IDH, подтверждали посредством роста бактериальной культуры (Фиг. 9В) и гель-электрофореза, и анализа ДНК (Фиг. 9А). Показано, что рост клеточной культуры был улучшен значительно посредством повышения концентрации бикарбоната в среде для роста на 0,5 г/л или 1,0 г/л. Также получали и проверяли плазмиду для удаления гена *glgC* (SEQ ID NO. 21, Genbank CP000100.1), который кодирует глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу (SEQ ID NO. 22) в цианобактериях (*Synechococcus elongatus*).

Пример 6: Конструирование продукции сахарозы в цианобактериях

[00106] Для продукции сахарозы в цианобактериях получали конструкцию гена *cscB* из *E. coli* (SEQ ID. NO. 23, Genbank P300000), который кодирует сахарозопермеазу (SEQ ID NO. 24), посредством клонирования гена *cscB* в плазмиду рSyn6. Успешное клонирование гена *cscB* в конструкцию рSyn6-*cscB* подтверждали посредством роста колоний бактерий (Фиг. 5В) и посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг. 6). Штамм *Synechococcus elongatus* UTEX S2434 (S2434-*cscB*), включающий *cscB*, подтверждали посредством роста культуры бактерий (Фиг. 7В) и посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг. 7А).

[00107] Помимо сверхэкспрессии гена *cscB* и удаления гена *glgC*, другие гены-мишени включают сверхэкспрессию гена *sps* (SEQ ID NO. 25, Genbank A0A0H3K0V9), который кодирует сахарозофосфатсинтазу (SEQ ID NO. 26); гена *spp* (SEQ ID NO. 27, Genbank Q7BII3), который кодирует сахарозо-6-фосфатазу (SEQ ID

NO. 28), гена *glgP* (SEQ ID NO. 29, Genbank Q3IRP3), который кодирует гликогенфосфорилазу (SEQ ID NO. 30), и гена *galU* (SEQ ID NO. 31, Genbank P0AEP3), который кодирует UTP-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазу (SEQ ID NO. 32), для изменения направления промежуточных соединений пути в сторону сахарозы. Кроме того, удаление гена *inv* (SEQ ID NO. 33, Genbank P74573), который кодирует инвертазу (SEQ ID NO. 34), и ген *ggpS* (SEQ ID NO. 35, Genbank P74258), который кодирует глюкозилглицеролфосфатсинтазу (SEQ ID NO. 36), будет предотвращать превращение в альтернативные продукты; и удаление гена *glgA* (SEQ ID NO: 37, Genbank P74521), который кодирует гликогенсинтазу (SEQ ID NO.38), будет исключать превращение субстрата в гликоген, который потенциально может увеличивать выход сахарозы.

Пример 7: Конструирование продукции этилена в *E.coli*

[00108] Для конструирования продукции этилена в *E. coli* получали генетическую конструкцию pUC-EFE (SEQ ID NO. 39), кодирующую фермент, образующий этилен (EFE), под IPTG-индуцибельным промотором в плазмиде с большим числом копий, pUC19. Экспрессию плазмиды PUC-EFE в *E.coli* подтверждали посредством роста колоний на средах с агаром с добавлением ампициллина, IPTG и X-gal, и наблюдения ожидаемого размера полосы 2322 пар оснований посредством гель-электрофореза и анализа ДНК (Фиг.8А и Фиг. 8В). На Фиг. 8А, стрелка показывает ДНК-конструкцию EFE; на Фиг. 8В, стрелка показывает элемент ДНК, контролирующей число копий плазмиды. Результаты секвенирования ДНК подтвердили наличие плазмиды. Продукцию EFE подтверждали посредством анализа SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Уровни экспрессии этилена 5 мг/л и растворимость 30% наблюдали в условиях индукции 16 часов при 15 градусах Цельсия.

[00109] Для конструирования продукции этилена *E.coli* плазмиду конструировали для непрерывного получения EFE в *E. coli*. Во всех подходах экспрессия EFE осуществлялась под контролем промотора *psbA* хлоропласта. В первой конструкции EFE-AKGP-*psbA* (SEQ ID NO. 40), гены EFE и AKGP помещали под контроль промотора *psbA* (SEQ ID NO. 41) и терминатора *tmB* (SEQ ID NO. 42). Во второй конструкции EFE-*psbA* (SEQ ID NO. 43), только экспрессия гена EFE была помещена под контроль промотора *psbA* (SEQ ID NO. 41) и терминатора T7 (SEQ ID NO. 44). Обе конструкции клонировали в каркас плазмиды pUC19 для того, чтобы воспользоваться преимуществом большого числа копий плазмиды, перед

экспрессией белка в *E.coli* BL21 (DE3), DH5альфа или клеточных линиях MG1655. Конструировали плазмиду pUC-psb-EFE (SEQ ID NO. 45).

[00110] Измеряли эффект сред для роста, а также добавления АКГ и аргинина, оказываемый на продукцию этилена. Результаты показали, что максимум
5 продукции этилена 0,037 фунтов/галлон/месяц в случае *E.coli* BL 21 PUC19 EFE получали при ферментации в условиях, показанных в Таблице 1.

Таблица 1. Условия получения этилена в случае *E.coli* BL 21 PUC19 EFE при 30°C

10	Среда	MOPS
	Глюкоза	4 г/л
	IPTG	0,5 мМ
	Аргинин	3 мМ
	АКГ	2 мМ
15	Индукция	Индукцируемый в начале

[00111] Результаты наблюдаемой скорости роста *E. coli* BL 21 PUC19 EFE показаны на Фиг. 4А. Наблюдаемый выход этилена в условиях, показанных в
Таблице 1, показан на Фиг. 4В. Анализ на основе газовой хроматографии образцов
20 паровой фазы подтвердил продукцию этилена культурой *E. coli*.

ПРИЛОЖЕНИЕ

SEQ ID NO: 1-

MIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMTNLQTFELPTEVTGCAADISLG
 RALIQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFCKEPLTFKSSCVSDLTYSG
 5 YVASGEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQRVKAGWPCHGVPVWPNNTYQKSMKT
 FMEELGLAGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRVLRFPQTSTLSRGIGAHT
 DYGLLVIAAQDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAGMFEHDEPWTFVTPTPGV
 WTVFPGDILQFMTGGQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEPNFEASAYPLFEPSANERI
 HYGEHFTNMFMRCPDRITTQRINKENRLAHLEDLKKYSDTRATGS

10

SEQ ID NO: 2-

MTESITSNGLTVASDTRRRVVAIVSASSGNLVEWDFYVYSFCSLYFAHIFFPSGNTT
 TQLLQTAGVFAAGFLMRPIGGWLFGRADRRGRKTSMLISVCMFCGSLIIACLPGY
 DAIGTWAPALLLLARLFQGLSVGGEYGT SATYMSEIALEGRKGFYASFQYVTLIGGQ
 15 LLAILVVILQQILTDSQLHEWGWRIPFAMGAALAIVALWLRRLDETSQKEVRALK
 EAGSFKGLWRNRKAFLMVLGFTAGGSLSFYFTTYMQKYLVNTTGMHANVASVIM
 TAALFVFMLIQPLIGALS D KIGRRTSMLIFGGMSALCTVPILTALQHVSSPYAAFALV
 MLAMVIVSFYTSISGILKAEMFPAQVRALGVGLSYAVANALFGGSAEYVALSLKSW
 GSETTFFWYVTIMGALAFIVSLMLHRKKGK GIRL

20

SEQ ID NO: 3-

ATGATTCACGCCCGCTCGCGCTGGGGCGTGTTTCCCTCGCTGGGCCTGTGCAGCCC
 CGACGTGGTGTGGAACGAGCACCCGAGCCTGTACATGGACAAGGAGGAGACGTCTGA
 TGACCAACCTGCAGACGTTTCGAGCTGCCGACCGAGGTGACCGGCTGCGCCG
 25 CCGACATCTCCCTGGGCCGGGCGCTGATCCAGGCGTGCCAGAAGGACGGCATCT
 TCCAGATCAAGACCGACAGCGAGCAGGACCGGAAGACCCAGGAGGCGATGGCG
 GCCTCCAAGCAGTTCTGCAAGGAGCCCCTGACCTTCAAGTCGTCCTGCGTCAGCG
 ACCTGACCTACTCGGGCTACGTGGCCTCGGGCGAGGAGGTGACCGCCGGCAAGC
 CGGACTTTCCGGAGATCTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGACCAGC
 30 GGGTCAAGGCGGGCTGGCCCTGCCACGGCCCCGTGCCGTGGCCGAACAACACCT
 ACCAGAAGTCCATGAAGACGTTTCATGGAGGAGCTGGGCCTGGCCGGCGAGCGCC
 TGCTGAAGCTGACCGCGCTGGGCTTCGAGCTGCCATCAACACGTTACCGACCT
 GACCCGGGACGGCTGGCACCATGCGCGTCTGCGGTTTCCGCCCCAGACCAG
 CACGCTGAGCCGCGGCATTGGCGCGCACACGGACTACGGCCTGCTGGTGATTGC
 35 CGCGCAGGACGACGTGGGCGGCCTGTACATTGCCCGCCGGTGGAGGGCGAGAA
 GCGCAACCGGA ACTGGCTGCCCGGCGAGTCTCGGCGGGCATGTTTCGAGCACGA

CGAGCCCTGGACGTTTCGTGACCCCCACGCCGGGCGTGTGGACGGTGTTCCTCCGGC
 GACATCCTGCAGTTCATGACCGGCGGCCAGCTG
 CTGTGCGACGCCGCACAAGGTGAAGCTGAACACCCGGGAGCGCTTCGCCTGCGCG
 TACTTCCACGAGCCGAACCTTCGAGGCCTCGGCCTACCCCCTGTTTCGAGCCCTCCG
 5 CGAACGAGCGCATCCACTACGGCGAGCACTTCACCAATATGTTTATGCGCTGCTA
 CCCCACCGCATCACCAACCAGCGCATCAACAAGGAGAATCGCCTGGCGCACCT
 GGAGGACCTGAAGAAGTACAGCGACACCCGCGCCACCGGCTCG

SEQ ID NO: 4-

10 ATGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTTCCCTCACTAGGGTTATGCAGCC
 CGGACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTACATGGACAAAGAGGAAACCA
 GCATGACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGACCGAAGTGACCGGTTGCGCGG
 CGGACATCAGCCTGGGTCGTGCGCTGATTCAGGCGTGGCAAAGGATGGTATCT
 TCCAGATTAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAAGACCCAAGAAGCGATGGCG
 15 GCGAGCAAGCAATTTTGCAAAGAGCCGCTGACCTTCAAAGCAGCTGCGTTAGC
 GACCTGACCTACAGCGGTTATGTGGCGAGCGGCGAGGAAGTTACCGCGGGCAAG
 CCGGATTTCCCGGAAATTTTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGATCAGC
 GTGTTAAAGCGGGTTGGCCGTGCCATGGTCCGTTCCGTGGCCGAACAACACCTA
 TCAAAGAGCATGAAAACCTTTATGGAGGAACTGGGTCTGGCGGGCGAGCGTCT
 20 GCTGAAACTGACCGCGCTGGGTTTTGAACTGCCGATCAACACCTTCACCGACCTG
 ACCCGTGATGGCTGGCACCACATGCGTGTGCTGCGTTTCCCGCCGCAGACCAGCA
 CCCTGAGCCGTGGTATTGGTGCACACCGACTACGGTCTGCTGGTGATTGCGGC
 GCAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATATCCGTCCGCCGGTGGAGGGCGAAAAGCG
 TAACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCAGCGCGGGCATGTTTGAGCACGACGA
 25 ACCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTGTGTGGACCGTTTTTCCGGGCGAT
 ATTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGAGCACCCCGCACAAGGTTAAAC
 TGAACACCCGTGAACGTTTTCGCGTGCAGTACTTTCACGAGCCGAACCTTCGAAGC
 GAGCGCGTATCCGCTGTTTCGAGCCGAGCGCGAACGAACGTATCCACTACGGCGA
 GCACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCGGATCGTATCACCAACCAACGT
 30 ATTAACAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAAGACCTGAAGAAATACAGCGAC
 ACCCGTGCGACCGGCAGC

SEQ ID NO: 5-

MIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMTNLQTFELPTEVTGCAADISLG
 35 RALIQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFCKEPLTFKSSCVSDLTYSG
 YVASGEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQRVKAGWPCHGPVWPNNYQKSMKT

FMEELGLAGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRVLRFPQTSTLSRGIGAHT
 DYGLLVIAAQDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAGMFEHDEPWTFVTPTPGV
 WTVFPGDILQFMTGGQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEPNFEASAYPLFEPSANERI
 HYGEHFTNMFMRCYPDRITTQRINKENRLAHLEDLKKYSDTRATGSGATNFSLLKQ
 5 AGDVEENPGPMTESITSNGLTVASDTRRRVWAIVSASSGNLVEWDFYVYSFCSLYF
 AHIFFPSGNTTTQLLQTAGVFAAGFLMRPIGGWLFGRADRRGRKTSMLISVCMCMCF
 GSLIIACLPGYDAIGTWAPALLLLARLFQGLSVGGEYGTSATYMSEIALEGRKGFYAS
 FQYVTLIGGQLLAILVVILQQILTDSQLHEWGWRIPFAMGAALAIVALWLRRLDE
 TSQKEVRALKEAGSFKGLWRNRKAFLMVLGFTAGGSLSFYTFTTYMQKYL VNTTG
 10 MHANVASVIMTAALFVFM LIQPLIGALS DKIGRRTSMLIFGGMSALCTVPILTALQHV
 SSPYAAFALVMLAMVIVSFYTSISGILKAEMFPAQVRALGVGLSYAVANALFGGSAE
 YVALSLKSWGSETTFFWYVTIMGALAFIVSLMLHRKKG GIRL

SEQ ID. NO: 6-

15 MHHHHHHENLYFQGKLMIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMT
 NLQTFELPTEVTGCAADISLGRALIQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFC
 KEPLTFKSSCVSDLTYSGYVASGEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQQRVKAGWPCH
 GPVPWPNTYQKSMKTFMEELGLAGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRV
 LRFPPQTSTLSRGIGAHTDYGLLVIAAQDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAG
 20 MFEHDEPWTFVTPTPGVWTVFPGDILQFMTGGQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEP
 NFEASAYPLFEPSANERIH YGEHFTNMFMRCYPDRITTQRINKENRLAHLEDLKKYS
 DTRATGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMTESITSNGLTVASDTRRRVWAIVSASSGN
 LVEWDFYVYSFCSLYFAHIFFPSGNTTTQLLQTAGVFAAGFLMRPIGGWLFGRADRR
 RGRKTSMLISVCMCMCFGSLIIACLPGYDAIGTWAPALLLLARLFQGLSVGGEYG TSA
 25 TYMSEIALEGRKGFYASFQYVTLIGGQLLAILVVILQQILTDSQLHEWGWRIPFAMG
 AALAIVALWLRRLDETSQKEVRALKEAGSFKGLWRNRKAFLMVLGFTAGGSLSFY
 TFTTYMQKYL VNTTGMHANVASVIMTAALFVFM LIQPLIGALS DKIGRRTSMLIFGG
 MSALCTVPILTALQHVSSPYAAFALVMLAMVIVSFYTSISGILKAEMFPAQVRALGV
 GLSYAVANALFGGSAEYVALSLKSWGSETTFFWYVTIMGALAFIVSLMLHRKKGKI RL
 30

SEQ ID NO: 7-

ATGATTCATGCCCCCTCCCGCTGGGGCGTGTTTCCCAGTCTGGGTCTCTGCTCCCCC
 GATGTGGTGTGGAACGAACACCCCAGCCTGTACATGGATAAGGAAGAGACCAG
 TATGACCAATCTGCAAACCTTTGAACTGCCACCGAGGTGACCGGTTGCGCCGCC
 35 GATATTAGCCTCGGTCGCGCCCTGATTCAAGCCTGGCAAAGGATGGCATCTTCC

AAATCAAGACCGATTCCGAACAAGATCGCAAGACCCAAGAGGCCATGGCCGCCA
GCAAACAATTTTGCAAGGAACCCCTGACCTTTAAATCCAGCTGCGTGAGCGATCT
CACCTACAGTGGCTATGTGGCCAGTGGTGAAGAGGTGACCGCCGGCAAGCCCGA
TTTTCCCGAGATTTTTACCGTGTGCAAGGATCTGAGTGTGGGTGATCAACGCGTG
5 AAAGCCGGTTGGCCCTGCCATGGTCCCGTGCCCTGGCCCAACAATACCTATCAA
AATCCATGAAGACCTTTATGGAAGAACTCGGTCTGGCCGGTGAACGCCTGCTCA
AACTGACCGCCCTCGGCTTTGAGCTGCCATTAACACCTTTACCGATCTCACCCG
CGATGGTTGGCACCACATGCGCGTGCTGCGCTTTCTCCCAAACCAGCACCCCTG
AGCCGCGGTATTGGTGCCACACCGATTACGGCCTGCTCGTGATTGCCGCCCAAG
10 ATGATGTGGGCGGTCTGTATATTCGCCCTCCCGTGGAAGGCGAGAAACGCAACC
GCAATTGGCTCCCCGGCGAAAGTTCCGCCGGCATGTTTGAACACGATGAACCCTG
GACCTTTGTGACGCCACGCCCGGCGTGTGGACCGTGTTTCCCGGTGATATTCTG
CAATTTATGACCGGCGGTCAACTGCTCTCCACGCCCCACAAAGTGAAGCTCAACA
CCCGCGAACGCTTTGCCTGCGCCTACTTTACGAACCCAATTTTGAGGCCAGTGC
15 CTATCCCCTGTTTGAACCCTCCGCCAACGAGCGCATTCACTACGGCGAGCACTTT
ACCAATATGTTTATGCGCTGCTATCCCGATCGCATTACCACCCAACGCATTAACA
AGGAAAATCGCCTGGCCACCTCGAGGATCTGAAAAGTATAGTGATACCCGCG
CCACCGGTAGTGGTGCCACCAACTTTAGCCTGCTCAAACAAGCCGGCGATGTGG
AAGAGAACCCCGGTCCCATGACCGAAAGTATTACCAGCAATGGCACCCCTGGTGG
20 CCAGTGATACCCGTGCGCGCGTGTGGGCCATTGTGAGTGCCAGCAGTGGTAACCT
GGTGGAGTGGTTTGATTTTTACGTGTATAGCTTTTGCAGTCTCTACTTTGCCACA
TTTTCTTTCCAGTGGCAATACCACCACCCAAGTCTGCAAACCGCCGGCGTGT
TGCCGCCGGTTTTCTGATGCGCCCCATTGGCGGTTGGCTCTTTGGCCGCATTGCCG
ATCGTCGCGGTGCAAGACCAGCATGCTGATTAGCGTGTGCATGATGTGCTTTGG
25 CTCCCTGATTATTGCCTGCCTCCCCGGCTATGATGCCATTGGCACCTGGGCCCCC
GCCCTGCTCCTGCTGGCCCGCCTCTTTCAAGGCCTGAGCGTGGGCGGTGAATACG
GCACCAGCGCCACCTATATGAGTGAAATTGCCCTGGAGGGCCGCAAAGGTTTTT
ACGCCAGTTTTCAATATGTGACCCTGATTGGCGGTCAACTGCTCGCCATTCTCGT
GGTGGTGATTCTCCAACAAATTCTGACCGATTCCCAACTGCACGAATGGGGCTGG
30 CGCATTCCCTTTGCCATGGGTGCCGCCCTGGCCATTGTGGCCCTGTGGCTCCGTC
GCCAACTCGATGAAACCAGCCAAAAGAGGTGCGCGCCCTGAAAGAAGCCGGC
AGTTTTAAAGGTCTCTGGCGCAACCGCAAGGCCTTTCTCATGGTGCTGGGCTTTA
CCGCCGGCGGTAGTCTGTCTTTTACACCTTTACCACCTACATGCAAAAATATCT
CGTGAACACCACCGGCATGCACGCCAATGTGGCCAGCGTGATTATGACCGCCGC
35 CCTGTTTGTGTTTATGCTCATTCAACCCTGATTGGCGCCCTCAGCGATAAGATTG
GTCGTGCGACCAGTATGCTGATTTTTGGCGGTATGAGTGCCCTCTGCACCGTGCC

CATTCTCACCGCCCTGCAACACGTGTCCAGCCCCTACGCCGCCTTTGCCCTCGTG
 ATGCTGGCCATGGTGATTGTGTCCTTTTATAACCAGCATTAGTGGCATTCTGAAGG
 CCGAAATGTTTCCCGCCCAAGTGC GCGCCCTGGGCGTGGGTCTCAGTTACGCCGT
 GGCCAATGCCCTGTTTGGCGGTTCCGCCGAATATGTGGCCCTGTCCCTCAAAGC
 5 TGGGGCAGTGAGACCACCTTTTTCTGGTACGTGACCATTATGGGTGCCCTGGCCT
 TTATTGTGAGCCTGATGCTCCACCGCAAAGGCAAGGGTATTCGCCTCTAG

SEQ ID NO: 8-

CATATG

10 SEQ ID NO: 9-

CACCACCACCATCATCATTAAATGAAAGCTT

SEQ ID NO: 10-

MHHHHHHENLYFQGKL

SEQ ID NO: 11-

15 GATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 12-

AAGCTT

SEQ ID NO: 13-

GGTACC

20

SEQ ID NO: 14-

ATGACTGATTTTTTACGCGATGACATCAGGTTCTCGGTCAAATCCTCGGTGAGG
 TAATTGCGGAACAAGAAGGCCAGGAGGTTTATGAACTGGTTCGAACAAGCGCGCC
 TGA CT TCTTTT GATATCGCCAAGGGCAACGCCGAAATGGATAGCCTGGTTCAGGT
 25 TTTGACGGCATTACTCCAGCCAAGGCAACACCGATTGCTCGCGCATTTTCCCAC
 TTCGCTCTGCTGGCTAACCTGGCGGAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAAC
 AGGCTCTCGATGCAGGCGACACCCCTCCGGACAGCACTCTTGATGCCACCTGGCT
 GAAACTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGGCCGATGTGCTGCGCAA
 TGCTGAGGTGGCGCCGTTCTGACTGCGCACCCA ACTGAGACTCGCCGCCGCACT
 30 GTTTTTGATGCGCAAAGTGGATCACCACCCACATGCGTGAACGCCACGCTTTGC
 AGTCTGCGGAGCCTACCGCTCGTACGCAAAGCAAGTTGGATGAGATCGAGAAGA
 ACATCCGCCGTGCGATCACCATTTTGTGGCAGACCGCGTTGATTCGTGTGGCCCG
 CCCACGTATCGAGGACGAGATCGAAGTAGGGCTGCGCTACTACAAGCTGAGCCT
 TTTGGAAGAGATTCCACGTATCAACCGTGATGTGGCTGTTGAGCTTCGTGAGCGT
 35 TTCGGCGAGGGTGTTCCTTTGAAGCCCGTGGTCAAGCCAGGTTCTGGATTGGTG
 GAGACCACGACGGTAACCCTTATGTCACCGCGGAAACAGTTGAGTATTCCACTC

ACCGCGCTGCGGAAACCGTGCTCAAGTACTATGCACGCCAGCTGCATTCCCTCGA
GCATGAGCTCAGCCTGTCGGACCGCATGAATAAGGTCACCCCGCAGCTGCTTGC
GCTGGCAGATGCAGGGCACAACGACGTGCCAAGCCGCGTGGATGAGCCTTATCG
ACGCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTATCCTCGCGACGACGGCCGAGCTGAT
5 CGGCGAGGACGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACTCCATACGCATCT
CCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGCGTGAATCCA
AGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTGTGCTGATTTCTGCCATCGAGAG
CTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGCGCCAAAACCTCCGAAAGCTACGAG
GACGTCCACCGAGCTTTTTCGAACGCGCCCAAGTCACCGCAAACCTACCGCGAG
10 CTGTCTGAAGCAGAGAACTTGAGGTGCTGCTGAAGGAACTGCGCAGCCCTCGT
CCGCTGATCCCGCACGGTTCAGATGAATACAGCGAGGTCACCGACCGCGAGCTC
GGCATCTTCCGCACCGCGTTCGGAGGCTGTTAAGAAATTCGGGCCACGGATGGTG
CCTCACTGCATCATCTCCATGGCATCATCGGTACCGATGTGCTCGAGCCGATGG
TGTTGCTCAAGGAATTCGGACTCATCGCAGCCAACGGCGACAACCCACGCGGCA
15 CCGTCGATGTCATCCCCTGTTGAAACCATCGAAGATCTCCAGGCCGGCGCCGG
AATCCTCGACGAACTGTGGAAAATTGATCTCTACCGCAACTACCTCCTGCAGCGC
GACAACGTCCAGGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCCAACAAGGATGGCGGA
TATTTCTCCGCAAACCTGGGCGCTTTACGACGCGGAACTGCAGCTCGTGAACAT
GCCGATCAGCCGGGGTCAACGTTGCCTGTTCCACGGCCGTGGTGGCACCGTCCG
20 CCGCGGTGGCGGACCTTCTACGACGCGATTCTTGCCAGCCAGGGGGGCTGT
CAAGGTTCCGTGCGCATCACCGAGCAGGGCGAGATCATCTCCGCTAAGTACGGC
AACCCCGAAACCGCGCGCCGAAACCTCGAAGCCCTGGTCTCAGCCACGCTTGAG
GCATCGCTTCTCGACGTCTCCGAACTCACCGATCACCAACGCGCGTACGACATCA
TGAGTGAGATCTCTGAGCTCAGCTTGAAGAAGTACGCCTCCTTGGTGCACGAGG
25 ATCAAGGCTTCATCGATTACTTACCCAGTCCACGCCGCTGCAGGAGATTGGATC
CCTCAACATCGGATCCAGGCCTTCTCACGCAAGCAGACCTCCTCGGTGGAAGAT
TTGCGAGCCATCCCATGGGTGCTCAGCTGGTCCAGTCTCGTGTGATGCTGCCAG
GCTGGTTTTGGTGTGCGAACCGCATTAGAGCAGTGGATTGGCGAAGGGGAGCAGG
CCACCCAACGCATTGCCGAGCTGCAAACACTCAATGAGTCCTGGCCATTTTTACC
30 CTCAGTGTTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAAGGCAGAGCTGCGTTTGGCA
AAGCTCTACGCAGACCTGATCCCAGATACGGAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCC
GTCATCCGCGAGGAGTACTTCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCT
CTGATGATCTGCTTGTGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGCGCCGATA
CCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGACGCTACCGA
35 AAAGGCGACCAAAGCGAGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCATGAACGGT
CTTTCCACTGCGGTGCGCAACTCCGGC

SEQ ID NO: 15-

MTDFLRDDIRFLGQILGEVIAEQEGQEVYELVEQARLTSFDIAKGNAEMDSLQVFDGI
 TPAKATPIARAFSHFALLANLAEDLYDEELREQALDAGDTPPDSTLDATWLKLINE
 5 GNVGAEAVADVLRNAEVAPVLT AHPTETRRRTVFDAQKWITTHMRERHALQSAEP
 TARTQSKLDEIEKNIRRRITILWQTALIRVARPRIEDEIEVGLRYYKLSLLEEIPRINRDV
 AVELRERFGEGVPLKPVVKPGSWIGGDHDGNPYVTAETVEYSTHRAAETVLKYYAR
 QLHSLEHELSSLDRMNKVTPQLLALADAGHNDVPSRVDEPYRRAVHGVRGRILATT
 AELIGEDAVEGWVFKVFTPYASPEEFLNDALTIDHSLRESKDVLIADDRLSVLISAIES
 10 FGFNLYALDLRQNSESYEDVLT ELFERAQVTANYRELSEAEKLEVLLKELRSPRPLIP
 HGSDEYSEVTDRELGIFRTASEAVKKFGPRMVPHCIISSMASSVTDVLEPMVLLKEFGL
 IAANGDNPRGTVDVIPLFETIEDLQAGAGILDELWKIDLYRNYLLQRDNVQEVMLGY
 SDSNKDGGYFSANWALYDAELQLVELCRSAGVNVRLFHGRGGTVGRGGGPSYDAI
 LAQPRGAVQGSVWRITEQGEIISAKYGNPETARRNLEALVSATLEASLLDVSELTDHQR
 15 AYDIMSEISELSLKKYASLVHEDQGFIDYFTQSTPLQEIGSLNIGSRPSSRKQTSSVEDL
 RAIPWVLSWSQSRVMLPGWFGVGTALEQWIGEGEQATQRIAEQLTLNESWPFLPSV
 LDNMAQVMSKAELRLAKLYADLIPDEVAERVYSVIREEYFLTKKMFCVITGSDDL
 DDNPLLARSVQRRYPYLLPLNVIQVEMMRRYRKGDQSEQVSRNIQLTMNGLSTAVR
 NSG

20

SEQ ID NO: 16-

ATGTTTGAAGGGATATCGTGGCTACTGATAACAACAAGGCTGTCCTGCACTACCCCG
 GTGGCGAGTTCGAAATGGACATCATCGAGGCTTCTGAGGGTAACAACGGTG
 TTGTCCTGGGCAAGATGCTGTCTGAGACTGGACTGATCACTTTTGACCCAGGTTA
 25 TGTGAGCACTGGCTCCACCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATGGCGATGCGGG
 AATCCTGCGTTACCGCGGCTATGACATCGCTGATCTGGCTGAGAATGCCACCTC
 AACGAGGTTTCTTACTACTTATCAACGGTGAGCTACCAACCCAGATGAGCTTC
 ACAAGTTTAAACGACGAGATTCGCCACCACACCCTTCTGGACGAGGACTTCAAGTC
 CCAGTTCAACGTGTTCCACGCGACGCTCACCCAATGGCAACCTTGGCTTCTCTCG
 30 GTTAACATTTTGTCTACTACTACCAGGACCAGCTGAACCCACTCGATGAGGCAC
 AGCTTGATAAGGCAACCGTTCGCCTCATGGCAAAGGTTCCAATGCTGGCTGCGTA
 CGCACACCGCGCACGCAAGGGTGCTCCTTACATGTACCCAGACAACCTCCCTCAAT
 GCGCGTGAGAACTTCTGCGCATGATGTTCCGGTTACCCAACCGAGCCATACGAG
 ATCGACCCAATCATGGTCAAGGCTCTGGACAAGCTGCTCATCCTGCACGCTGACC
 35 ACGAGCAGAACTGCTCCACCTCCACCGTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCCAA

CATGTTTGTCTCCATCGCTGGTGGCATCAACGCTCTGTCCGGCCCACTGCACGGT
 GGCGCAAACCAGGCTGTTCTGGAGATGCTCGAAGACATCAAGAGCAACCACGGT
 GGCGACGCAACCGAGTTCATGAACAAGGTCAAGAACAAGGAAGACGGCGTCCG
 CCTCATGGGCTTCGGACACCGCGTTTACAAGA ACTACGATCCACGTGCAGCAATC
 5 GTCAAGGAGACCGCACACGAGATCCTCGAGCACCTCGGTGGCGACGATCTTCTG
 GATCTGGCAATCAAGCTGGAAGAAATTGCACTGGCTGATGATTACTTCATCTCCC
 GCAAGCTCTACCCGAACGTAGACTTCTACACCGGCCTGATCTACCGCGCAATGGG
 CTTCCCAACTGACTTCTTCACCGTATTGTTTCGCAATCGGTCTGTCTGCCAGGATGG
 ATCGCTCACTACCGCGAGCAGCTCGGTGCAGCAGGCAACAAGATCAACCGCCCA
 10 CGCCAGGTCTACACCGGCAACGAATCCCGCAAGTTGGTTCCTCGCGAGGAGCGC
 TAA

SEQ ID NO: 17-

MFERDIVATDNNKAVLHYPGGEFEMDIEASEGNNGVVLGKMLSETGLITFDPGYVSTGST
 15 ESKITYIDGDAGILRYRGYDIADLAENATFNEVSYLLINGELPTPDELHKFNDEI
 RHHTLLDEDFKSQFNVFPRAHPMATLASSVNILSTYYQDQLNPLDEAQLDKATVRL
 MAKVPMLAAYAHRARKGAPYMYPDNSLNARENFLRMMFGYPTEPYEIDPIMVKAL
 DKLLILHADHEQNCSTSTVRMIGSAQANMFVSIAGGINALSGPLHGGANQAVLEMLE
 DIKSNHGGDATEFMNKVKNKEDGVRLMGFGHRVYKNYDPRAAIVKETAHEILEHL
 20 GGDDLLDLAIKLEEIALADDYFISRKLYPNVDFYTGLIYRAMGFPTDFFTFLFAIGRLP
 GWIAHYREQLGAAGNKINRPRQVYTGNESRKLVPREER

SEQ ID NO: 18-

ATGACTGATTTTTTACGCGATGACATCAGGTTCTCGGTCAAATCCTCGGTGAGGTAA
 25 TTGCGGAACAAGAAGGCCAGGAGGTTTATGAACTGGTCAACAAGCGCGCC
 TGACTTCTTTTATGATATCGCCAAGGGCAACGCCGAAATGGATAGCCTGGTTCAGGT
 TTTTCGACGGCATTACTCCAGCCAAGGCAACACCGATTGCTCGCGCATTTTCCCAC
 TTCGCTCTGCTGGCTAACCTGGCGGAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAAC
 AGGCTCTCGATGCAGGCGACACCCCTCCGGACAGCACTCTTGATGCCACCTGGCT
 30 GAAACTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGGCCGATGTGCTGCGCAA
 TGCTGAGGTGGCGCCGTTCTGACTGCGCACCCAACTGAGACTCGCCGCCGCACT
 GTTTTTGATGCGCAAAGTGGATCACCACCCACATGCGTGAACGCCACGCTTTGC
 AGTCTGCGGAGCCTACCGCTCGTACGCAAAGCAAGTTGGATGAGATCGAGAAGA
 ACATCCGCCGTCGCATCACCATTTTGTGGCAGACCGCGTTGATTCGTGTGGCCCG
 35 CCCACGTATCGAGGACGAGATCGAAGTAGGGCTGCGCTACTACAAGCTGAGCCT

TTTGGAAGAGATTCCACGTATCAACCGTGATGTGGCTGTTGAGCTTCGTGAGCGT
TTCGGCGAGGGTGTTCCTTTGAAGCCCGTGGTCAAGCCAGGTTCCCTGGATTGGTG
GAGACCACGACGGTAACCCTTATGTCACCGCGGAAACAGTTGAGTATTCCACTC
ACCGCGCTGCGGAAACCGTGCTCAAGTACTATGCACGCCAGCTGCATTCCCTCGA
5 GCATGAGCTCAGCCTGTCCGACCGCATGAATAAGGTCACCCCGCAGCTGCTTGC
GCTGGCAGATGCAGGGCACAACGACGTGCCAAGCCGCGTGGATGAGCCTTATCG
ACGCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTATCCTCGCGACGACGGCCGAGCTGAT
CGGCGAGGACGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACTCCATACGCATCT
CCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGCGTGAATCCA
10 AGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTGTGCTGATTTCTGCCATCGAGAG
CTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGCGCCAAACTCCGAAAGCTACGAG
GACGTCTCACCGAGCTTTTCGAACGCGCCCAAGTCACCGCAAACCTACCGCGAG
CTGTCTGAAGCAGAGAACTTGAGGTGCTGCTGAAGGAACTGCGCAGCCCTCGT
CCGCTGATCCCGCACGGTTCAGATGAATACAGCGAGGTCACCGACCGCGAGCTC
15 GGCATCTTCCGCACCGCGTCCGAGGCTGTTAAGAAATTCCGGGCCACGGATGGTG
CCTCACTGCATCATCTCCATGGCATCATCGGTCACCGATGTGCTCGAGCCGATGG
TGTTGCTCAAGGAATTCGGACTCATCGCAGCCAACGGCGACAACCCACGCGGCA
CCGTCGATGTCATCCCCTGTTTCGAAACCATCGAAGATCTCCAGGCCGGCGCCGG
AATCCTCGACGAACTGTGGAAAATTGATCTCTACCGCAAACCTACCTCCTGCAGCGC
20 GACAACGTCCAGGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCCAACAAGGATGGCGGA
TATTTCTCCGCAAACCTGGGCGCTTTACGACGCGGAACTGCAGCTCGTCAACTAT
GCCGATCAGCCGGGGTCAACGTTCCGCTGTTCCACGGCCGTGGTGGCACCGTCGG
CCGCGGTGGCGGACCTTCTACGACGCGATTCTTGCCAGCCAGGGGGGCTGTG
CAAGGTTCCGTGCGCATCACCGAGCAGGGCGAGATCATCTCCGCTAAGTACGGC
25 AACCCCGAAACCGCGCGCCGAAACCTCGAAGCCCTGGTCTCAGCCACGCTTGAG
GCATCGCTTCTCGACGTCTCCGAACTCACCGATACCAACGCGCGTACGACATCA
TGAGTGAGATCTCTGAGCTCAGCTTGAAGAAGTACGCCTCCTTGGTGCACGAGG
ATCAAGGCTTCATCGATTACTTCACCCAGTCCACGCCGCTGCAGGAGATTGGATC
CCTCAACATCGGATCCAGGCCTTCTCACGCAAGCAGACCTCCTCGGTGGAAGAT
30 TTGCGAGCCATCCCATGGGTGCTCAGCTGGTCCAGTCTCGTGTATGCTGCCAG
GCTGGTTTTGGTGTCCGAAACCGCATTAGAGCAGTGGATTGGCGAAGGGGAGCAGG
CCACCCAACGCATTGCCGAGCTGCAAACACTCAATGAGTCCTGGCCATTTTTACC
CTCAGTGTTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAAGGCAGAGCTGCGTTTGGCA
AAGCTCTACGCAGACCTGATCCAGATACGGAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCC
35 GTCATCCGCGAGGAGTACTTCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCT
CTGATGATCTGCTTGTGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGCGCCGATA

CCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGACGCTACCGA
AAAGGCGACCAAAGCGAGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCATGAACGGTCTT
TCCACTGCGGTGCGCAACTCCGGCGCCACCAACTCAACTCCGGCGCCACCAA
CTTTAGCCTGCTCAAACAAGCCGGCGATGTGGAAGAGAACCCCGGTCCCATGTTT
5 GAAAGGGATATCGTGGCTACTGATAACAACAAGGCTGTCCTGCACTACCCCGGT
GGCGAGTTCGAAATGGACATCATCGAGGCTTCTGAGGGTAACAACGGTGTTGTC
CTGGGCAAGATGCTGTCTGAGACTGGACTGATCACTTTTGACCCAGGTTATGTGA
GCACTGGCTCCACCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATGGCGATGCGGGAATCC
TGCGTTACCGCGGCTATGACATCGCTGATCTGGCTGAGAATGCCACCTTCAACGA
10 GGTTTCTTACCTACTTATCAACGGTGAGCTACCAACCCAGATGAGCTTCACAAG
TTTAACGACGAGATTGCGCCACCACACCCTTCTGGACGAGGACTTCAAGTCCCAGT
TCAACGTGTTCCACGCGACGCTCACCCAATGGCAACCTTGGCTTCTCGGTAA
CATTTTGTCTACCTACTACCAGGACCAGCTGAACCCACTCGATGAGGCACAGCTT
GATAAGGCAACCGTTTCGCCTCATGGCAAAGGTTCCAATGCTGGCTGCGTACGCA
15 CACCGCGCACGCAAGGGTGCTCCTTACATGTACCCAGACAACCTCCCTCAATGCGC
GTGAGAACTTCTGCGCATGATGTTGCGTTACCCAACCGAGCCATACGAGATCGA
CCCAATCATGGTCAAGGCTCTGGACAAGCTGCTCATCCTGCACGCTGACCACGAG
CAGAACTGCTCCACCTCCACCGTTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCCAACATGT
TTGTCTCCATCGCTGGTGGCATCAACGCTCTGTCCGGCCCACTGCACGGTGGCGC
20 AAACCAGGCTGTTCTGGAGATGCTCGAAGACATCAAGAGCAACCACGGTGGCGA
CGCAACCGAGTTCATGAACAAGGTCAAGAACAAGGAAGACGGCGTCCGCCTCAT
GGGCTTCGGACACCGCGTTTACAAGAACTACGATCCACGTGCAGCAATCGTCAA
GGAGACCGCACACGAGATCCTCGAGCACCTCGGTGGCGACGATCTTCTGGATCT
GGCAATCAAGCTGGAAGAAATTGCACTGGCTGATGATTACTTCATCTCCCGCAAG
25 CTCTACCCGAACGTAGACTTCTACACCGGCCTGATCTACCGCGCAATGGGCTTCC
CAACTGACTTCTTACCGTATTGTTTCGCAATCGGTCGTCTGCCAGGATGGATCGC
TCACTACCGCGAGCAGCTCGGTGCAGCAGGCAACAAGATCAACCGCCCACGCCA
GGTCTACACCGGCAACGAATCCCGCAAGTTGGTTCTCGCGAGGAGCGCTAA

30 SEQ ID NO: 19-

ATGTACGAGAAGATTCAACCCCCTAGCGAAGGCAGCAAAATTCGCTTTGAAGCC
GGCAAGCCGATCGTTCCCGACAACCCGATCATTCCCTTCATTTCGTGGTGACGGCG
CTGGCGTTGATATCTGGCCCGCAACTGAGCGCGTTCTCGATGCCGCTGTCGCTAA
AGCCTATGGCGGTCAGCGCAAAATCACTTGGTTCAAAGTCTACGCGGGTGATGA
35 AGCCTGCGACCTCTACGGCACCTACCAATATCTGCCTGAAGATACGCTGACAGCG
ATCCGCGAGTACGGCGTGGCAATCAAAGGCCCGCTGACGACGCCGATCGGTGGT

GGCATTGATCGCTGAACGTGGCGCTACGGCAAATCTTCGATCTCTATGCCTGCG
 TCCGCCCCTGTCGCTACTACACCGGCACACCCTCGCCCCACCGCACGCCCGAACA
 ACTCGATGTGGTGGTCTACCGCGAAAACACCGAGGATATCTACCTCGGCATCGA
 ATGGAAGCAAGGTGATCCCACCGGCGATCGCCTGATCAAGCTGCTGAACGAGGA
 5 CTTCAATCCCAACAGCCCCAGCTTGGGTAAAAAGCAAATCCGTTTGGATTCCGGC
 ATTGGTATTAAGCCGATCAGTAAAACGGGTAGCCAGCGTCTGATTTCGTCGTGCGA
 TCGAGCATGCCCTACGCCTCGAAGGCCGCAAGCGACATGTCACCCTTGTCCACAA
 GGGCAACATCATGAAGTTCACGGAAGGTGCTTTCCGGGACTGGGGCTATGAACT
 GGCCACGACTGAGTTCCGAACCGACTGTGTGACTGAACGGGAGAGCTGGATTCT
 10 TGCCAACCAAGAAAGCAAGCCGGATCTCAGCTTGGAAAGACAATGCGCGGCTCAT
 CGAACCTGGCTACGACGCGATGACGCCCCGAAAAGCAGGCAGCAGTGGTGGCTGA
 AGTGAAAGCTGTGCTCGACAGCATCGGCGCCACCCACGGCAACGGTCAGTGGAA
 GTCTAAGGTGCTGGTTGACGATCGCATTGCTGACAGCATCTTCCAGCAGATTCAA
 ACCCGCCCCGGGTGAATACTCGGTGCTGGCGACGATGAACCTCAATGGCGACTAC
 15 ATCTCTGATGCAGCGGCGGCGGTGGTGGTGGCCTGGGCATGGCCCCCGGTGCC
 AACATTGGCGACGAAGCGGCGATCTTTGAAGCGACCCACGGCGCAGCGCCCAAG
 CACGCTGGCCTCGATCGCATTAAACCCCGGCTCGGTCATCCTCTCCGGCGTGATGA
 TGCTGGAGTACCTAGGCTGGCAAGAGGCTGCTGACTTGATACCAAGGGCATCA
 GCCAAGCGATCGCTAACCGTGAGGTACCTACGATCTGGCTCGGTTGATGGAAC
 20 CGGCGGTTGATCAACCACTCAAGTGCTCGGAATTTGCCGAAGCCATCGTCAAGC
 ATTCGACGATTAG

SEQ ID NO: 20-

MYEKIQPPSEGSKIRFEAGKPIVPDNPIIPFIRGDGTGVDIWPATERVLDAAVAKAYGG
 25 QRKITWFKVYAGDEACDLYGTYQYLPEDTLTAIREYGVAIKGPLTTPIGGGIRSLNVA
 LRQIFDLYACVRPCRYTGTSPHRTPEQLDVVVYRENTEDIYLGIEWKQGDPTGDR
 LIKLLNEDFIPNSPSLGGKQIRLDSGIGIKPISKTGSQRLIRRAIEHALRLEGRKRHVTLV
 HKGNIMKFTGAFRDWGYELATTEFRDTCVTERESWILANQESKPDLSLEDNARLIE
 PGYDAMTPEKQAAVVAEVKAVLDSIGATHGNGQWKSJVLVDDRIADSIFQQIQTRP
 30 GEYSVLATMNLNGDYISDAAAAVVGLGMAPGANIGDEAAIFEATHGTAPKHAGL
 DRINPGSVILSGVMMLEYLQWQEAADLITKGISQAIANREVTYDLARLMPEAVDQPL
 KCSEFAEAIVKHFDD

SEQ ID NO: 21-

35 GTGAAAACGTGCTGGCGATCATTCTCGGTGGAGGCGCAGGCAGTCGTCTCTATCC
 ACTAACCAACAGCGCGCCAAACCAGCGGTCCCCCTGGCGGGCAAATACCGCT

TGATCGATATTCCCGTCAGCAATTGCATCAACGCTGACATCAACAAAATCTATGT
 GCTGACGCAGTTTAACTCTGCCTCGCTCAACCGCCACCTCAGTCAGACCTACAACCTC
 TCCAGCGGCTTTGGCAATGGCTTTGTTGAGGTGCTAGCAGCTCAGATTACGCCGGAG
 A ACCCCAACCTGGTTCCAAGGCACCGCCGATGCGGTTCCGCCAGTATCTCTGGCTAAT
 5 CAAAGAGTGGGATGTGGATGAGTACCTGATCCTGTCTGGGGGATCATCTCTACCG
 CATGGACTATAGCCAGTTCATTCAGCGGCACCGAGACACCAATGCCGACATCAC
 ACTCTCGGTCTTGCCGATCGATGAAAAGCGCGCCTCTGATTTTGGCCTGATGAAG
 CTAGATGGCAGCGGCCGGGTGGTTCGAGTTCAGCGAAAAGCCCAAAGGGGATGA
 ACTCAGGGCGATGCAAGTCGATAACCACGATCCTCGGGCTTGACCCTGTCGCTGCT
 10 GCTGCCAGCCCTTCATTGCCTCGATGGGCATCTACGTCTTCAAGCGGGATGTTT
 TGATCGATTTGCTCAGCCATCATCCCGAGCAAACCGACTTTGGCAAGGAAGTGAT
 TCCCGCTGCAGCCACCCGCTACAACACCCAAGCCTTTCTGTTCAACGACTACTGG
 GAAGACATCGGCACGATCGCCTCATTCTACGAGGCCAATCTGGCGCTGACTCAG
 CAACCTAGCCCACCCTTCAGCTTCTACGACGAGCAGGCGCCGATTTACACCCGCG
 15 CTCGCTACCTGCCGCCAACCAAGCTGCTCGATTGCCAGGTGACCCAGTCGATCAT
 TGGCGAGGGCTGCATTCTCAAGCAATGCACCGTTCAGAATTCCGTCTTAGGGATT
 CGTCCCGCATTGAGGCCGACTGCGTGATCCAGGACGCCTTGTTGATGGGCGCTG
 ACTTCTACGAAACCTCGGAGCTACGGCACCAAGAATCGGGCCAATGGCAAAGTGC
 CGATGGGAATCGGCAGTGGCAGCACCATCCGTGCGGCCATCGTCGACAAAAATG
 20 CCCACATTGGCCAGAACGTTTCAGATCGTCAACAAAGACCATGTGGAAGAGGCCGATC
 GCGAAGATCTGGGCTTTATGATCCGCAGCGGCATTGTCGTTGTGGTCAAAGGGGCGG
 TTATTCCCGACAACACGGTGATCTAA

SEQ ID NO: 22-

25 MKNVLAIIILGGGAGSRLYPLTKQRAKPAVPLAGKYRLIDIPVSN CINADINKIYVLTQ
 FNSASLNRHLSQTYNLSSGFNGFVEVLAAQITPENPNWFQGTADAVRQYLWLIKE
 WDVDEYLILSGDHLYRMDYSQFIQRHRDTNADITLSVLPIDEKRASDFGLMKLDGSG
 RVVEFSEKPKGDEL RAMQVDTTILGLDPVAAAAQPFIASMG IYVFKRDVLI DLLSHH
 PEQDFGKEVIPAAATRYNTQAFLFNDYWEDIGTIASFYEANLALTQQPSPPF SFYDE
 30 QAPIYTRARYLPPTKLLDCQVTQSIIGEGCILKQCTVQNSVLGIRSR IEADCVIQDALL
 MGADFYETSELRHQNRANGKVP M GIGSGSTIRRAIVDKNAHIGQNVQIVNKDHVEE
 ADREDLGFMIRSGIVVVVKGAVIPDNTVI

SEQ ID NO: 23-

35 ATGGCACTGAATATTCCATTCAGAAATGCGTACTATCGTTTTGCATCCAGTTACT
 CATTCTCTTTTTATTTCTGGTCGCTGTGGTGGTCGTTATACGCTATTTGGCTGA

AAGGACATCTAGGATTAACAGGGACGGAATTAGGTACACTTTATTCCGGTCAACC
 AGTTTACCAGCATTCTATTTATGATGTTCTACGGCATCGTTCAGGATAAACTCGGT
 CTGAAGAAACCGCTCATCTGGTGTATGAGTTTCATTCTGGTCTTGACCGGACCGT
 TTATGATTTACGTTTATGAACCGTACTGCAAAGCAATTTTTCTGTAGGTCTAATT
 5 CTGGGGGCGCTCTTTTTTGGCCTGGGGTATCTGGCGGGATGCGGTTTGCTTGACA
 GCTTCACCGAAAAAATGGCGCGAAATTTTCATTTTCAATATGGAACAGCGCGCG
 CCTGGGGATCTTTTGGCTATGCTATTGGCGCGTTCTTTGCCGGTATATTTTTAGT
 ATCAGTCCCATATCAACTTCTGGTTGGTCTCGCTATTTGGCGCTGTATTTATGAT
 GATCAACATGCGTTTTAAAGATAAGGATCACCAGTGCATAGCGGCGGATGCGGG
 10 AGGGGTAAAAAAGAGGATTTTATCGCAGTTTTCAAGGATCGAACTTCTGGGTT
 TTCGTCATATTTATTGTGGGGACGTGGTCTTTCTATAACATTTTTGATCAACA
 CTTTCCTGTCTTTTATGCAGGTTTATTTCGAATCACACGATGTAGGAACGCGCCTGT
 ATGTTTATCTCAACTCATTCCAGGTGGTACTCGAAGCGCTGTGCATGGCGATTAT
 TCCTTTCTTTGTGAATCGGGTAGGGCCAAAAAATGCATTACTTATCGGTGTTGTG
 15 ATTATGGCGTTGCGTATCCTTTCTGCGCGTTGTTGTTAACCCTGGATTATTTT
 ATTAGTGAAGCTGTTACATGCCATTGAGGTTCCACTTTGTGTCATATCCGTCTTCA
 AATACAGCGTGGCAAACCTTTGATAAGCGCCTGTCGTCGACGATCTTTCTGATTGG
 TTTTCAAATTGCCAGTTCGCTTGGGATTGTGCTGCTTTCAACGCCGACTGGGATA
 CTCTTTGACCACGCAGGCTACCAGACAGTTTTCTTCGCAATTTCCGGTATTGTCTG
 20 CCTGATGTTGCTATTTGGCATTCTTCTCCTGAGTAAAAACGCGAGCAAATAGTT
 ATGGAAACGCCTGTACCTTCAGCAATATAG

SEQ ID NO: 24-

MALNIPFRNAYYRFASSYSFLFFISWSLWWSLYAIWLKGHLLGTGTELGLYSVNQF
 25 TSILFMMFYGIVQDKLGLKKPLIWCMSFILVLTGPFMIYVYEPLLQSNFSVGLILGALF
 FGLGYLAGCGLLDSFTEKMARNFHFYGTARAWGSFGYAIGAFFAGIFFSISPHINFW
 LVSLFGAVFMMINMRFKDKDHQCIAADAGGVKKEDFIAVFKDRNFVWFVIVGTW
 SFYNIFDQQLFPVIFYAGLFE

30 SEQ ID NO: 25-

ATGGTGGCAGCTCAAATCTCTACATTCTGCACATTCAGACCCATGGTCTGCTGC
 GAGGGCAGAACTTGGAACCTGGGGCGAGATGCCGACACCGGCGGGCAGACCAAG
 TACGTCTTAGAACTGGCTCAAGCCCAAGCTAAATCCCCACAAGTCCAACAAGTC
 GACATCATCACCCGCCAAATCACCGACCCCGCGTCAGTGTTGGTTACAGTCAGG
 35 CGATCGAACCTTTGCGCCCAAAGGTCGGATTGTCCGTTTGCCTTTTGGCCCCAA

ACGCTACCTCCGTAAAGAGCTGCTTTGGCCCCATCTCTACACCTTTGCGGATGCA
ATTCTCCAATATCTGGCTCAGCAAAGCGCACCCCGACTTGGATTGAGGCCACT
ATGCTGATGCTGGCCAAGTGGGATCACTGCTGAGTCGCTGGTTGAATGTACCGCT
AATTTTACAGGGCATTCTCTGGGGCGGATCAAGCTAAAAAGCTGTTGGAGCA
5 AGACTGGCCGCTTGAGGAAATTGAAGCGCAATTCAATATTCAACAGCGAATTGA
TGCGGAGGAGATGACGCTCACTCATGCTGACTGGATTGTCGCCAGCACTCAGCA
GGAAGTGGAGGAGCAATACCGCGTTTACGATCGCTACAACCCAGAGCGCAA
TGTCATTCCACCGGGTGTGATACCGATCGCTTCAGGTTTCAGCCCTTGGGCGAT
CGCGGTGTTGTTCTCCAACAGGAACTGAGCCGCTTTCTGCGCGACCCAGAAAAAC
10 CTCAAATTCTCTGCCTCTGTGCCCCGCACCTCGCAAAAATGTACCGGCGCTGGT
GCGAGCCTTTGGCGAACATCCTTGGCTGCGCAAAAAGCCAACCTTGTCTTAGTA
CTGGGCAGCCGCCAAGACATCAACCAGATGGATCGCGGCAGTCGGCAGGTGTT
CAAGAGATTTTCCATCTGGTCGATCGCTACGACCTCTACGGCAGCGTCGCCTATC
CCAAACAGCATCAGGCTGATGATGTGCCGGAGTTCTATCGCCTAGCGGCTCATT
15 CGGCGGGGTATTCTGCAATCCGGCGCTGACCGAACCTTTTGGTTTGACAATTTTG
GAGGCAGGAAGCTGCGGCGTGCCGGTGGTGGCAACCCATGATGGCGGCCCCAG
GAAATTCTCAAACACTGTGATTTTCGGCACTTTAGTTGATGTCAGCCGACCCGCTA
ATATCGCGACTGCACTCGCCACCCTGCTGAGCGATCGCGATCTTTGGCAGTGCTA
TCACCGCAATGGCATTGAAAAAGTTCCCGCCCATTACAGCTGGGATCAACATGTC
20 AATACCCTGTTTGAGCGCATGGAAACGGTGGCTTTGCCTCGTCGTCGTGCTGTCA
GTTTCGTACGGAGTCGCAAACGCTTGATTGATGCCAAACGCCTTGTGCTTAGTGA
CATCGACAACACACTGTTGGGCGATCGTCAAGGACTCGAGAATTTAATGACCTAT
CTCGATCAGTATCGCGATCATTTTGCCTTTGGAATTGCCACGGGGCGTCGCCTAG
ACTCTGCCCAAGAAGTCTTGAAAGAGTGGGGCGTTCCTTCGCCAAACTTCTGGGT
25 GACTTCCGTGCGCAGCGAGATTCACTATGGCACCGATGCTGAACCGGATATCAG
CTGGGAAAAGCATATCAATCGCAACTGGAATCCTCAGCGAATTCGGGCAGTAAT
GGCACAACACTACCCTTTCTTGAAGTGCAGCCGGAAGAGGATCAAACACCCTTCAA
AGTCAGCTTCTTTGTCCGCGATCGCCACGAGACTGTGCTGCGAGAAGTACGGCAA
CATCTTCGCCGCCATCGCCTGCGGCTGAAGTCAATCTATTCCCATCAGGAGTTTC
30 TTGACATTCTGCCGCTAGCTGCCTCGAAAGGGGATGCGATTGCGCACCTCTCACT
CCGCTGGCGGATTCTCTTGAAGAACATTTTGGTGGCAGGCGATTCTGGTAACGAT
GAGGAAATGCTCAAGGGCCATAATCTCGGCGTTGTAGTTGGCAATTACTACCG
GAATTGGAGCCACTGCGCAGCTACGAGCGCGTCTATTTTGTGAGGGCCACTATG
CTAATGGCATTCTGGAAGCCTTAAACACTATCGCTTTTTTGGAGGCGATCGCTTAA

35

SEQ ID NO: 26 -

MVAQNLYILHIQTHGLLRGQNLELGRDADTGGQTKYVLELAQAQAKSPQVQQVDIIT
 RQITDPRVSVGYSQAIPEFAPKGRIVRLPFGPKRYLRKELLWPHLYTFADAILQYLA
 QQKRTPTWIQAHYADAGQVGSLLSRWLNVP LIFTGHSLGRIK LK LLEQDWPLEEIE
 AQFNIIQRIDAEEMTLTHADWIVASTQQEVEEQYRVYDRYNPERKLVIPPGVDTDRF
 5 RFQPLGDRGVVLQQELSRFLRDPEKPQILCLCRPAPRKNVPALVRAFGEHPWLRKKA
 NLVVLVLSRQDINQMDRGSRQVFQEIFHLVDRYDLYGSAVYPKQHQAADDVPEFYRL
 AAHSGGVFVNPALTEPFGLTILEAGSCGVPVATHDGGPQEILKHCFGLVDVSRP
 ANIATALATLLSDRDLDWQCYHRNGIEKVP AHYSWDQHVN TLFERMETVALPRRRA
 VSFVRSRKRLIDAKRLVVS DIDNTLLGDRQGLENLMTYLDQYRDHFAFGIATGRRLD
 10 SAQEV LKEWGVPSPNFWWTSVGSEIHYGTDAEPDISWEKHINRNWNPQRIRAVMAQ
 LPFLELQPEEDQTPFKVSFFVRDRHETVLRVQRHLRRHRLRLKSIYSHQEFLDILPLA
 ASKGD AIRHLSLRWRIPLENILVAGDSGNDEEMLKGHN LGVVVGNYSPELEPLRSYE
 RVYFAEGHYANGILEALKHYRFFEAIA

15 SEQ ID NO: 27-

ATGCGACAGTTATTGCTAATTTCTGACCTGGACAATACCTGGGTCGGAGATCAACAAG
 CCCTGGAACATTTGCAAGAATATCTAGGCGATCGCCGGGGAAATTTTTATTT
 GGCCTATGCCACGGGGCGTTCCTACCATTCCGCGAGGGAGTTGCAAAAACAGGT
 GGGACTCATGGAACCGGACTATTGGCTCACCGCGGTGGGGAGTGAAATTTACCA
 20 TCCAGAAGGCCTGGACCAACATTGGGCTGATTACCTCTCTGAGCATTGGCAACGG
 GATATCCTCCAGGCGATCGCCGATGGTTTTGAGGCCTTAAAACCCCAATCTCCCT
 TGGAACAAAACCCATGGAAAATTAGCTATCATCTCGATCCCCAGGCTTGCCCCAC
 CGTCATCGACCAATTAACGGAGATGTTGAAGGAAACCGGCATCCCGGTGCAGGT
 GATTTTCAGCAGTGGCAAAGATGTGGATTTATTGCCCAACGGAGTAACAAAGG
 25 TAACGCCACCCAATATCTGCAACAACATTTAGCCATGGAGCCGTCTCAAACCCTG
 GTGTGTGGGGACTCCGGCAATGATATTGGCTTATTTGAAACTTCCGCTCGGGGTG
 TCATTGTCCGTAATGCCAGCCGAATTATTGCACTGGTATGACCAATGGGGGGA
 TTCTCGTCATTATCGGGCCCAATCGAGCCATGCTGGCGCTATCCTAGAGGCGATC
 GCCCATTTGATTTTTTTGAGCTGA

30

SEQ ID NO: 28-

MRQLLLISDLN TWG DQQALEHLQEYLGDRRGNFYLAYATGRSYHSARELQKQVGLME
 PDYWLTA VGSEIYHPEGLDQHWADYLSEHWQRDILQAIADGFEALKPQSPL
 QNPWKISYHLDPQACPTVIDQLTEMLKETGIPVQVIFSSGKDVDLLPQRSNKGNATQ
 35 YLQQHLAMEPSQTLVCGDSGNDIGLFETSARGVIVRNAQPELLHWYDQWGDSRHY
 RAQSSHAGAILEAIAHFDFLS

SEQ ID NO: 29-

ATGAGTGATTCCACCGCCCAACTCAGCTACGACCCACACGAGCTACCTCGAGC
CCAGTGGCTTGGTCTGTGAGGATGAACGGACTTCTGTGACTCCCGAGACCTTGAA
5 ACGGGCTTACGAGGCCATCTCTACTACAGCCAGGGCAAACCTCAGCGATCGC
CACCTGCGTGATCACTACATGGCACTGGCCTACATGGTCCGCGATCGCCTCCTG
CAACGGTGGCTAGCTTCACTGTGACCTATCAACAACAGCACGTCAAAGTGGTCT
GTTACCTGTCCGCTGAGTTTTTGGATGGGTGCGCACCTCGAAAACCTGCCTGATCAA
CCTGCATCTTACGACCGCGTTCAGCAAGTTTTGGATGAACTGGGTCTCGATTTT
10 GAGCAACTGCTAGAGAAAGAGGAAGAACCCGGGCTAGGCAACGGTGGCCTCGG
TCGCCTCGCAGCTTGTTCCTCGACTCCATGGCTACCCTCGACATTCCTGCCGTCG
GCTATGGCATTGCTATGAGTTCGGTATCTTCCACCAAGAACTCCACAACGGCTG
GCAGATCGAAATCCCGATAACTGGCTGCGCTTTGGCAACCCTTGGGAGCTAGA
GCGGCGCGAACAGGCCGTGGAAATTAAGTTGGGCGGCCACACGGAGGCCTACCA
15 CGATGCGCGAGGCCGCTACTGCGTCTCTTGGATCCCGATCGCGTCATTCGCGCC
ATCCCCTACGACACCCCGTACCGGGCTACGACACCAATAACGTCAGCATGTTGC
GGCTCTGGAAGGCTGAGGGCACACGGAACCTTGAAGCTTTCAACTCAG
GCAACTACGACGATGCGGTTGCCGACAAAATGTCGTGCGAAACGATCTCGAAGG
TGCTCTATCCCAACGACAACACCCCCAAGGGCGGGAACCTGCGGCTGGAGCAGC
20 AGTATTTCTTCGTCTCGGCTTCGCTCCAAGACATCATCCGTCGCCACTTGATGAAC
CACGGTCATCTTGAGCGGCTGCATGAGGCGATCGCAGTCCAGCTTAACGACACC
CATCCAGCGTGGCGGTGCCGGAGTTGATGCGCCTCCTGATCGATGAGCATCACC
TGACTTGGGACAATGCTTGGACGATTACACAGCGCACCTTCGCCTACACCAACCA
CACGCTGCTACCTGAAGCCTTGAACGCTGGCCCGTGGGCATGTTCCAGCGCACT
25 TTACCGCGCTTGATGGAGATTATCTACGAAATCAACTGGCGCTTCTTGGCCAATG
TGCGGGCCTGGTATCCCGGTGACGACACGAGAGCTCGCCGCCTCTCCCTGATTGA
GGAAGGAGCTGAGCCCCAGGTGCGCATGGCTCACCTCGCCTGCGTGGGCAGTCA
TGCCATCAACGGTGTGGCAGCCCTGCATACGCAACTGCTCAAGCAAGAAACCCT
GCGAGATTTCTACGAGCTTTGGCCCCGAGAAATTCTTCAACATGACCAACGGTGTG
30 ACGCCCCGCCGCTGGCTGCTGCAAAGTAATCCTCGCCTAGCCAACCTGATCAGCG
ATCGCATTGGCAATGACTGGATTCATGATCTCAGGCAACTGCGACGGCTGGAAG
ACAGCGTGAACGATCGCGAGTTTTTACAGCGCTGGGCAGAGGTCAAGCACCAAA
ATAAGGTCGATCTGAGCCGCTACATCTACCAGCAGACTCGCATAGAAGTCGATC
CGCACTCTCTTTGATGTGCAAGTCAAACGGATTACGAATACAAACGCCAGCT
35 CCTCGCTGTCATGCATATCGTGACGCTCTACAACTGGCTGAAGCACAATCCCCAG
CTCAACCTGGTGCCGCGCACTTTTATCTTTGCGGGCAAAGCGGCCCCGGGTTACT

ACCGTGCCAAGCAAATCGTCAAACCTGATCAATGCGGTTCGGGAGCATCATCAACC
 ATGATCCCGATGTCCAAGGGCGACTGAAGGTCGTCTTCCTACCTAACTTCAACGT
 TTCCTTGGGGCAGCGCATTATCCAGCTGCCGATTTGTTCGGAGCAAATCTCAACT
 GCAGGGAAAGAAGCGTCCGGCACCGGCAACATGAAGTTCACCATGAATGGCGCG
 5 CTGACAATCGGAACCTACGATGGTGCCAACATCGAGATCCGCGAGGAAGTCGGC
 CCCGAAAACCTTCTTCCTGTTTGGCCTGCGAGCCGAAGATATCGCCCGACGCCAAA
 GTCGGGGCTATCGACCTGTGGAGTTCTGGAGCAGCAATGCGGAACTGCGGGCAG
 TCCTCGATCGCTTTAGCAGTGGTCACTTCACACCGGATCAGCCCAACCTCTTCCA
 AGACTTGGTCAGCGATCTGCTGCAGCGGGATGAGTACATGTTGATGGCGGACTA
 10 TCAGTCCTACATCGACTGCCAGCGCGAAGCTGCTGCTGCCTACCGCGATTCCGAT
 CGCTGGTGGCGGATGTGCTACTCAACACCGCGAGATCGGGCAAGTTCTCCTCCG
 ATCGCACGATCGCTGACTACAGCGAACAGATCTGGGAGGTCAAACCAGTCCCCG
 TCAGCCTAAGCACTAGCTTTTAG

15 SEQ ID NO: 30 -

MSDSTAQLSYDPTTSYLEPSGLVCEDETSVTPETLKRAYEAHLYYSQGKTSIAIATLRDHY
 MALAYMVRDRLLQRWLASLSTYQQQHVKVVCYLSAEFLMGRHLENCLINLHL
 HDRVQQVLDELGLDFEQLLEKEEPEGLNGGLGRLAACFLDSMATLDIPAVGYGIR
 YEFGIFHQELHNGWQIEIPDNWLRFGNPWELERREQAVEIKLGGHTEAYHDARGRY
 20 CVSWIPDRVIRAIPYDTPVPGYDTNNVSMRLRLWKAEGTTELNLEAFNSGNYDDAVA
 DKMSSETISKVLYPNDNTPQGRELRLEQQYFFVSASLQDIIRRHLMNHGHLERLHEAI
 AVQLNDTHPSVAPELMRLLIDEHHLTWDNAWTITQRTFAYTNHTLLPEALERWPV
 GMFQRTLPRLMETIYEINWRFLANVRAWYPGDDTRARRLSLIEEGAEPQVRMAHLA
 CVGSHAINGVAALHTQLLKQETLRDFYELWPEKFFNMTNGVTPRRWLLQSNPRLAN
 25 LISDRIGNDWIHLRQLRRLLEDVNDREFLQRWAEVKHQNKVDLSRYIYQQTRIEVD
 PHSLFDVQVKRIHEYKRQLLAVMHIVTLYNWLKHNPQLNLVPRTFIFAGKAAPGY
 RAKQIVKLINAVGSIINHDPDVQGRLKVVFLPNFVSLGQRIYPAADLSEQISTAGKE
 ASGTGNMKFTMNGALTIGTYDGANIEIREEVGPENFFLFGRLAEDIARRQSRGYRPVE
 FWSSNAELRAVLDRFSSGHFTPDQPNLFQDLVSDLLQRDEYMLMADYQSYIDCQRE
 30 AAAAYRDSRWWRMSLLNTARSGKFSSDRTIADYSEQUIWEVKPVPVSLSTSF

SEQ ID NO: 31-

ATGGCTGCCATTAATACGAAAGTCAAAAAGCCGTTATCCCCGTTGCGGGATTA
 GGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATCCCGAAAGAGATGCTGCCACTT
 35 GTCGATAAGCCATTAATTCAATACGTCGTGAATGAATGTATTGCGGCTGGCATT
 CTGAAATTGTGCTGGTTACACACTCATCTAAAACTCTATTGAAAACCACTTTGA

TACCAGTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGGAAAACGTGTAAAACGTCAACTGCT
 GGTCTGGCGAAAGGCCTGGGACACGCGGTATTGTGTGCTCACCCGGTAGTGGGT
 GATGAACCGGTAGCTGTTATTTGCCTGATGTTATTCTGGATGAATATGAATCCG
 ATTTGTCACAGGATAACCTGGCAGAGATGATCCGCCGCTTTGATGAAACGGGTC
 5 ATAGCCAGATCATGGTTGAACCGGTTGCTGATGTGACCGCATATGGCGTTGTGGA
 TTGCAAAGGCGTTGAATTAGCGCCGGGTGAAAGCGTACCGATGGTTGGTGTGGT
 AGAAAAACCGAAAGCGGATGTTGCGCCGTCTAATCTCGCTATTGTGGGTCGTTAC
 GTACTTAGCGCGGATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACCCCTCCGGGAGCTGGTG
 ATGAAATTCAGCTCACCGACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAAGAAACGGTGG
 10 AAGCCTATCATATGAAAGGGAAGAGCCATGACTGCGGTAATAAATTAGGTTACA
 TGCAGGCCTTCGTTGAATACGGTATTCGTCATAACACCCTTGGCACGGAATTTAA
 AGCCTGGCTTGAAGAAGAGATGGGCATTAAGAAGTAA

SEQ ID NO: 32-

15 MAINTKVKKAVIPVAGLGTRMLPATKAIPKEMLPLVDKPLIQYVVNECIAAGITEIV
 LVTHSSKNSIENHFDTSFLEAMLEKRVKRQLLDEVQSICPPHVTIMQVRQGLAKGL
 GHAVLCAHPVVGDEPVAVILPDVILDEYESDLSQDNLAEMIRRFDETGHSSQIMVEPV
 ADVTAYGVVDCKGVELAPGESVPMVGVVEKPKADVAPSNLAIVGRYVLSADIWPL
 LAKTPPGAGDEIQLTDAIDMLIEKETVEAYHMKGKSHDCGNKLGVMQAFVEYGIRH
 20 NTLGTEFKAWLEEEMGIKK

SEQ ID NO: 33-

ATGAAATCCCCCAGGCTCAACAAATCCTAGACCAGGCCCGCCGTTTGCTCTACG
 AAAAAGCCATGGTCAAATCAATGGGCAATACGTGGGGACGGTGGCGGCCATTC
 25 CCCAATCGGATCACCATGATTTGAACTATACGGAAGTTTTTCATTCGGGACAATGT
 GCCGGTGTGATCTTCTTGTACTGCAAAATGAAACGGAAATTGTCCAAAACCTT
 TTGAAATTTGCCTCACCTCCAAAGTAAGGGCTTTCCACCTACGGCATTTTTCC
 CACTAGTTTTGTGGAAACGGAAAACCATGAACTCAAGGCAGACTATGGCCAACG
 GGCGATCGGTGAGTTTGCTCGGTGGATGCGTCCCTCTGGTGGCCTATTTTGGCC
 30 TACTACTAGTGCAAAGAACCGGCAATGAAGCCTGGGCTAGACAAACCCATGTG
 CAATTGGGGCTACAAAAGTTTTTAAACCTCATTCTCCATCCAGTCTTTTCGGGATG
 CACCCACTTTGTTTGTGCCCGACGGGGCCTTTATGATTGACCGCCCCATGGATGT
 GTGGGGAGCGCCGTTGGAAATCCAAACCCTGCTCTACGGAGCCCTGAAAAGTGC
 GGCGGGGTTACTGTTAATCGACCTCAAGGCGAAGGGTTATTGCAGCAATAAAGA
 35 CCATCCTTTTGACAGCTTCACGATGGAGCAGAGTCATCAATTTAACCTGAGTGTG

GATTGGCTCAAAAACTCCGCACCTATCTGCTCAAGCATTATTGGATTAATTGCA
 ATATTGTCCAAGCTCTCCGCCGCGTCCCACGGAACAGTACGGTGAAGAAGCCA
 GCAACGAACATAATGTCCACACAGAAACCATTCCCAACTGGCTCCAGGATTGGC
 TCGGCGATCGGGGAGGCTATTTAATCGGCAATATCCGCACGGGTGCCCCGATTT
 5 TCGCTTTTTCTCCCTGGGTAATTGCTTGGGGGCAATTTTCGATGTCACTAGCTTGG
 CCCAGCAACGTTCTTTTTCCGTTTGGTATTAATAATCAGCGGGAGTTATGTGC
 CCAAATGCCCTGAGGATTTGCCATCCCCCCTCAAAGATGACGATTGGCGCAGT
 AAAACCGGCTTTGACCGCAAAAATTTACCCTGGTGCTACCACAACGCCGGCCATT
 GGCCCTGTTTATTTTGGTTTCTGGTGGTGGCGGTGCTCCGCCATAGCTGCCATTCC
 10 AACTACGGCACGGTGGAGTATGCGGAAATGGGGAACCTAATTCGCAATAACTAT
 GAGGTGCTTTTGCGCCGTTTGCCCAAGCATAAATGGGCTGAATATTTTGATGGCC
 CCACGGGCTTTTGGGTGCGGGCAACAATCCCGTTCCTACCAAACCTGGACCATTGT
 GGGCCTATTGCTAGTACACCATTTACAGAAGTTAACCCTCGACGATGCTTTGATG
 TTCGATTTGCCTAGTTTGAAAAGTTTGCATCAAGCGCTGCATTAA

15

SEQ ID NO: 34-

MKSPQAQQILDQARRLLYEKAMVKINGQYVGTVAaipQSDHHDLNYTEVFIRDNVP
 VMIFLLLQNETEIVQNfLEICLTLQSKGFPTYGIFPTSFVETENHELKADYGQRAIGRV
 CSVDASLWWPILAYYYVQRTGNEAWARQTHVQLGLQKFLNLILHPVFRDAPTLFVP
 20 DGAFMIDRPMdVWGAPLEIQTLlyGALKSAAGLLLIDLKAKGYCSNKDHPFDSFTM
 EQSHQFNLSVDWLKKLRtyLLKHYWincNIVQALRRRPTEQYGEEASNEHNVHTETI
 PNWLQDWLGDRGGYLIGNIRTGRPDFRFFSLGNCLGAIFDVTSLAQQRsFFRLVLNN
 QRELCAQMPLRICHpPLKDDdWRSKTGFDRKNLPWCYHNAGHWPCLFWFLVAVL
 RHSCHSNYGTVEYAEMGNLIRNNYEVLlRRLPKHKWAEYFDGPTGFwVWGQQSRsY
 25 QTWTIVGLLLVHHfTEVNPDDALMFDLPSLkSLHQALH

SEQ ID NO: 35-

ATGAATTCATCCCTTGTGATCCTTTACCACCGTGAGCCCTACGACGAAGTTAGGG
 AAAATGGCAAAACGGTGTATCGAGAGAAAAAGAGTCCCAACGGGATTTTGCCCA
 30 CCCTCAAAGTTTTTTTGGCGATGCGGAACAGAGCACCTGGGTGCGATGGAAAC
 AGGTTTCGCCGAAGCAAAGGATGATTTTCAGGCGGATATGTCCATTGAAGGCC
 TTGGCGATCGTTGTACGGTGCGCCGGGTGCCCTGACGGCGGAGCAGGTAAAAA
 ACTTCTATCACATCACTTCCAAGGAAGCCTTTTGGCCCATTCTCCACTCTTTCCCC
 TGGCAGTTCACCTACGATTCTTCTGATTGGGATAATTTTCAGCACATTAACCGCTT
 35 ATTTGCCGAGGCGGCCTGTGCCGATGCCGATGACAATGCATTGTTTTGGGTCCAC
 GACTATAACCTCTGGTTAGCGCCCCCTTACATTGCTCAGCTCAAGCCCAACGCCA

AGATTGCCTTTTTCCACCACACCCCCTTCCCCAGCGTTGATATTTTCAATATTTTG
 CCCTGGCGGGAGGCGATCGTAGAAAGCTTGCTGGCCTGTGATCTCTGTGGTTTTTC
 ATATTCCCGCTACGTAGAAAATTTTGTGCGCCGTGGCCCGTAGTCTCAAGCCGGT
 GGAAATCACCAGACGGGTTGTGGTAGACCAAGCCTTTACCCCCTACGGTACGGC
 5 CCTGGCGGAACCGGAACTCACCACCCAGTTGCGTTATGGCGATCGCCTCATTAAC
 CTCGATGCGTTTTCCCGTGGGCACCAATCCGGCAAATATCCGGGCGATCGTGGCCA
 AAGAAAGTGTGCAACAAAAAGTTGCTGAAATTAACAAGATTTAGGCGGTAAGA
 GGCTAATTGTTTCCGCTGGGCGGGTGGATTACGTGAAGGGCACCAAGGAAATGT
 TGATGTGCTATGAACGTCTACTGGAGCGTCGCCCCGAATTGCAGGGGGAAATTA
 10 GCCTGGTAGTCCCCGTAGCCAAGGCCGCTGAGGGAATGCGTATTTATCGCAACG
 CCCAAAACGAAATTGAACGACTGGCAGGGAAAATTAACGGTCGCTTTGCCAAC
 TGTCTGGACACCAGTGATGCTGTTACCTCTCCTTTAGCCTATGAGGAGCTCATT
 GCCCTGTTCTGTGCCGCCGACATTGCCTGGATCACTCCCCTGCGGGATGGGCTAA
 ACCTGGTGGCTAAGGAGTATGTGGTGGCTAAAAATGGCGAAGAAGGAGTTCTGA
 15 TCCTCTCGGAATTTGCCGGTTGTGCGGTGGAACCTACCCGATGCGGTGTTGACTAA
 CCCCTACGCTTCCAGCCGTATGGACGAATCCATTGACCAGGCCCTGGCCATGGAC
 AAAGACGAACAGAAAAACGCATGGGGAGAATGTACGCCGCCATTAAGCGTTA
 CGACGTTCAACAATGGGCCAATCACCTACTGCGGGAAGCCTACGCCGATGTGGT
 ACTGGGAGAGCCCCCCCAAATGTAG
 20

SEQ ID NO: 36 -

MNSSLVILYHREPYDEVRENGKTVYREKKSPNGILPTLKSFFADAEQSTWWAWKQV
 SPKQKDDFQADMSIEGLGDRCTVRRVPLTAEQVKNFYHITSKEAFWPILHSFPWQFT
 YDSSDWDNFQHINRLF AEACADADDNALFWHDYNLWLAPLYIRQLKPNAKIAFF
 25 HHTPFPSVDIFNILPWREAIVESLLACDLCGFHIPRYVENFVAVARSLKPVEITRRVV
 DQAFTPYGTALAEPELTTQLRYGDRLINLDAFPVGTNPANIRAIVAKESVQQKVAEIK
 QDLGGKRLIVSAGRVDYVKGTKEMLMCIYERLLERRPELQGEISLVVPVAKAAEGMR
 IYRNAQNEIERLAGKINGRFAKLSWTPVMLFTSPLAYEELIALFCAADIAWITPLRDG
 LNLVAKEYVVAKNGEELVILSEFAGCAVELPDAVLTPYASSRMDDESIDQALAMD
 30 KDEQKKRMGRMYAAIKRYDVQQWANHLLREAYADVVLGEPQPM

SEQ ID NO: 37-

ATGAAGATTTTATTTGTGGCGGCGGAAGTATCCCCCTAGCAAAGGTAGGTGGCATG
 GGGGATGTGGTGGGTTCCCTGCCTAAAGTTCTGCATCAGTTGGGCCATGATG
 35 TCCGTGTCTTCATGCCCTACTACGGTTTCATCGGCGACAAGATTGATGTGCCCAA
 GGAGCCGGTCTGGAAAGGGGAAGCCATGTTCCAGCAGTTTGCTGTTTACCAGTCC

TATCTACCGGACACCAAATTCCTCTCTACTTGTTTCGGCCATCCAGCTTTCGACTC
 CCGAAGGATCTATGGCGGAGATGACGAGGCGTGGCGGTTCACTTTTTTTCTAAC
 GGGGCAGCTGAATTTGCCTGGAACCATTGGAAGCCGGAAATTATCCATTGCCAT
 GATTGGCACACTGGCATGATCCCTGTTTGGATGCATCAGTCCCCAGACATCGCCA
 5 CCGTTTTACCATCCATAATCTTGCTTACCAAGGGCCCTGGCGGGGCTTGCTTGA
 AACTATGACTTGGTGTCTTGGTACATGCAGGGAGACAATGTGATGGCGGCGGC
 GATTCAATTTGCCAATCGGGTGACTACCGTTTCTCCACCTATGCCAACAGATC
 CAAACCCCGGCCTATGGGGAAAAGCTGGAAGGGTTATTGTCCTACCTGAGTGGT
 AATTTAGTCGGTATTCTCAACGGTATTGATACGGAGATTTACAACCCGGCGGAAG
 10 ACCGCTTTATCAGCAATGTTTTCGATGCGGACAGTTTGGACAAGCGGGTGAAAA
 ATAAAATTGCCATCCAGGAGGAAACGGGGTTAGAAATTAATCGTAATGCCATGG
 TGGTGGGTATAGTGGCTCGCTTGGTGAACAAAAGGGGATTGATTTGGTATTCA
 GATCCTTGACCGCTTCATGTCCTACACCGATTCCCAGTTAATTATCCTCGGCACTG
 GCGATCGCCATTACGAAACCCAACTTTGGCAGATGGCTTCCCGATTTCTGGGCG
 15 GATGGCGGTGCAATACTCCACAACGATGCCCTTTCCCGTCGAGTCTATGCCGGG
 GCGGATGTGTTTTAATGCCTTCTCGCTTTGAGCCCTGTGGGCTGAGTCAATTGAT
 GGCCATGCGTTATGGCTGTATCCCCATTGTGCGGCGGACAGGGGGTTTGGTGGAT
 ACGGTATCCTTCTACGATCCTATCAATGAAGCCGGCACCGGCTATTGCTTTGACC
 GTTATGAACCCCTGGATTGCTTTACGGCCATGGTGCGGGCCTGGGAGGGTTTCCG
 20 TTTCAAGGCAGATTGGCAAAAATTACAGCAACGGGCCATGCGGGCAGACTTTAG
 TTGGTACCGTTCCGCCGGGGAATATATCAAAGTTTATAAGGGCGTGGTGGGGAA
 ACCGGAGGAATTAAGCCCCATGGAAGAGGAAAAAATCGCTGAGTTAACTGCTTC
 CTATCGCTAA

25 SEQ ID NO: 38 -
 MKILFVAAEVSPLAKVGGMGDVVGS LPKVLHQLGHDVRVFM PYYGFIGDKIDVPKE
 PVWKGEAMFQQFAVYQSYLPDTKIPLYLFGHPAFDSRRIYGGDDEAWRFTFFSNGA
 AEFawnHWKPEIIHCHDWHTGMIPVWMHQSPDIATVFTIHNLAYQGPWRGLLETMT
 WCPWYMQGDNVMAAAIQFANRVTTVSPTYAQQIQTPAYGEKLEGLLSYLSGNLVGI
 30 LNGIDTEIYNPAEDRFISNVFDADSLDKRVKNKIAIQEETGLEINRNAMVVGIVARLV
 EQKGIDLVIQILDRFMSYTDSQLIILGTGDRHYETQLWQMASRFPGRMAVQLLHND
 LSRRVYAGADVFLMPSRFEPCLSQLMAMRYGCIPIVRRTGGLVDTVSYDPINEAG
 TGYCFDRYEPLDCFTAMVRAWEGFRFKADWQKLQQRAMRADFSWYRSAGEYIKV
 YKGVVGKPEELSPMEEKIAELTASYR

35

SEQ ID NO: 39 -

TGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGC
AACTCGTAGGACAGGTGGTACCTACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAT
5 CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCG
TTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGG
ATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
10 AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
CCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTA
GCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
15 AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCA
CGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTGCTAGCGAA
GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTT
AAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAA
GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAA
20 TTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGG
CAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTG
TTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCA
GACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCG
TACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTC
25 CAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG
TGTTCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATTGCCTTTTAAACAGCGAT
CGCGTATTTGCTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATG
CGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAG
AAATGCATAAACTTTTGCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTT
30 TCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGTTGTATTGATGTTG
GACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCC
TCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGAT
AATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGA
ATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG
35 GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATT
TTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGC

CGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAG
TGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTC
AAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCC
TAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAA
5 GGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAA
GGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG
TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCG
CGTCCCATTGCCAATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAG
ACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAG
10 CCAACTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTG
GTGGTGTCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCATTAATGATGATGGTGGTGGTGGCTG
CCGGTGCACGGGTGTCGCTGTATTTCTTCAGGTCTTCCAGGTGCGCCAGACGGT
TTTCTTTGTTAATACGTTGGGTGGTGATACGATCCGGATAGCAACGCATAAACAT
GTTGGTGAAGTGCTCGCCGTAGTGGATACGTTTCGTTTCGCGCTCGGCTCGAACAGC
15 GGATACGCGCTCGCTTGAAGTTCGGCTCGTGAAAGTACGCGCACGCGAAACGT
TCACGGGTGTTTACGTTTAACTTGTGCGGGGTGCTCAGCAGTTGGCCACCGGTCA
TGAAGTGCAGAATATCGCCCGGAAAAACGGTCCACACACCCGGGGTCGGGGTAA
CGAAGGTCCACGGTTCGTCGTGCTCAAACATGCCCGCGCTGCTCTCGCCCGGCAG
CCAGTTACGTTACGCTTTTTCGCCCTCCACCGGCGGACGGATATACAGGCCACCA
20 ACATCGTCTTGCGCCGCAATCACCAGCAGACCGTAGTCGGTGTGCGCACCAATAC
CACGGCTCAGGGTGTGGTCTGCGGGCGGAAACGCAGCACACGCATGTGGTGCC
AGCCATCACGGGTCAGGTCGGTGAAGGTGTTGATCGGCAGTTCAAACCCAGCG
CGGTCAGTTTCAGCAGACGCTCGCCCGCCAGACCCAGTTCCTCCATAAAGGTTTT
CATGCTCTTTTGATAGGTGTTGTTTCGGCCACGGAACCGGACCATGGCACGGCCAA
25 CCCGCTTTAACACGCTGATCGCCACGCTCAGGTCCTTGCACACGGTAAAAATTT
CCGGGAAATCCGGCTTGCCCGCGGTAACCTCCTCGCCGCTCGCCACATAACCGCT
GTAGGTCAGGTCGCTAACGCAGCTGCTTTTGAAGGTCAGCGGCTCTTTGCAAAAT
TGCTTGCTCGCCGCCATCGCTTCTTGGGTCTTACGATCCTGCTCGCTGTCGGTTTT
AATCTGGAAGATACCATCCTTTTGCACGCCTGAATCAGCGCACGACCCAGGCTG
30 ATGTCCGCCGCGCAACCGGTCACCTTCGGTCGGCAGTTCAAAGGTCTGCAGGTTGG
TCATGCTGGTTTCCTCCTTTGTCCATGTACAGGCTCGGATGCTCATTCCACACAACG
TCCGGGCTGCATAACCCTAGTGAGGGAAATACTCCCATCTACTTGGAGCGTGTA
TCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGT
TATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATC
35 GATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGT
GCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGC

CACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGG
 CCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCCCTTGCGGCGGCGGT
 GCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAG
 GGAGAGCGTCGAGATCCCGGACACCATCGAATGGCGCAAACCTTTCGCGGTAT
 5 GGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCACT
 AACGTTATACGATGTGCGAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGC
 GTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCG
 GCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGC
 AAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGT
 10 CGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGT
 GGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAA
 TCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAG
 GATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGCGTATTCTTGTATGT
 CTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGA
 15 CTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCG
 GGCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATC
 TCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCA
 TGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGC
 GATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGA
 20 GTCCGGGCTGCGCGTTGGTTCGCGGACATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGA
 AGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTG
 CTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTG
 AAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCG
 CCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGG
 25 CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTA
 AGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCA
 ACCCAGTCAGCTCCTTCCGG

SEQ ID NO: 40-

30 ATTTAGCGTCTTCTAATCCAGTGTAGACAGTAGTTTTGGCTCCGTTGAGCACTGTAGC
 CTTGGGCGATCGCTCTAACATTACATAAATTCACAAAGTTTTTCGTTACATAA
 AAATAGTGTCTACTTAGCTAAAAATTAAGGGTTTTTTACACCTTTTTGACAGTTAA
 TCTCCTAGCCTAAAAAGCAAGAGTTTTTA ACTAAGACTCTTGCCCTTTACAACCT
 CGAAGGAGCGTCAGATCTCATATGCACCACCACCATCACCACGAAAACCTGTAC
 35 TTTAGGGCAAGCTTATGATTCATGCCCCCTCCCGCTGGGGCGTGTTCAGTCT
 GGGTCTCTGCTCCCCGATGTGGTGTGGAACGAACCCCCAGCCTGTACATGGAT

AAGGAAGAGACCAGTATGACCAATCTGCAAACCTTTGAACTGCCACCGAGGTG
ACCGGTTGCGCCGCCGATATTAGCCTCGGTGCGGCCCTGATTCAAGCCTGGCAAA
AGGATGGCATCTTCCAAATCAAGACCGATTCCGAACAAGATCGCAAGACCCAAG
AGGCCATGGCCGCCAGCAAACAATTTTGCAAGGAACCCCTGACCTTTAAATCCA
5 GCTGCGTGAGCGATCTCACCTACAGTGGCTATGTGGCCAGTGGTGAAGAGGTGA
CCGCCGGCAAGCCCGATTTTCCCGAGATTTTACCCTGTGCAAGGATCTGAGTGT
GGGTGATCAACGCGTGAAAGCCGGTTGGCCCTGCCATGGTCCCGTGCCCTGGCCC
AACAAATACCTATCAAAAATCCATGAAGACCTTTATGGAAGAAGTCCGGTCTGGCC
GGTGAACGCCTGCTCAAACCTGACCGCCCTCGGCTTTGAGCTGCCATTAACACCT
10 TTACCGATCTCACCCGCGATGGTTGGCACCACATGCGCGTGCTGCGCTTTCTCC
CCAAACCAGCACCCCTGAGCCGCGGTATTGGTGCCACACCGATTACGGCCTGCTC
GTGATTGCCGCCAAGATGATGTGGGCGGTCTGTATATTCGCCCTCCCGTGGAAG
GCGAGAAACGCAACCGCAATTGGCTCCCCGGCGAAAGTTCCGCCGGCATGTTTG
AACACGATGAACCCTGGACCTTTGTGACGCCACGCCCGGCGTGTGGACCGTGTT
15 TCCCGGTGATATTCTGCAATTTATGACCGGCGGTCAACTGCTCTCCACGCCCCAC
AAAGTGAAGCTCAACACCCGCGAACGCTTTGCCTGCGCCTACTTTCACGAACCCA
ATTTTGAGGCCAGTGCCTATCCCCTGTTTGAACCCTCCGCCAACGAGCGCATTCA
CTACGGCGAGCACTTTACCAATATGTTTATGCGCTGCTATCCCGATCGCATTACC
ACCCAACGCATTAACAAGGAAAATCGCCTGGCCACCTCGAGGATCTGAAAAAG
20 TATAGTGATAACCCGCGCCACCGGTAGTGGTGCCACCAACTTAGCCTGCTCAAAC
AAGCCGGCGATGTGGAAGAGAACCCCGGTCCCATGACCGAAAGTATTACCAGCA
ATGGCACCCCTGGTGGCCAGTGATACCCGTGCGCCGCGTGTGGGCCATTGTGAGTGC
CAGCAGTGGTAACCTGGTGGAGTGGTTTGATTTTACGTGTATAGCTTTTGCAGT
CTCTACTTTGCCACATTTTCTTTCCAGTGGCAATACCACCACCCAAGTCTGCTGCA
25 AACCGCCGGCGTGTGGCCGCGGTTTCTGATGCGCCCCATTGGCGGTTGGCTC
TTTGGCCGCATTGCCGATCGTCGCGGTGCGAAGACCAGCATGCTGATTAGCGTGT
GCATGATGTGCTTTGGCTCCCTGATTATTGCCTGCCTCCCCGGCTATGATGCCATT
GGCACCTGGGCCCCCGCCCTGCTCCTGCTGGCCCGCCTCTTTCAAGGCCTGAGCG
TGGGCGGTGAATACGGCACCCAGCGCCACCTATATGAGTGAAATTGCCCTGGAGG
30 GCCGCAAAGGTTTTTACGCCAGTTTTCAATATGTGACCCTGATTGGCGGTCAACT
GCTCGCCATTCTCGTGGTGGTATTCTCCAACAATTCTGACCGATTCCCAACTG
CACGAATGGGGCTGGCGCATTCCCTTTGCCATGGGTGCCGCCCTGGCCATTGTGG
CCCTGTGGCTCCGTGCGCAACTCGATGAAACCAGCCAAAAAGAGGTGCGCGCCC
TGAAAGAAGCCGGCAGTTTTAAAGGTCTCTGGCGCAACCGCAAGGCCTTTCTCAT
35 GGTGCTGGGCTTTACCGCCGGCGGTAGTCTGTCTTTTACACCTTTACCACCTACA
TGCAAAAATATCTCGTGAACACCACCGGCATGCACGCCAATGTGGCCAGCGTGA

TTATGACCGCCGCCCTGTTTGTGTTTATGCTCATTCAACCCCTGATTGGCGCCCTC
 AGCGATAAGATTGGTCGTCGCACCAGTATGCTGATTTTTGGCGGTATGAGTGCCC
 TCTGCACCGTGCCCATTCTCACCGCCCTGCAACACGTGTCCAGCCCCCTACGCCGC
 CTTTGCCCTCGTGATGCTGGCCATGGTGATTGTGTCTTTTTATACCAGCATTAGTG
 5 GCATTCTGAAGGCCGAAATGTTTCCCGCCCAAGTGCGCGCCCTGGGCGTGGGTCT
 CAGTTACGCCGTGGCCAATGCCCTGTTTGGCGGTTCCGCCGAATATGTGGCCCTG
 TCCCTCAAAGCTGGGGCAGTGAGACCACCTTTTTCTGGTACGTGACCATTATGG
 GTGCCCTGGCCTTTATTGTGAGCCTGATGCTCCACCGCAAAGGCAAGGGTATTCCG
 CCTCTAGGGTACCAGGCAAACCCATCCCCAACCCCTGCTGGGCCTGGATAGCAC
 10 CGGTGGTGGTCACCACCACCATCACCCTAGAGTACTGTATGCATCGAGTGCCTG
 GCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAAC
 GCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCC
 AGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT

15 SEQ IDNO: 41-

ATTTAGCGTCTTCTAATCCAGTGTAGACAGTAGTTTTGGCTCCGTTGAGCACTGTAGC
 CTTGGGCGATCGCTCTAAACATTACATAAATTCACAAAGTTTTTCGTTACATAA
 AAATAGTGTCTACTTAGCTAAAAATTAAGGGTTTTTTACACCTTTTTGACAGTTAA
 TCTCCTAGCCTAAAAAGCAAGAGTTTTTAATAAGACTCTTGCCCTTTACAACCT
 20 C

SEQ IDNO: 42-

TGCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAG
 TGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGA
 25 ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT

SEQ IDNO: 43 -

GAGGTTGTAAAGGGCAAGAGTCTTAGTTAAAACTCTTGCTTTTTAGGCTAGGAGATTA
 ACTGTCAAAAAGGTGTAAAAACCCTTAATTTTTAGCTAAGTAGACACTAT
 30 TTTTATGTAACGAAAACCTTTGTGAATTTATGTAATGTTTAGAGCGATCGCCCAAG
 GCTACAGTGCTCAACGGAGCCAAAACCTACTGTCTACACTGGATTAGAAGACGCT
 AAATGGTACCTACGATCTCATATGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTC
 CCTCACTAGGGTTATGCAGCCCGGACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTA
 CATGGACAAAGAGGAAACCAGCATGACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGAC
 35 CGAAGTGACCGGTTGCGCGGCGGACATCAGCCTGGGTCTGCGCTGATTCAGGC
 GTGGCAAAGGATGGTATCTTCCAGATTAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAA

GACCCAAGAAGCGATGGCGGCGAGCAAGCAATTTTGCAAAGAGCCGCTGACCTT
 CAAAAGCAGCTGCGTTAGCGACCTGACCTACAGCGGTTATGTGGCGAGCGGCGA
 GGAAGTTACCGCGGGCAAGCCGATTTCCCGGAAATTTTACCGTGTGCAAGGA
 CCTGAGCGTGGGCGATCAGCGTGTTAAAGCGGGTTGGCCGTGCCATGGTCCGGTT
 5 CCGTGGCCGAACAACACCTATCAAAGAGCATGAAAACCTTTATGGAGGAACTG
 GGTCTGGCGGGCGAGCGTCTGCTGAAACTGACCGCGCTGGGTTTTGAACTGCCG
 ATCAACACCTTCACCGACCTGACCCGTGATGGCTGGCACCACATGCGTGTGCTGC
 GTTTCCCGCCGACAGACCAGCACCCCTGAGCCGTGGTATTGGTGCGCACACCGACTA
 CGGTCTGCTGGTGATTGCGGGCGCAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATATCCGTCCG
 10 CCGGTGGAGGGCGAAAAGCGTAACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCAGCGC
 GGGCATGTTTGGAGCACGACGAACCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTGTG
 TGGACCGTTTTTCCGGGCGATATTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGA
 GCACCCCGCACAAAGGTTAAACTGAACACCCGTGAACGTTTCGCGTGCGCGTACTT
 TCACGAGCCGAACTTCGAAGCGAGCGCGTATCCGCTGTTTCGAGCCGAGCGCGAA
 15 CGAACGTATCCACTACGGCGAGCACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCG
 GATCGTATCACCACCCAACGTATTAACAAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAA
 GACCTGAAGAAATACAGCGACACCCGTGCGACCGGCAGCCACCACCACCATCAT
 CATTAAATGAAAGCTTGCGGGCCGACTCGAGCACCCACCACCACCACCTGAGAT
 CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG
 20 CAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

SEQ ID NO: 44-

CAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAG

25 SEQ ID NO: 45-
 GAGCGTGTATCATATGAGATCTGACGCTCCTTCGAGGTTGTAAAGGGCAAGAGT
 CTTAGTTAAAACTCTTGCTTTTTAGGCTAGGAGATTAAGTGTCAAAAAGGTGTA
 AAAAACCTTAATTTTTAGCTAAGTAGACACTATTTTTATGTAACGAAAACCTTG
 TGAATTTATGTAATGTTTAGAGCGATCGCCCAAGGCTACAGTGCTCAACGGAGCC
 30 AAAACTACTGTCTACACTGGATTAGAAGACGCTAAATGGTACCTACGATCTCATA
 TGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTTCCCTCACTAGGGTTATGCAGCCC
 GGACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTACATGGACAAAGAGGAAACCAG
 CATGACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGACCGAAGTGACCGGTTGCGCGGC
 GGACATCAGCCTGGGTGCTGCGCTGATTCAGGCGTGGCAAAGGATGGTATCTT
 35 CCAGATTAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAAGACCCAAGAAGCGATGGCGG

CGAGCAAGCAATTTTGC AAAGAGCCGCTGACCTTCAA AAGCAGCTGCGTTAGCG
ACCTGACCTACAGCGGTTATGTGGCGAGCGGCGAGGAAGTTACCGCGGGCAAGC
CGGATTTCCCGGAAATTTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGATCAGCG
TGTTAAAGCGGGTTGGCCGTGCCATGGTCCGGTTCGGTGGCCGAACAACACCTAT
5 CAAAAGAGCATGAAAACCTTTATGGAGGAACTGGGTCTGGCGGGCGAGCGTCTG
CTGAAACTGACCGCGCTGGGTTTTGAACTGCCGATCAACACCTTCACCGACCTGA
CCCGTGATGGCTGGCACCACATGCGTGTGCTGCGTTTCCCGCCGCAGACCAGCAC
CCTGAGCCGTGGTATTGGTGC GCACACCCGACTACGGTCTGCTGGTGATTGCGGCG
CAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATATCCGTCCGCCGGTGGAGGGCGAAAAGCGT
10 AACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCAGCGCGGGCATGTTTGAGCACGACGAA
CCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTGTGTGGACCGTTTTTCCGGGCGATA
TTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGAGCACCCCGCACAAGGTTAACT
GAACACCCGTGAACGTTTCGCGTGC GCGTACTTTCACGAGCCGA ACTTCGAAGCG
AGCGCGTATCCGCTGTTGAGCCGAGCGCGAACGAACGTATCCACTACGGCGAG
15 CACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCGGATCGTATCACCACCCAACGTA
TTAACAAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAAGACCTGAAGAAATACAGCGACA
CCCGTGCGACCGGCAGCCACCACCACCATCATCATTAAATGAAAGCTTGCGGCCG
CACTCGAGCACCAACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA
AGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTG
20 GGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGG
ATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTG
GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCG
CTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA
25 AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT
TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTG
GAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG
ATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATT
TTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTT CAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCG
30 CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
ATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATAT
CAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAA
CTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCG
ACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTAT
35 CAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTT
TATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAA

ATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGA
AATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGG
CGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTT
CTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATC
5 ATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTGAG
CCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCAT
GTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGC
ACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCC
ATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCA
10 TAACACCCCTTGTATTACTGTTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGACCAA
AATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC
AAAGGATCTTCGCTAGCAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAA
15 CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGG
20 GGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGAT
ACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT
CCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGAC
TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG
25 CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATG
TTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAGGTACCATTTAGCGTC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный микроорганизм, обладающий улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE,

при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

2. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP,

при этом количество белка AKGP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка AKGP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей AKGP.

3. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, в котором количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, на от примерно 5% до примерно 200% или более больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

4. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

5. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в бактериальную векторную

плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию.

6. Рекомбинантный микроорганизм по п. 2, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную векторную плазмиду, бактериальную векторную плазмиду с большим числом копий, бактериальную векторную плазмиду, имеющую индуцибельный промотор, направляющую нуклеотидную последовательность гомологичной системы рекомбинации, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию.

7. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в векторную плазмиду бактерии *Chlamydomonas sp.*

8. Рекомбинантный микроорганизм по п. 2, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в векторную плазмиду бактерии *Escherichia sp.*

9. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, дополнительно содержащий ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.*

10. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, дополнительно содержащий ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую AKGP, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, экспрессируют объединенную

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, и ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая AKGP, вставлены в бактериальную плазмиду бактерии *Synechococcus sp.*

11. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок -фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP,

при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и

где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

12. Рекомбинантный микроорганизм по п. 11, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – цитратсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

13. Рекомбинантный микроорганизм по п. 1, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – изоцитратдегидрогеназу (IDH), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH,

при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и

где количество AKG, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество AKG, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

14. Рекombинантный микроорганизм по п. 13, где рекombинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекombинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

15. Рекombинантный микроорганизм по п. 11, где рекombинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

16. Рекombинантный микроорганизм по п. 1, где рекombинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – сахарозопермеазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 24, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу,

при этом количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого рекombинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка – сахарозопермеазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей сахарозопермеазу.

17. Рекombинантный микроорганизм по п. 1, где рекombинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из белка – сахарозофосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID NO. 26, белка сахарозо-6-фосфатазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 28, белка гликогенфосфорилазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 30, и белка UTP-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 32, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок,

где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекombинантным микроорганизмом, больше, чем количество по меньшей мере одного белка,

продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок,

где количество сахарозы, продуцируемой рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество сахарозы, продуцируемой контрольным микроорганизмом.

18. Рекомбинантный микроорганизм по п. 17, где рекомбинантный микроорганизм содержит по меньшей мере одну делецию в по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один белок, выбранный из белка инвертазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 34, белка – глюкозилглицеринфосфатсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 36, и белка гликогенсинтазы, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 38, где количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество по меньшей мере одного белка, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим по меньшей мере одной делеции.

19. Способ получения рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, включающий:

получение рекомбинантного микроорганизма посредством вставки ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, или ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE, объединенной с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, в бактериальную плазмиду микроорганизма,

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4, или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6; или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7.

20. Способ по п. 19, в котором микроорганизм выбран из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

21. Способ по п. 19, в котором ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3, и микроорганизм представляет собой бактерию *Chlamydomonas* sp; или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 4, и микроорганизм представляет собой бактерию *Escherichia* sp; или

ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp; или

ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей АКГР, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7, и микроорганизм представляет собой бактерию *Synechococcus* sp.

22. Способ получения этилена, включающий:

предоставление рекомбинантного микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать этилен, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – фермент, образующий этилен (EFE), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE,

при этом количество белка EFE, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка EFE, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE;

культивирование рекомбинантного микроорганизма в сосуде биореактора для культивирования в условиях, достаточных для получения этилена в сосуде биореактора для культивирования; и

сбор этилена из сосуда биореактора для культивирования.

23. Способ по п. 22, в котором рекомбинантный микроорганизм содержит ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, объединенную с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, вставленную в бактериальную плазмиду микроорганизма,

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4, или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 7; или

где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, объединенная с ненативной нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей AKGP, экспрессирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6.

24. Способ по п. 22, в котором микроорганизм выбран из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.

25. Способ по п. 22, дополнительно включающий увеличение количества продукции этилена посредством добавления по меньшей мере одного активатора к культуре, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования; или добавление CO₂ к атмосфере культуры, содержащейся в сосуде биореактора для культивирования, со скоростью от примерно 100 мл/минута до примерно 500 мл/минута.

26. Способ по п. 22, дополнительно включающий уменьшение количества продукции этилена посредством удаления по меньшей мере одного молекулярного переключателя из клеточной культуры, содержащей рекомбинантный микроорганизм, расположенной в сосуде биореактора для культивирования.

27. Способ по п. 22, дополнительно включающий осуществление контроля над количеством этилена, продуцируемым из микробной культуры, посредством увеличения или уменьшения концентрации по меньшей мере одного питательного вещества или количества по меньшей мере одного стимула при культивировании рекомбинантного микроорганизма.

28. Способ по п. 22, в котором концентрация по меньшей мере одного питательного вещества и количество по меньшей мере одного стимула находятся в соотношении от примерно 0,5-1,5 гр./литр до примерно 0,1 мМ в микробной культуре.

29. Способ по п. 22, дополнительно включающий удаление продуцируемого количества этилена из микробной культуры посредством конденсации этилена из газового в жидкое состояние, или когда количество выделенного этилена составляет от примерно 0,5 мл до примерно 10 мл/литр/ч.

30. Рекомбинантный микроорганизм, обладающий улучшенной способностью продуцировать альфа-кетоглутарат (AKG),

где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок фосфоенолпируватсинтазу (PEP), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 15, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP, и

при этом количество белка PEP, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка PEP, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей PEP; или

где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – изоцитратдегидрогеназу (IDH), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 20, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH, и

при этом количество белка IDH, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка IDH, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей IDH;

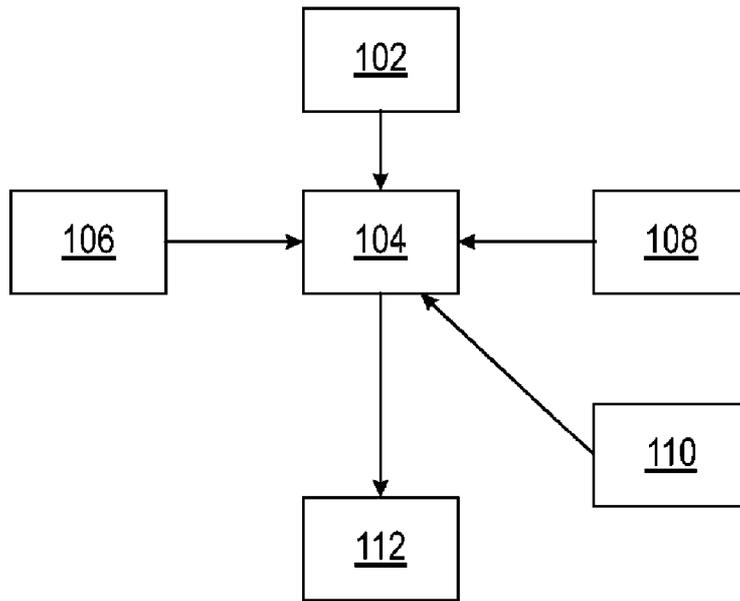
где количество АКГ, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество АКГ, продуцируемого контрольным микроорганизмом.

31. Рекомбинантный микроорганизм по п. 30, где рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок – цитратсинтазу, имеющий аминокислотную

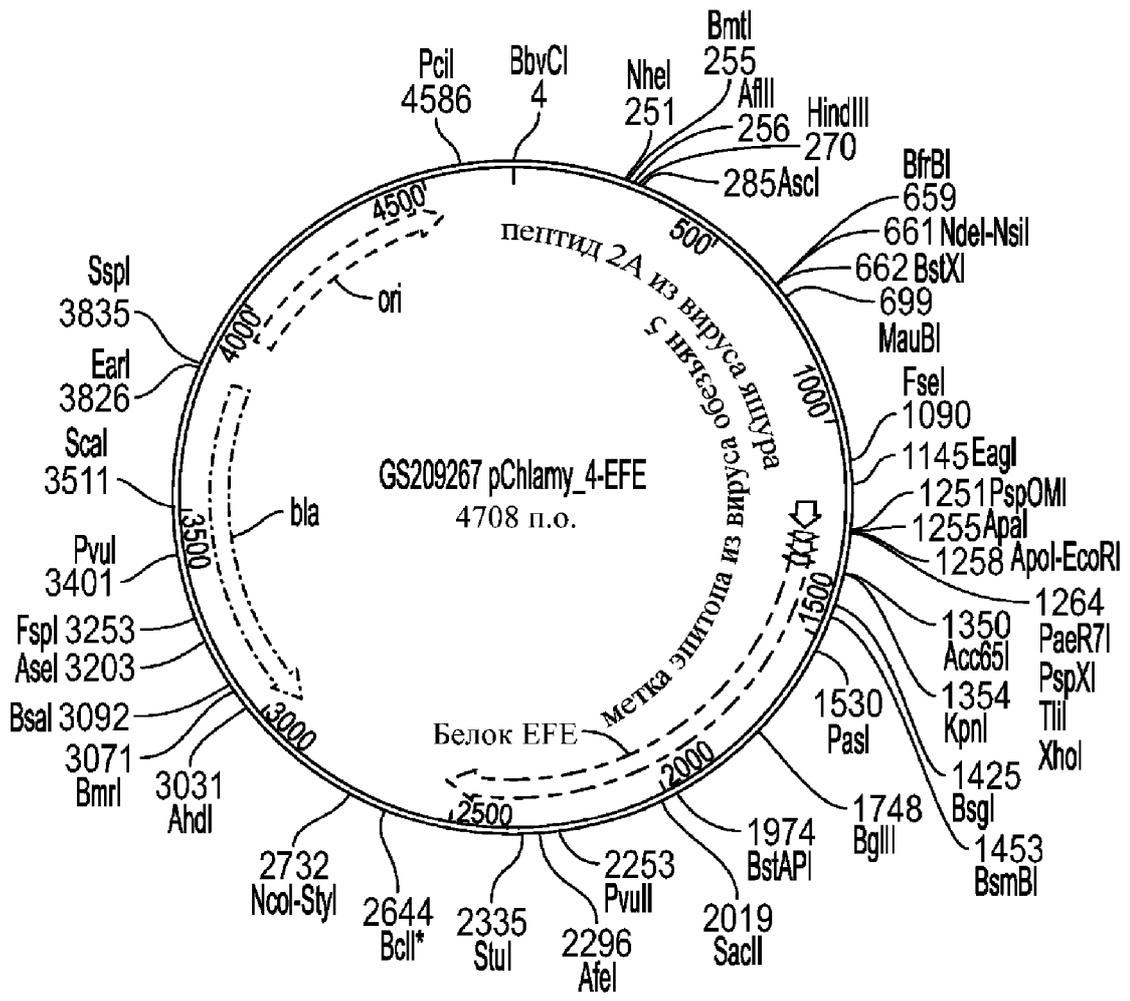
последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO. 17, посредством экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу, при этом количество белка цитратсинтазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество белка цитратсинтазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей цитратсинтазу.

32. Рекомбинантный микроорганизм по п. 30, где рекомбинантный микроорганизм содержит делецию в нуклеотидной последовательности, экспрессирующей глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазу, при этом количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого рекомбинантным микроорганизмом, меньше, чем количество белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы, продуцируемого контрольным микроорганизмом, не имеющим делеции.

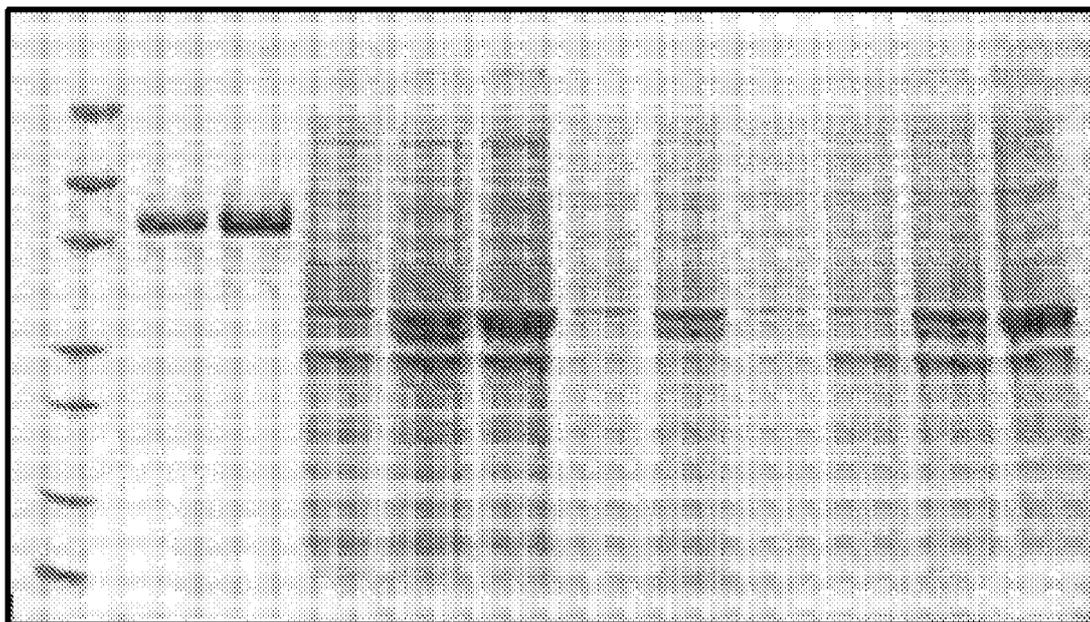
33. Рекомбинантный микроорганизм по п. 30, где рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из цианобактерий, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, геобактерий, водорослей, микроводорослей, бактерий, осуществляющих электросинтез, фотосинтезирующего микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки.



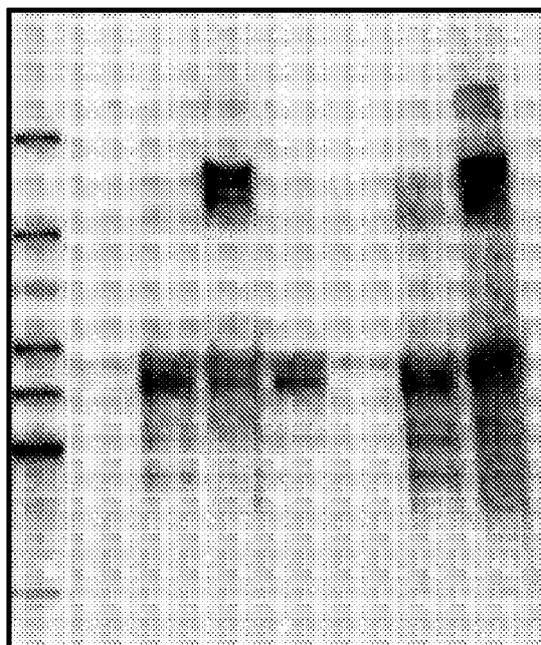
ФИГ. 1



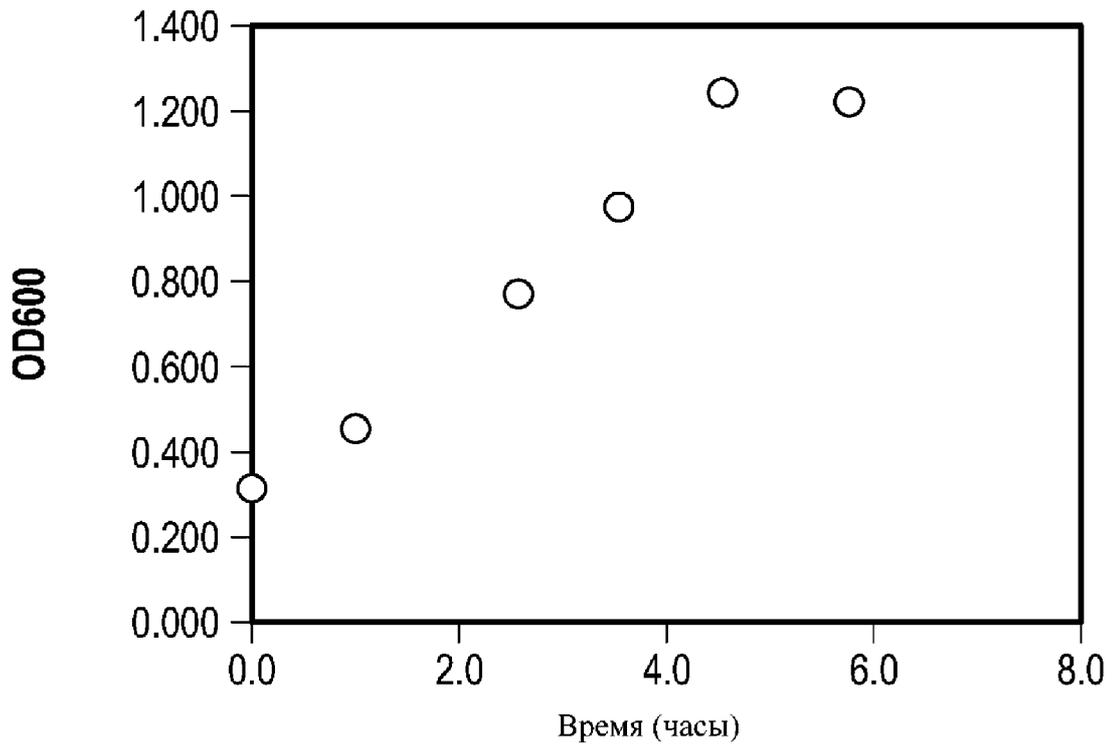
ФИГ. 2



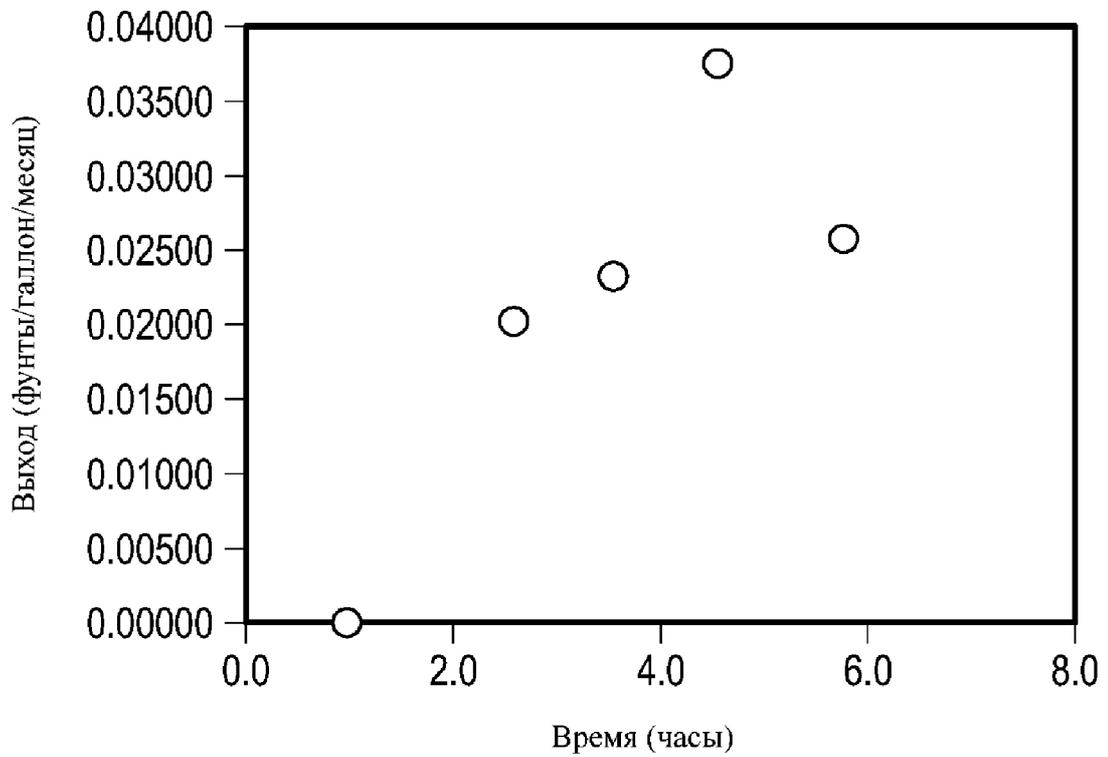
ФИГ. 3А



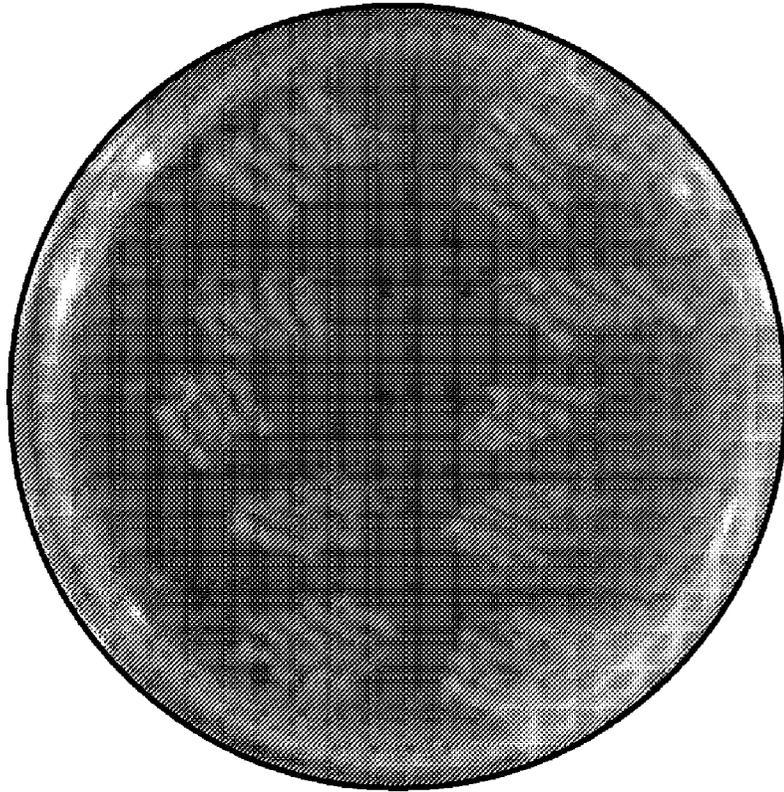
ФИГ. 3В



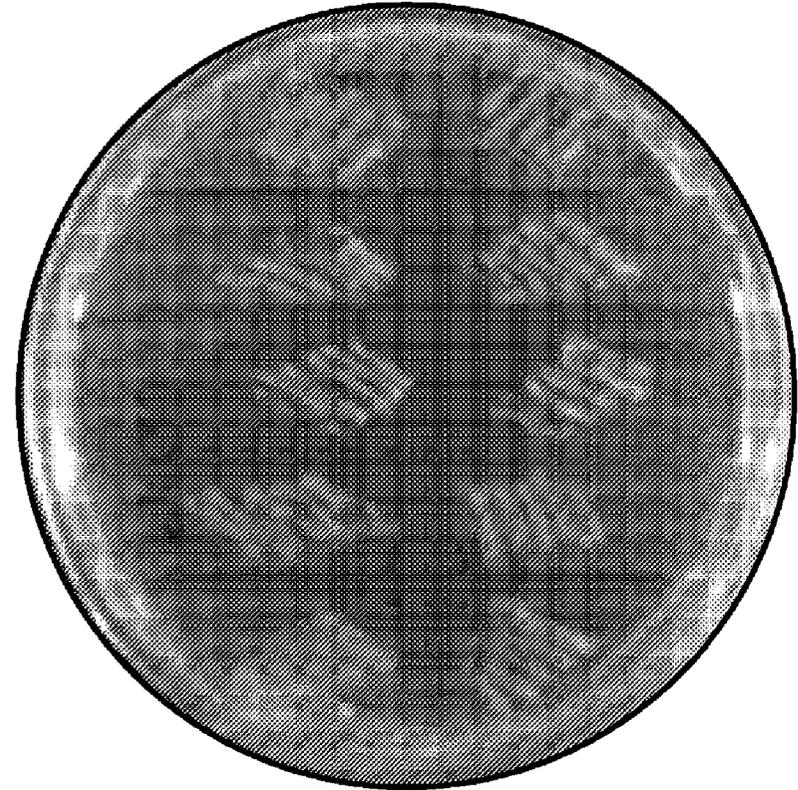
ФИГ. 4А



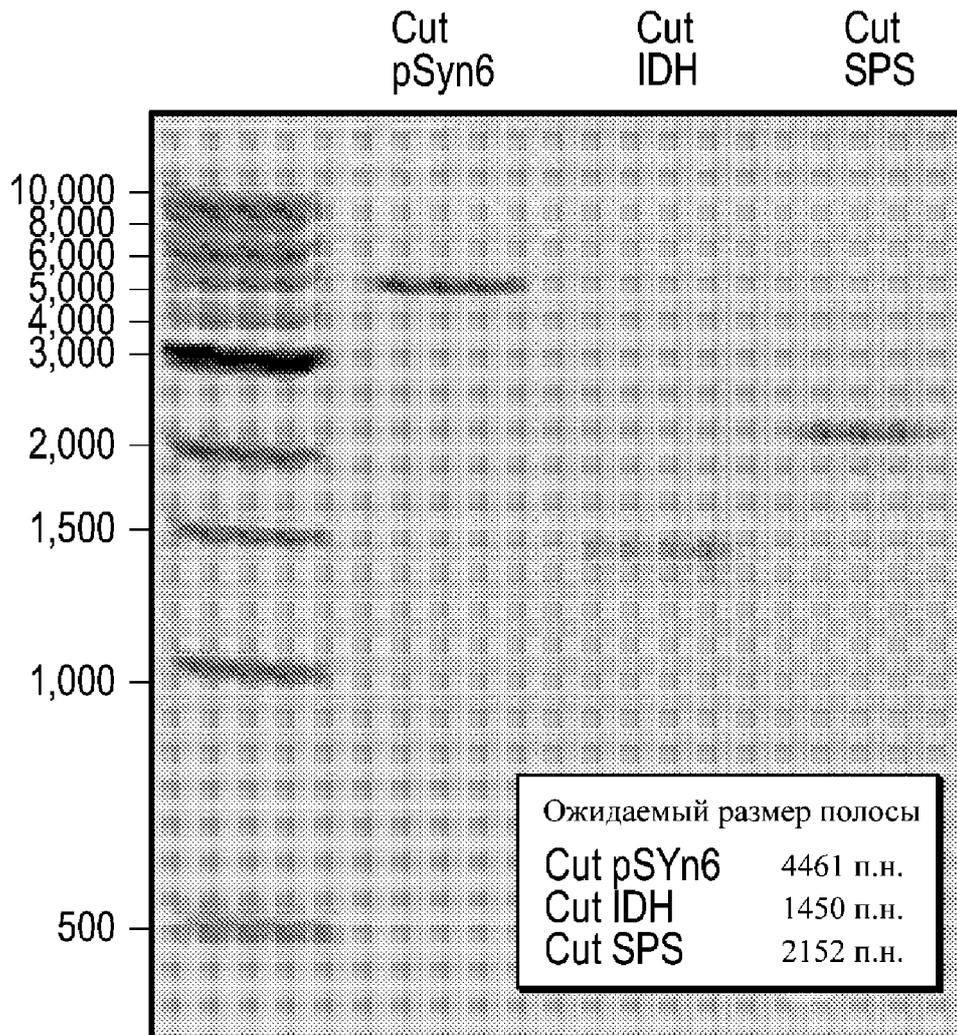
ФИГ. 4В



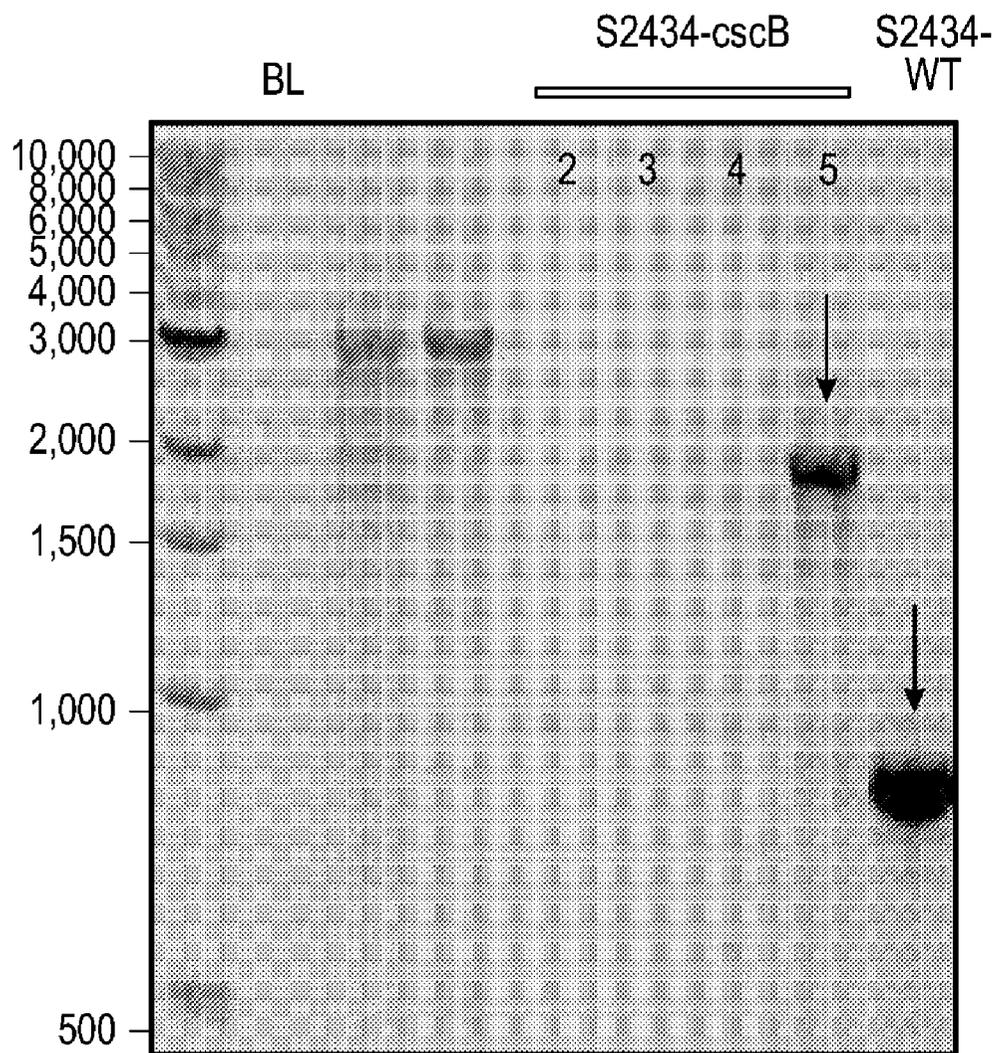
ФИГ. 5А



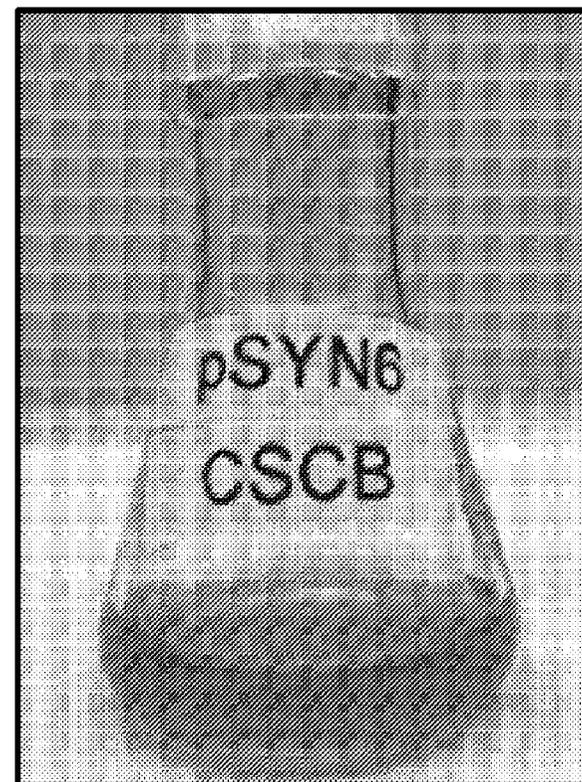
ФИГ. 5В



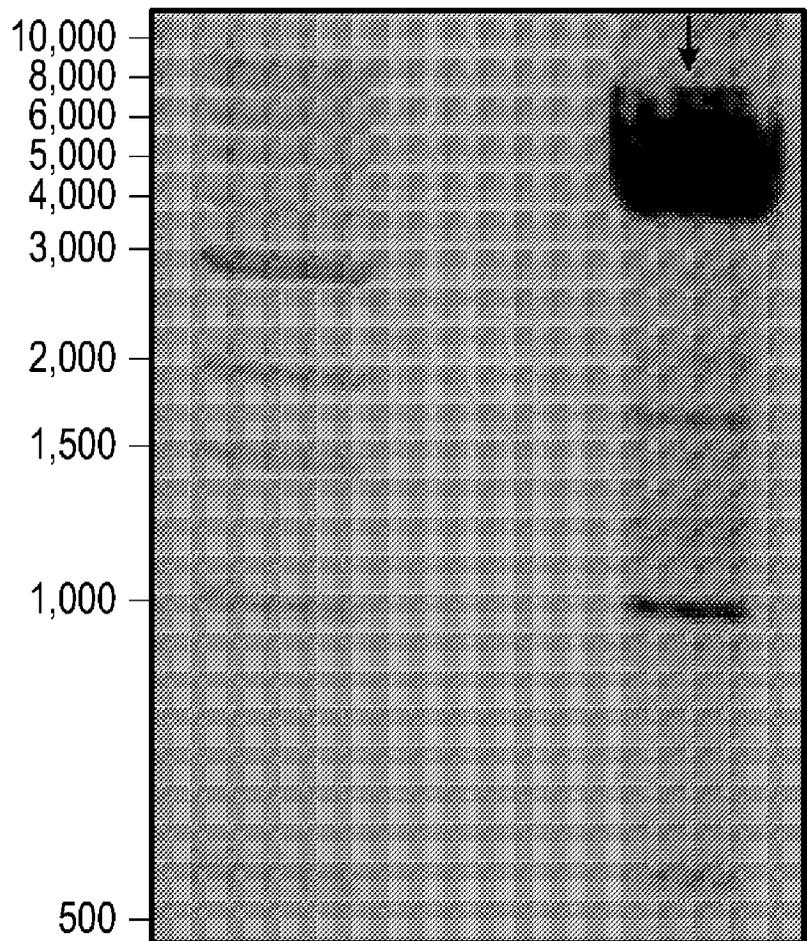
ФИГ. 6



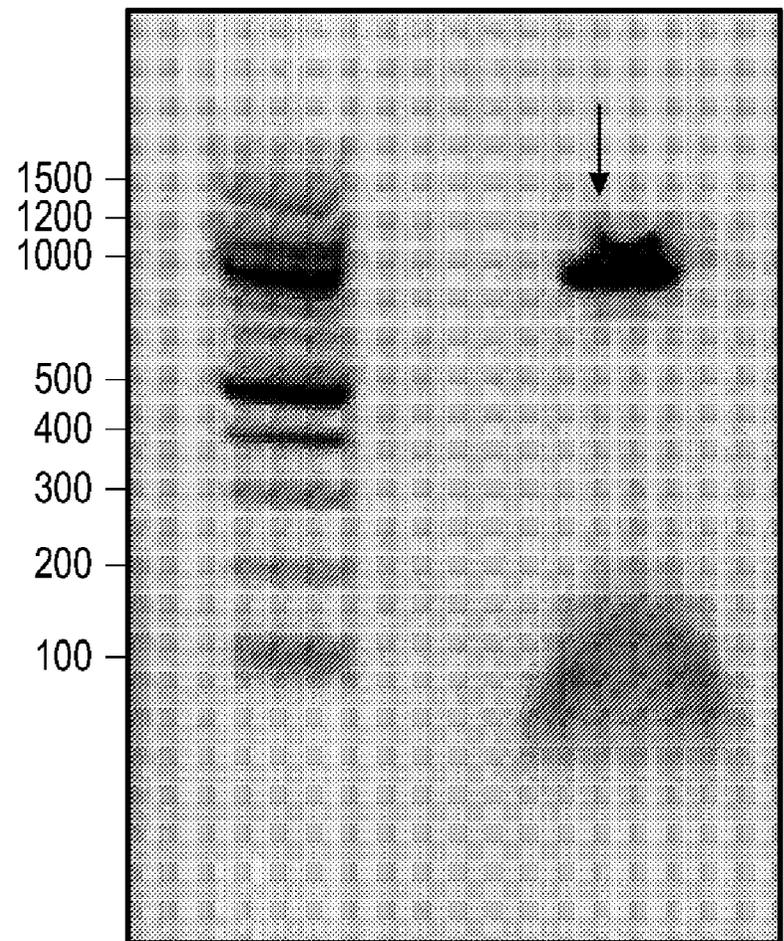
ФИГ. 7А



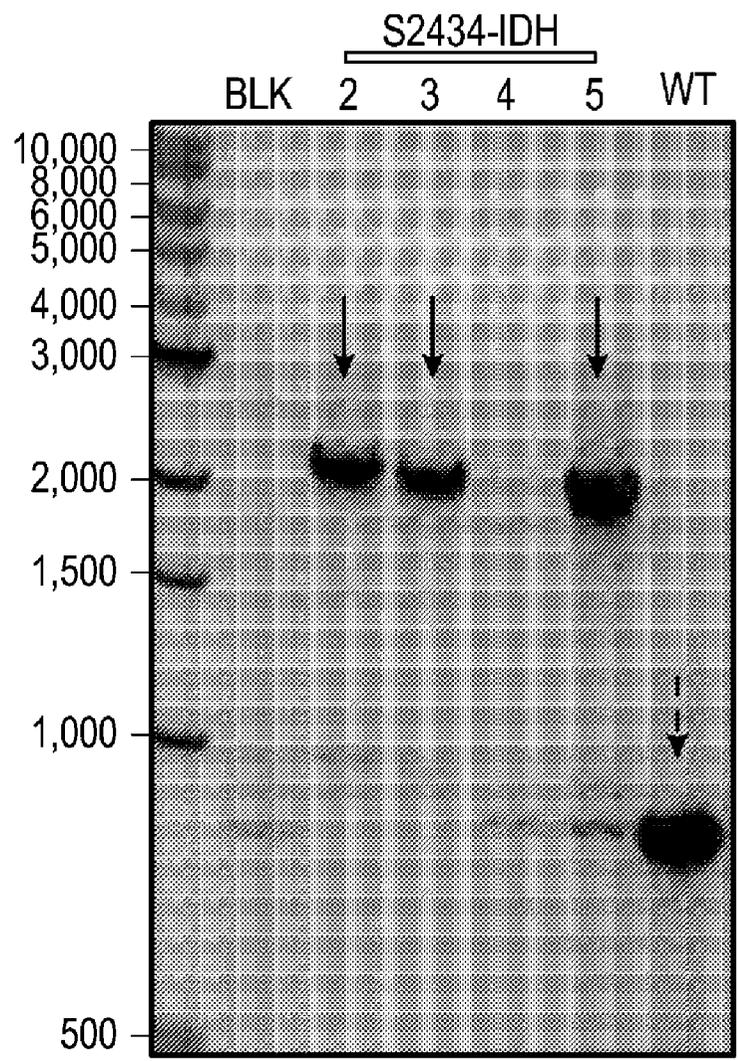
ФИГ. 7В



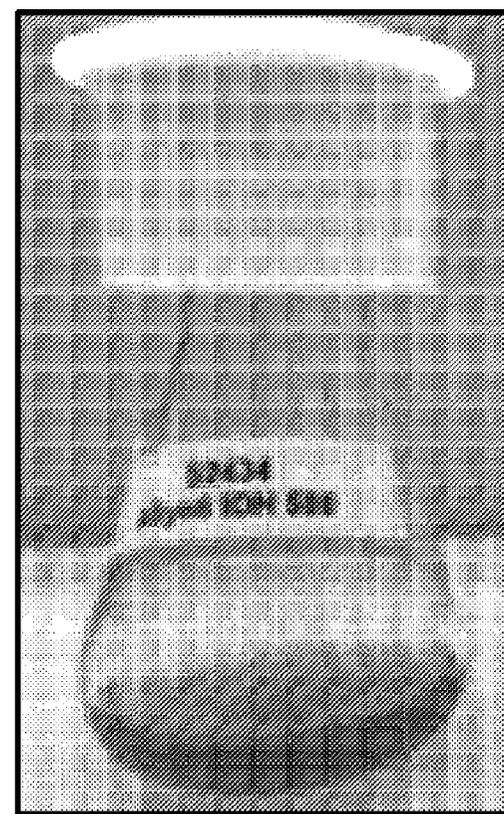
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В



ФИГ. 9А



ФИГ. 9В