

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292341**

(13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
**2022.11.30**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/74** (2006.01)  
**C12N 9/88** (2006.01)  
**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12P 7/22** (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
**2021.01.15**

**(54) ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ 2-ФЕНИЛЭТАНОЛА ИЗ ГАЗОВЫХ СУБСТРАТОВ**

**(31)** **62/991,428**

**(32)** **2020.03.18**

**(33)** **US**

**(86)** **PCT/US2021/013723**

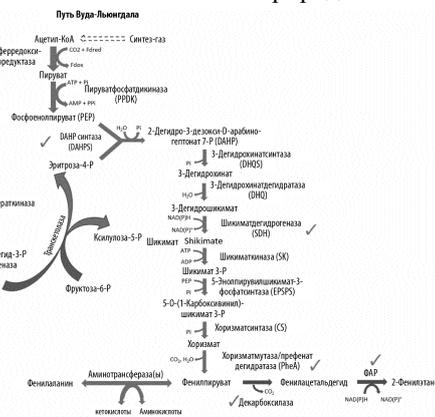
**(87)** **WO 2021/188190 2021.09.23**

**(71)** Заявитель:  
**ЛАНЦАТЕК, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лью Фунминь, Кёнке Михаэль,  
Нагараджу Шилпа, Харрис Одри (US)**

**(74)** Представитель:  
**Хмара М.В. (RU)**

**(57)** В изобретении раскрыты способы получения 2-фенилэтанолa путем микробной ферментации субстратов, содержащих монооксид углерода и/или диоксид углерода, и дополнительно раскрыты генетически модифицированные микроорганизмы для применения в таких способах. Кроме того, раскрытые в данном документе процессы представляют собой усовершенствованные способы производства 2-ФЭ, которые уменьшают зависимость от природных и нефтехимических процессов.



202292341 A1

202292341 A1

## ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ 2-ФЕНИЛЭТАНОЛА ИЗ ГАЗОВЫХ СУБСТРАТОВ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5            Данная заявка испрашивает приоритет на основе предварительной заявке на патент США № 62/991,428, поданной 18 марта 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### ПРАВА ПРАВИТЕЛЬСТВА

10            Это изобретение было сделано при поддержке правительства в соответствии с Соглашением о сотрудничестве DE-EE0007728, заключенным Министерством энергетики.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

15            Настоящая заявка относится к способам получения 2-фенилэтанола путем микробной ферментации субстратов, содержащих диоксид углерода (CO<sub>2</sub>), монооксид углерода (CO) и/или водород (H<sub>2</sub>), и генетически модифицированным микроорганизмам для применения в таких способах.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

20            Смягчение последствий надвигающегося изменения климата требует резкого сокращения выбросов парниковых газов (ПГ), например тех, которые образуются при сжигании горючих полезных ископаемых, таких как уголь и нефть. Хотя экологически безопасных источников химических веществ и транспортного топлива в настоящее время недостаточно для существенного замещения нашей зависимости от ископаемого углерода, ферментация газов с недавних пор возникла в качестве альтернативной платформы для биологической фиксации таких газов, как CO<sub>2</sub>, CO и/или H<sub>2</sub> с превращением их в стабильное топливо и химические вещества. В частности, в 25            технологии ферментации газов может использоваться широкий спектр исходного сырья, в том числе газифицированные органические вещества (например, твердые коммунально-бытовые отходы или отходы сельскохозяйственного производства) или промышленные газообразные отходы (например, от сталелитейных заводов или нефтеперерабатывающих заводов) для получения этанола, горючего для реактивных 30            двигателей, и большого количества других продуктов. Сама по себе ферментация газов может заменить 30% использования сырой нефти и сократить глобальные выбросы CO<sub>2</sub> на 10%, но, как и в случае любой инновационной технологии, необходимо решить множество технических первоочередных задач, прежде чем этот потенциал будет полностью реализован.

2-Фенилэтанол (2-ФЭ) является товарным химическим веществом с рынком 6010 т/год в пищевой промышленности, производстве ароматизаторов и ароматизаторов из-за его «розового» аромата и 900 т/год в химической промышленности в качестве промежуточного сложного эфира и, теоретически, в производстве стирола. В настоящее время 2-ФЭ получают из природных источников для его применения в пищевой, парфюмерной и ароматической промышленности или синтезируют химическим путем для других целей. Таким образом, существует потребность в улучшенных способах получения 2-ФЭ, которые снижают зависимость от природных и нефтехимических процессов.

## 10 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из аспектов изобретение относится к микроорганизму, способному продуцировать 2-фенилэтанол, где микроорганизм содержит гетерологичный фермент, который превращает фенилпируват в фенилацетальдегид, и гетерологичный фермент, который превращает фенилацетальдегид в 2-фенилэтанол.

15 В некоторых вариантах реализации гетерологичным ферментом, который превращает фенилпируват в фенилацетальдегид, является декарбоксилаза, а гетерологичным ферментом, который превращает фенилацетальдегид в 2-фенилэтанол, является фенилацетальдегидредуктаза. В частности, декарбоксилаза может представлять собой фенилпируват-специфическую декарбоксилазу.

20 В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой C1-фиксирующий микроорганизм, микроорганизм Вуда-Льюнгдала и/или бактерию. В некоторых вариантах реализации микроорганизм относится к роду *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* или *Thermoanaerobacter*.

25 В некоторых вариантах реализации микроорганизм нативно способен продуцировать фенилпируват. В некоторых вариантах реализации микроорганизм включает путь Вуда-Льюнгдала, который превращает CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub> в ацетил-КоА.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм содержит одно или несколько из следующего: нативный фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват; нативный фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват; нативный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат; нативный фермент, который превращает 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат в 3-дегидрохинат; нативный фермент, который превращает 3-дегидрохинат в 3-дегидрошикимат; нативный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат; нативный фермент, который превращает

30  
35

шикимат в шикимат-3-фосфат; нативный фермент, который превращает шикимат-3-фосфат в 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат; нативный фермент, который превращает 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат в хоризмат; или нативный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

5 В некоторых вариантах реализации нативным ферментом, который превращает ацетил-КоА в пируват, является пируват:ферредоксиноредуктаза (PFOR; E.C. 1.2.7.1); нативным ферментом, который превращает пируват в фосфоенолпируват, является пируватфосфаткиназа (PPDK; E.C.2.7.9.1); нативным ферментом, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-  
10 гептонат-7-фосфат, является 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфатсинтаза (DAHPS или DAHP-синтаза; E.C.2.5.1.54); нативным ферментом, который превращает 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат в 3-дегидрохинат, является 3-дегидрохинатсинтаза (DHQS; E.C.4.2.3.4); нативным ферментом, который превращает 3-дегидрохинат в 3-дегидрошикимат, является 3-дегидрохинатдегидратаза (DHQ;  
15 E.C.4.2.1.10); нативным ферментом, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, является шикиматдегидрогеназа (SDH; E.C. 1.1.1.25); нативным ферментом, который превращает шикимат в шикимат-3-фосфат, является шикиматкиназа (SK; E.C. 2.7.1.71); нативным ферментом, который превращает шикимат-3-фосфат в 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат, является 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтаза (EPSPS или EPSP-синтаза; E.C. 2.5.1.19); нативным ферментом, который превращает 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат в хоризмат, является хоризматсинтаза (CS; E.C. 4.2.3.5); или нативный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват, является бифункциональная хоризматмутаза (E.C. 5.4.99.5)/префенатдегидратаза (E.C.4.2.1.51).

25 В некоторых вариантах реализации микроорганизм дополнительно содержит один или несколько гетерологичных ферментов, которые превращают фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат; гетерологичный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат; или гетерологичный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

30 В некоторых вариантах реализации гетерологичный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат, является 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфатсинтаза; гетерологичным ферментом, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, является шикиматдегидрогеназа; или гетерологичным ферментом, который превращает  
35 хоризмат в фенилпируват, является бифункциональная хоризматмутаза/префенатдегидратаза.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм содержит:

- (1) *ecAroE*, *kivD*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (2) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (3) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- 5 (4) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (5) *cgAroE*, *kivD*, *rrPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (6) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (7) *pheA1*, *aroG*, *abPPDC* и *ecPAR*;
- (8) *egAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- 10 (9) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (10) *cgAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (11) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (12) *cgAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (13) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- 15 (14) *ecAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (15) *ecAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (16) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (17) *cgAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (18) *cgAroE*, *abPPDC*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- 20 (19) *ecAroE*, *kivD*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (20) *cgAroE*, *aro10*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (21) *ecAroE*, *abPPDC*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (22) *ecAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA1* и *aroG*;
- (23) *cgAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*;
- 25 (24) *cgAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (25) *ecAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (26) *ecAroE*, *aro10*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*; или
- (27) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*.

30 В некоторых вариантах реализации микроорганизм содержит гетерологичные гены и промоторы комбинаторного штамма 2C03, 1C10, 2C54, 2C09, 2C47, 2C55, 2C53, H57, 1C47, 2C10, 2A18, 1C54, 2C01, 1C31, 2B17, 2C52, 1C09, H18, H58, 2C27, 2D22, 2D07, 2D24, 2D03, 1C29, 2B26, 2C38, 2A27, 2C12 или 2B27.

35 В некоторых вариантах реализации микроорганизм ферментирует газообразный субстрат, содержащий CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub>, с получением 2-фенилэтанола. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат включает синтез-газ или промышленные газообразные отходы.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм не продуцирует никаких других спиртов C3+. В некоторых вариантах реализации микроорганизм не продуцирует никаких других спиртов C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или C10.

5 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ получения 2-фенилэтанола, включающий культивирование микроорганизма в присутствии газообразного субстрата. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат содержит источник C1-углерода, включающий CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub>. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат включает синтез-газ или промышленные газообразные отходы.

10 Конкретные варианты реализации настоящего изобретения станут очевидными из следующего более подробного описания некоторых вариантов реализации и формулы изобретения.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

15 **Фиг. 1** показывает метаболический путь, ведущий к биосинтезу 2-фенилэтанола *Clostridium autoethanogenum* в результате ферментации газа. Ферментативные стадии, требующие гетерологичной экспрессии, включают стадии декарбоксилазы и фенилацетальдегидредуктазы (ФАР). Пунктирная стрелка показывает мультиферментный основной метаболический путь в *C. autoethanogenum*. Углерод и водород ассимилируются в ацетил-КоА по пути Вуда-Льюнгадала, который затем превращается в пируват с помощью пируват:ферредоксиноксидоредуктазы. Биосинтез ароматических аминокислот начинается с фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата, которые биосинтезируются из пирувата основными метаболическими путями, такими как глюконеогенез и пентозофосфатный путь. 2-Фенилпируват может быть получен шикиматным путем и аминотрансферазными реакциями между фенилаланином и кетокислотами. Ферменты, которые были гетерологически экспрессированы или сверхэкспрессированы в раскрытых в данном документе примерах, помечены галочкой. NAD(P)H включает NADPH и NADH.

20

25

**Фиг. 2А-2Б** показывают автотрофный рост *Clostridium autoethanogenum* в присутствии различных количеств 2-ФЭ в бутылках Шотта. **Фиг. 2А:** Профиль роста; **Фиг. 2Б:** концентрация 2-ФЭ, измеренная с помощью ГХ-ПИД. Бессп. = беспорный; N = 2; Панель ошибок = S.D.

30

**Фиг. 3А** показывает профиль роста, а **Фиг. 3Б** показывает титр конечной продукции спирта во время автотрофного роста с использованием 150 кПа смеси синтез-газов (50% CO, 10% H<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub> и 10% N<sub>2</sub>) в бутылках Шотта между тремя штаммами декарбоксилазы: *abPPDC*, *aro10* и контроль *kivD\_1a*. N = 3; Панель ошибок = S.D.

35

**Фиг. 4А-4В** показывают сверхэкспрессию фенилацетальдегидредуктазы (ФАР) в *Clostridium autoethanogenum* для продуцирования 2-ФЭ. **Фиг. 4А:** Происхождение вида, длина аминокислоты, специфичность кофактора и ссылка на используемую ФАР. **Фиг. 4Б:** Филогенетическое дерево вариантов ФАР с использованием аминокислотной последовательности. Масштабная линейка соответствует 0,2 изменения на аминокислоту. **Фиг. 4В:** Нормализованное продуцирование 2-ФЭ штаммами с различными вариантами ФАР в 12-луночных планшетах после 7 дней инкубации в присутствии смеси синтез-газов 200 кПа (50% CO, 10% H<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub> и 10% N<sub>2</sub>); N=3-5; Панель ошибок = S.D.

10 **Фиг. 5** показывает комбинаторную сборку генов пути 2-ФЭ с использованием метода Золотые ворота.

**Фиг. 6** показывает варианты генов и промоторов, которые использовались для двух комбинаторных библиотек 2-ФЭ, описанных в Примере 4.

15 **Фиг. 7А-В** показывают характеристику 162 комбинаторных штаммов 2-ФЭ в 12-луночных планшетах со смесью синтез-газа 200 кПа (50% CO, 10% H<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub> и 10% N<sub>2</sub>). **Фиг. 7А:** титр 2-ФЭ относительно контрольного штамма sFA212; **Фиг. 7Б:** титр 2-ФЭ, нормализованный по концентрации биомассы; **Фиг. 7В:** Концентрация биомассы; Продолжительность инкубации = 8-10 дней; N = 2; Панель ошибок = S.D.

20 **Фиг. 8А-Д** показывают сравнение конечных титров 2-ФЭ в комбинаторных штаммах в соответствии с: количеством плазмид (**Фиг. 8А**); бифункциональные варианты хоризматмутазы/префенатдегидратазы (**Фиг. 8Б**); варианты декарбоксилазы (**Фиг. 8В**); варианты шикиматдегидрогеназы (**Фиг. 8Г**); и варианты фенилацетальдегидредуктазы (**Фиг. 8Д**). Продолжительность инкубации = 8-10 дней; Панель ошибок = S.D.

25 **Фиг. 9А-Б** показывают характеристику 12 комбинаторных штаммов при непрерывной ферментации CSTR (Реактор с мешалкой непрерывного действия) с использованием смеси синтез-газов (40% CO, 20% H<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub> и 20% N<sub>2</sub>). В штамме 1С29 наблюдали увеличение титра 2-ФЭ в 2,9 раза по сравнению с контрольным штаммом sFA212. 10 штаммов достигли более высокого выхода 2-ФЭ по сравнению с контрольным штаммом.

30 **Фиг. 10А-Б** показывают продуцирование 2-ФЭ комбинаторного штамма 1С29 в двух непрерывных циклах CSTR с ограничением азота.

35 **Фиг. 11А-В** показывают результаты тестирования действия синтез-газа, полученного из предварительно обработанной кукурузной соломы (23,3% H<sub>2</sub>, 38,7% CO, 19,6% CO<sub>2</sub> и 18,4% N<sub>2</sub>) при непрерывной ферментации CSTR с использованием штамма sFA212. **Фиг. 11А:** профиль метаболитов, проанализированный с помощью ВЭЖХ; **Фиг.**

**11Б:** газовый профиль, проанализированный с помощью ГХ-ДТП (отрицательный результат = поглощение); **Фиг. 11В:** Профиль 2-ФЭ, анализируемый ГХ-ПВД. Настоящий синтез-газ использовали между 6,9 и 10,9 днями (всего 4 дня).

## 5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе раскрыты способы и композиции для биосинтеза *de novo* 2-фенилэтанола (2-ФЭ) из синтез-газа, которые могут уменьшить зависимость от природных и нефтехимических процессов производства 2-ФЭ.

### Определения

10 Если не указано иное, следующие термины, используемые в данном описании, определены следующим образом:

Термин «ферментация» следует понимать как метаболический процесс, приводящий к химическим изменениям в субстрате. Например, в процесс ферментации вводят один или несколько субстратов и получают один или несколько продуктов  
15 посредством применения одного или нескольких микроорганизмов. Термины «ферментация», «ферментация газов» и т. п. следует понимать как процесс, в который вводят один или несколько субстратов, таких как синтез-газ, получаемый посредством газификации, и получают один или несколько продуктов в результате использования одного или нескольких C1-фиксирующих микроорганизмов. Предпочтительно процесс  
20 ферментации включает применение одного или нескольких биореакторов. Процесс ферментации можно описать либо как «периодический», либо как «непрерывный». «Периодическую ферментацию» используют для описания процесса ферментации, в котором биореактор заполняют сырьевым материалом, например, источником углерода, вместе с микроорганизмами, при этом продукты остаются в  
25 биореакторе до завершения ферментации. В «периодическом» процессе после завершения ферментации продукты извлекают и очищают биореактор перед запуском следующей «партии». «Непрерывную ферментацию» используют для описания процесса ферментации, в котором указанный процесс ферментации протекает в течение более длительных интервалов времени, при этом продукт и/или метаболит извлекают во время  
30 ферментации. Предпочтительно процесс ферментации является непрерывным.

Подразумевается, что термин «не встречающийся в природе», применяемый в отношении микроорганизма, означает, что указанный микроорганизм содержит по меньшей мере одну генетическую модификацию, не обнаруживаемую в природном штамме указанного вида, в том числе в штаммах дикого типа указанного

вида. Микроорганизмы, не встречающиеся в природе, как правило, созданы в лаборатории или исследовательском центре.

Термины «генетическая модификация», «генетическая альтерация» или «генная инженерия» в широком смысле обозначают воздействие на геном или нуклеиновые кислоты микроорганизма руками человека. Аналогичным образом термины «генетически модифицированный», «генетически альтерированный» или «генетически сконструированный» обозначают микроорганизм, содержащий такие генетические модификации, генетические альтерации или генносконструированные элементы. Эти термины можно использовать для дифференциации созданного в лаборатории микроорганизма от микроорганизма, встречающегося в природе. К методам генетической модификации относится, например, экспрессия гетерологичного гена, инсерция или делеция гена или промотора, мутация нуклеиновой кислоты, измененная экспрессия гена или инактивация, ферментная инженерия, направленная эволюция, конструирование на основе существующих знаний, способы случайного мутагенеза, генная перестановка и оптимизация кодонов.

Метаболическая инженерия микроорганизмов, таких как *Clostridia*, может значительно расширять их способность к воспроизводству многих важных горючих веществ и молекул химических соединений, отличающихся от естественных метаболитов, таких как этанол. В последние годы было разработано несколько различных методов геномной инженерии для *Clostridia*, в том числе методы на основе интронов (ClosTron) (Kuehne, *Strain Eng: Methods and Protocols*, 389-407, 2011), методы аллельного обмена (ACE) (Heap, *Nucl Acids Res*, 40: e59, 2012; Ng, *PLoS One*, 8: e56051, 2013), методы тройного скрещивания (Liew, *Frontiers Microbiol*, 7: 694, 2016), методы, опосредованные через I-SceI (Zhang, *Journal Microbiol Methods*, 108: 49-60, 2015), MazF (Al-Hinai, *Appl Environ Microbiol*, 78: 8112-8121, 2012) или другие (Argyros, *Appl Environ Microbiol*, 77: 8288-8294, 2011), Cre-Lox (Ueki, *mBio*, 5: e01636-01614, 2014) и CRISPR/Cas9 (Nagaraju, *Biotechnol Biofuels*, 9: 219, 2016). Однако по-прежнему особенно важной задачей остается возможность итеративного внесения более чем нескольких генетических изменений по причине медленной и трудоемкой реализации цикла и ограничений на возможность перенесения таких генетических методов на другие виды. Кроме того, метаболизм C1 у *Clostridia* еще не настолько достаточно изучен, чтобы можно было надежно прогнозировать модификации, которые будут увеличивать до максимальных величин поглощение и конверсию C1, и изменения углерода/энергии/редокс-потенциала при синтезе продукта. Вследствие этого введение целевых сигнальных путей в *Clostridia* остается кропотливым и трудоемким процессом.

Термин «рекомбинантный» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм является продуктом генетической модификации, инженерии или

рекомбинации. В общем случае термин «рекомбинантный» обозначает нуклеиновую кислоту, белок или микроорганизм, который содержит или кодирован генетическим материалом, полученным из различных источников, например, из двух или нескольких различных штаммов или видов микроорганизмов.

5 Термин «дикий тип» обозначает типовую форму организма, штамма, гена или характеристики в том виде, в каком они встречаются в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

«Эндогенный» или «нативный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует или экспрессирован в микроорганизме дикого типа или  
10 родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который нативно присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения экспрессией эндогенного гена можно управлять с помощью экзогенного  
15 регуляторного элемента, например, экзогенного промотора.

Термин «экзогенный» обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который берет начало вне микроорганизма по данному изобретению. Например, экзогенный ген или фермент может быть создан искусственно или рекомбинантно и введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем. Экзогенный ген или фермент также  
20 может быть выделен из гетерологичного микроорганизма и введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы с возможностью интеграции в геном микроорганизма по данному изобретению, или сохранения во внехромосомном состоянии в микроорганизме по данному изобретению, например, в плазмиде.

25 Термин «гетерологичный» обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который не присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Например, гетерологичный ген или фермент может быть получен из другого штамма или видов и введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем. Гетерологичный ген  
30 или фермент может быть введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем в той форме, в которой он встречается в указанных других штаммах или видах. В альтернативном варианте реализации изобретения гетерологичный ген или фермент может быть модифицирован определенным образом, например, посредством оптимизации его кодонов для экспрессии в микроорганизме по  
35 данному изобретению или посредством инженерии с изменением его функции, например,

с изменением направления активности фермента или изменением субстратной специфичности.

Термины «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо. Они обозначают полимерную форму нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут обладать любой трехмерной структурой и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определяемые при анализе сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (киРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная РНК с любой последовательностью, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, метилированных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов. Модификации нуклеотидной структуры, при их наличии, могут быть внедрены до или после сборки полимера. Нуклеотидная последовательность может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, посредством конъюгации с метящим компонентом.

В контексте данного документа термин «экспрессия» обозначает процесс, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт) и/или процесс, посредством которого транскрибированная мРНК последовательно транслируется в пептиды, полипептиды, или белки. Транскрипты и закодированные полипептиды могут совместно именоваться «генными продуктами».

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» в данном документе используются взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может являться линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и он может прерываться соединениями, не являющимися аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилизацией, фосфорилированием или с помощью любого иного воздействия, например, посредством конъюгации с метящим компонентом. В данном документе к термину «аминокислота» относятся природные и/или не встречающиеся в

природе или синтетические аминокислоты, в том числе глицин и D- или L-оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

Термин «ферментативная активность» или просто «активность» в широком смысле обозначает ферментную активность, среди прочего активность фермента, количество фермента или доступность фермента для катализа химической реакции. Вследствие этого к термину «увеличение» ферментативной активности относится увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или повышение доступности фермента для катализа химической реакции. Аналогичным образом к термину «уменьшение» ферментативной активности относится уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента для катализа химической реакции.

Термин «оптимизация кодонов» обозначает мутацию нуклеиновой кислоты, например гена, для оптимизированной или улучшенной трансляции нуклеиновой кислоты в конкретном штамме или виде микроорганизма. Оптимизация кодонов может приводить к увеличенным значениям скорости трансляции или к более высокой точности трансляции.

Термин «сверхэкспрессируемый» обозначает увеличение экспрессии нуклеиновой кислоты или белка в микроорганизме по данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или родительском микроорганизмом, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Сверхэкспрессия может достигаться с помощью любых средств, известных в данной области техники, в том числе с помощью изменения количества копий гена, скорости транскрипции гена, скорости трансляции гена или скорости разрушения фермента.

К термину «варианты» относятся нуклеиновые кислоты и белки, в которых последовательность отличается от последовательности исходной нуклеиновой кислоты и белка, например, последовательности исходной нуклеиновой кислоты и белка, раскрытой в предшествующем уровне техники или приведенной в качестве примера в данном документе. Данное изобретение может быть реализовано на практике с применением вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по сути ту же функцию, что и исходная нуклеиновая кислота или белок. Например, вариант белка может выполнять по сути ту же функцию или катализировать по сути ту же реакцию, что и исходный белок. Вариант гена может кодировать тот же или по сути тот же белок, что и исходный ген. Вариант промотора может обладать по сути такой же способностью стимулировать экспрессию одного или нескольких генов, что и исходный промотор.

Такие нуклеиновые кислоты или белки в данном документе могут именоваться «функционально эквивалентными вариантами». Например, функционально

эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут содержать аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и тому подобное. Гомологичные гены из других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. К ним относятся гомологичные гены у таких видов, как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробная информация о которых находится в свободном доступе на таких веб-сайтах, как Genbank или NCBI. К функционально эквивалентным вариантам также относятся нуклеиновые кислоты, последовательность которых изменяется в результате оптимизации кодонов для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно содержит по меньшей мере около 70%, около 80 %, около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или более идентичности последовательности нуклеиновой кислоты (процент гомологии) с исходной нуклеиновой кислотой. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно содержит по меньшей мере около 70%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или более аминокислотной идентичности (процент гомологии) с исходным белком. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с использованием любого способа, известного в данной области техники.

Идентичность нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности требует идентичных аминокислотных последовательностей между двумя выровненными последовательностями. Таким образом, последовательность-кандидат, на 80% идентичная нуклеиновой кислоте или аминокислоте с эталонной последовательностью, требует, чтобы после выравнивания 80% нуклеиновых кислот или аминокислот в последовательности-кандидате были идентичны соответствующим нуклеиновым кислотам или аминокислотам в эталонной последовательности. Идентичность в соответствии с настоящим изобретением определяется с помощью компьютерного анализа, такого как, без ограничений, компьютерная программа выравнивания ClustalW (Higgins et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) и предложенные в ней по умолчанию параметры. Используя, например, программное обеспечение ClustalW с настройками по умолчанию, зрелая (биологически активная) часть запроса и эталонный полипептид выравниваются. Количество полностью консервативных остатков подсчитывают и делят на длину эталонного полипептида.

Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм по данному изобретению с применением любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде чистых нуклеиновых кислот, или могут составлять смеси с одной или несколькими добавками, например, липосомами. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК

или их комбинации, по необходимости. В определенных вариантах реализации изобретения, могут применяться ингибиторы рестрикции. Дополнительные векторы могут содержать плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте реализации, нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм согласно данному изобретению с использованием плазмиды. Например, преобразование (в том числе трансдукция или трансфекция) может быть достигнуто посредством электропорации, ультрасонификации, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, химической или естественной компетенции, трансформации протопластов, профаговой индукции или конъюгации. В некоторых вариантах реализации изобретения с активными системами рестрикционных ферментов, может существовать необходимость метилирования нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

Кроме того, нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы с возможностью содержания регуляторного элемента, например промотора, для увеличения или управления экспрессией конкретной нуклеиновой кислоты. Промотор может являться конститутивным промотором или индуцируемым промотором. В идеальном случае промотор представляет собой промотор пути Вуда-Льюнгаля, промотор ферредоксина, промотор пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона комплекса Rnf, промотор оперона АТФ-синтазы или промотор оперона фосфотрансацетилазы/ацетаткиназы.

Термин «микроорганизм» обозначает микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или грибок. Микроорганизм по данному изобретению представляет собой, как правило, бактерию. В контексте данного документа следует понимать, что термин «микроорганизм» охватывает значение термина «бактерия».

Термин «родительский микроорганизм» обозначает микроорганизм, применяемый для создания микроорганизма согласно настоящему изобретению. Родительский микроорганизм может представлять собой микроорганизм, встречающийся в природе (то есть микроорганизм дикого типа) или микроорганизм, который был ранее модифицирован (то есть мутантный или рекомбинантный микроорганизм). Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть модифицирован с возможностью экспрессии или сверхэкспрессии одного или нескольких ферментов, которые не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в родительском микроорганизме. Аналогичным образом микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть модифицирован с возможностью содержания одного или нескольких генов, которые не содержались в родительском микроорганизме. Микроорганизм по данному изобретению может также быть модифицирован с возможностью не экспрессировать или экспрессировать меньшие количества одного или нескольких ферментов, которые были экспрессированы в

родительском микроорганизме. В одном из вариантов реализации изобретения родительский микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно предпочтительному варианту реализации родительский микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который был депонирован 7 июня 2010 года в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ)), расположенной в Инхоффенштрассе 7В, D-38124 Брауншвейг, Германия 7 июня 2010 года, в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и имеет регистрационный номер DSM23693. Этот штамм описан в международной заявке на патент № PCT/NZ2011/000144, опубликованной как WO 2012/015317.

Термин «получен из» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм были модифицированы или адаптированы из другой (например, родительской или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма с тем, чтобы получить новую нуклеиновую кислоту, белок или микроорганизм. К таким модификациям или адаптациям, как правило, относится вставка, делеция, мутация или замена нуклеиновых кислот или генов. Как правило, микроорганизм по данному изобретению получен из родительского микроорганизма. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получают из *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который депонирован в DSMZ под регистрационным номером DSM23693.

Микроорганизм по данному изобретению можно также классифицировать на основании функциональных характеристик. Например, микроорганизм по данному изобретению может представлять собой C1-фиксирующий микроорганизм, анаэроб, ацетоген, этанологен, карбоксидотроф и/или метанотроф или может быть получен из них. В Таблице 1 приведен иллюстративный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

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

<sup>1</sup>*Acetobacterium woodii* может продуцировать этанол из фруктозы, а не из газа.

<sup>2</sup>Не было исследовано, может ли быть выращен *Clostridium magnum* на CO.

<sup>3</sup>Было сообщено, что один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, продуцирует этанол из газа.

<sup>4</sup>Не было исследовано, может ли быть выращен *Sporomusa ovata* на CO.

<sup>5</sup>Не было исследовано, может ли быть выращен *Sporomusa silvacetica* на CO.

<sup>6</sup>Не было исследовано, может ли быть выращен *Sporomusa sphaeroides* на CO.

«Метаболический путь Вуда-Льюндаля» относится к пути Вуда-Льюндаля фиксации углерода, описанному, например, в Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008. «Wood-Ljungdahl» относятся, как и следовало ожидать, к микроорганизмам, использующим путь Вуда-Льюндаля. В общем случае микроорганизм согласно настоящему изобретению содержит нативный путь Вуда-Льюндаля. В настоящем документе путь Вуда-Льюндаля может представлять собой нативный немодифицированный путь Вуда-Льюндаля или может представлять собой путь Вуда-Льюндаля с некоторой степенью генетической модификации (например, сверхэкспрессией, гетерологичной экспрессией, нокаутом и т.п.) при условии, что он продолжает использоваться для конверсии CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub> в ацетил-КоА.

Термин «C1» относится к молекуле, содержащей один атом углерода, например, CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> или CH<sub>3</sub>OH. Термин «C1-оксигенат» обозначает одноуглеродную молекулу, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO<sub>2</sub> или CH<sub>3</sub>OH. Термин «источник C1-углерода» обозначает одноуглеродную молекулу, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма по данному изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать одно или несколько соединений, выбранных из CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>OH или CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Источник C1-углерода предпочтительно содержит одно или оба соединения CO и CO<sub>2</sub>. Термин «C1-фиксирующий микроорганизм» обозначает микроорганизм, способный продуцировать один или несколько продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой C1-связывающую бактерию. Согласно предпочтительному варианту реализации, микроорганизм согласно данному изобретению получают из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в Таблице 1.

«Анаэроб» представляет собой микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Анаэроб может реагировать отрицательно или даже погибнуть в присутствии кислорода выше определенного порогового значения. Однако некоторые анаэробы

способны переносить низкие уровни кислорода (например, 0,000001-5 % кислорода). Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой анаэроб. В одном из вариантов реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из анаэроба, приведенного в Таблице 1.

5 Термин «ацетогены» обозначает облигатно-анаэробные бактерии, которые используют путь Вуда-Льюнгаля в качестве основного механизма для сохранения энергии и синтеза ацетил-КоА продуктов и производных от ацетил-КоА продуктов, например, ацетата (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). В частности, ацетогены используют путь Вуда-Льюнгаля в качестве (1) механизма для  
10 восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO<sub>2</sub>, (2) терминального электроноакцепторного, энергосберегающего процесса, (3) механизма для фиксации (ассимиляции) CO<sub>2</sub> при синтезе клеточного углерода (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все ацетогены, встречающиеся в природе, являются C1-фиксирующими анаэробными автотрофными и  
15 неметанотрофными. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм согласно данному изобретению получают из ацетогена, приведенного в Таблице 1.

«Этанологен» представляет собой микроорганизм, который образует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм согласно настоящему  
20 изобретению представляет собой этанологен. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм согласно данному изобретению получают из этанологена, приведенного в Таблице 1.

«Автотроф» представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют источники неорганического  
25 углерода, например, CO и/или CO<sub>2</sub>. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой автотроф. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм согласно данному изобретению получают из автотрофа, приведенного в Таблице 1.

«Карбоксидотроф» представляет собой микроорганизм, способный потреблять  
30 CO в качестве единственного источника углерода и энергии. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой карбоксидотроф. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм согласно данному изобретению получают из карбоксидотрофа, приведенного в Таблице 1.

«Метанотроф» представляет собой микроорганизм, способный потреблять метан  
35 в качестве единственного источника углерода и энергии. В определенных вариантах реализации изобретения микроорганизм согласно настоящему изобретению

представляет собой метанотроф или получен из метанотрофа. В других вариантах реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению не является метанотрофом или не является производным от метанотрофа.

В более широком смысле микроорганизм по данному изобретению может быть  
5 получен из микроорганизма любого рода или вида, приведенного в Таблице 1. Например, микроорганизм может быть представителем рода, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*. В частности, микроорганизм может быть получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Acetobacterium*  
10 *woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*.  
15

Известно, что эти типы микроорганизмов живут на термодинамическом пределе жизни (Schuchmann, *Nat Rev Microbiol*, 12: 809-821, 2014), поэтому до настоящего изобретения было неизвестно, будут ли они способны синтезировать C8-ароматические спирты вообще, а тем более в значительном количестве, особенно с учетом того, что 2-  
20 ФЭ может оказывать токсическое воздействие на эти микроорганизмы.

Согласно предпочтительному варианту реализации, микроорганизм согласно данному изобретению получают из кластера *Clostridia*, включающего в себя виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Эти виды впервые описаны и исследованы в работах (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994  
25 (*Clostridium autoethanogenum*)), (Tanner, *Int J System Bacteriol*, 43: 232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*)) и (Huhnke, WO 2008/028055 (*Clostridium ragsdalei*)).

Указанные три вида характеризуются значительным сходством. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими анаэробными ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода *Clostridium*. Эти виды обладают  
30 аналогичными генотипами и фенотипами, способами сохранения энергии и ферментативным метаболизмом. Кроме того, эти виды объединены в кластер гомологичной группы I кластридиальной рРНК, содержащий 16S рРНК ДНК, которая идентична более чем на 99 %, содержание G + C в ДНК составляет около 22-30 мол.%, они грамположительны, характеризуются подобной морфологией и размером (размер логарифмически растущих клеток находится в интервале между 0,5- 0,7 x 3- 5 мкм),  
35 являются мезофильными (оптимальный рост при температуре 30-37 °C), характеризуются

подобными диапазонами pH около 4-7,5 (при оптимальном значении pH около 5,5-6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию посредством комплекса Rnf. Кроме того, как было показано, у этих видов происходит восстановление карбоновых кислот с образованием их соответствующих спиртов (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Важно отметить, что все эти виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на CO-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации и при определенных условиях образуют небольшие количества 2,3- бутандиола и молочной кислоты.

Однако, эти три вида также обладают целым рядом различий. Эти виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* выделен из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* выделен из отходов птицеферм и *Clostridium ragsdalei* выделен из осадочных отложений пресных водоемов. Эти виды отличаются по утилизации различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, эти виды отличаются по ауксотрофии к определенным витаминам (например, тиамину, биотину). Указанные виды отличаются по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов и белков пути Вуд-Льюнгаля, хотя было обнаружено, что общая организация и количество таких генов и белков одинаковы у всех видов (Körke, *Curr Opin Biotechnol*, 22:320-325, 2011).

Поэтому, в заключение можно отметить, что многие из характеристик *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* не являются специфическими для этого вида, но представляют собой достаточно общие характеристики для такого кластера C1-фиксирующих, анаэробных ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных представителей рода *Clostridium*. Однако, поскольку в действительности эти виды отличаются, генетическая модификация или воздействие в одном из этих видов может не иметь идентичного эффекта в другом из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

Термин «субстрат» обозначает источник углерода и/или источник энергии для микроорганизма по данному изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например, CO, CO<sub>2</sub> и/или CH<sub>4</sub>. Субстрат предпочтительно содержит источник C1-углерода в виде CO или CO + CO<sub>2</sub>. Субстрат может также содержать другие неуглеродные компоненты, например, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> или электроны.

В целом, субстрат содержит по меньшей мере некоторое количество CO, например, около 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% CO. Субстрат

- может содержать СО в диапазоне, например, около 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% СО. Предпочтительно субстрат содержит около 40-70 мол.% СО (например, газ сталелитейных заводов или доменный газ), около 20-30 мол.% СО (например, газ кислородного конвертера) или около 15-45 мол.% СО (например, синтез-газ). В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно низкое количество СО, например, около 1-10 мол.% или 1-20 мол.% СО. Микроорганизм по данному изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть СО в субстрате в продукт. В некоторых вариантах реализации изобретения субстрат не содержит или по сути не содержит (< 1 мол.%) СО.
- 10           Субстрат может содержать некоторое количество  $H_2$ . Например, субстрат может содержать около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.%  $H_2$ . В некоторых вариантах реализации изобретения субстрат может содержать относительно высокое количество  $H_2$ , например, около 60, 70, 80 или 90 мол.%  $H_2$ . В других вариантах реализации субстрат не содержит или по сути не содержит (< 1 мол.%)  $H_2$ .
- 15           Субстрат может содержать некоторое количество  $CO_2$ . Например, субстрат может содержать около 1-80 мол. % или 1-30 мол. %  $CO_2$ . В некоторых вариантах реализации изобретения субстрат может содержать менее чем около 20, 15, 10 или 5 мол.%  $CO_2$ . В другом варианте реализации изобретения субстрат не содержит или по сути не содержит (<1 мол.%)  $CO_2$ .
- 20           Хотя, как правило, субстрат является газообразным, он также может быть представлен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенном СО-содержащим газом, с использованием генератора микропузырьковой дисперсии. В качестве еще одного примера субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.
- 25           Субстрат и/или источник С1-углерода может представлять собой отработанный газ, полученный в виде побочного продукта промышленного процесса или поступающий из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей, электролиза, пиролиза, торрефикации или процесса газификации биомассы. Например, отходы можно перерабатывать путем пиролиза, торрефикации или газификации с получением субстрата и/или источника С1-углерода. В определенных вариантах реализации изобретения промышленный процесс выбран из группы, состоящей из:
- 30           черной металлургии, например, сталелитейного производства, цветной металлургии, нефтепереработки, газификации угля, производства электроэнергии, производства чистого углерода, производства аммиака, производства метанола и производства
- 35           кокса. Согласно указанным вариантам реализации субстрат и/или источник С1-углерода

можно улавливать из промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу, используя любой подходящий способ.

5 Субстрат и/или источник С1-углерода может представлять собой синтез-газ, например, синтез-газ, полученный при газификации угля или из остатков нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте реализации изобретения синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

10 Состав субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O<sub>2</sub>) может уменьшить эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата может быть необходима обработка, очистка или фильтрация субстрата для удаления нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или частицы пыли, и/или для увеличения концентрации требуемых компонентов.

15 Согласно определенным вариантам реализации ферментацию проводят в отсутствие углеводных субстратов, таких как сахар, крахмал, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза.

Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть культивирован с потоком газа с получением одного или нескольких продуктов. Например, микроорганизм по данному изобретению может продуцировать или может быть генетически сконструирован с возможностью продуцирования этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), 1-бутанола (WO 2008/115080, WO 2012/053905 и WO 2017/066498), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342 и WO 2016/094334), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанона) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), терпенов, в том числе изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/036152), 1-пропанола (WO 2017/066498 и WO 2017/066498), 1-гексанола (WO 2017/066498), 1-октанола (WO 2017/066498), продуктов, полученных из хоризмата (WO 2016/191625), 3-гидроксибутирата (WO 2017/066498), 1,3-бутандиола (WO 2017/066498), 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомасляной кислоты (WO 2017/066498), изобутилена (WO 2017/066498), адипиновой кислоты (WO 2017/066498), 1,3-гександиола (WO 2017/066498), 3-метил-2-бутанола (WO 2017/066498), 2-бутен-1-ола (WO 2017/066498), изовалерата (WO 2017/066498), изоамилового спирта (WO 2017/066498) и моноэтиленгликоля (WO 2019/126400) в дополнение к 2-

фенилэтанола. Согласно определенным вариантам реализации микробную биомассу саму по себе можно рассматривать в качестве продукта. Такие продукты можно дополнительно подвергнуть превращению с получением по меньшей мере одного компонента дизельного топлива, реактивного топлива и/или бензина. В некоторых вариантах реализации 2-фенилэтанол можно использовать в качестве ингредиента ароматизаторов, эфирных масел, ароматизаторов и мыла. Кроме того, микробную биомассу можно подвергать последующей переработке с получением белка одноклеточных (SCP).

«Нативный продукт» представляет собой продукт, продуцируемый генетически немодифицированным микроорганизмом. Например, этанол, ацетат и 2,3-бутандиол являются нативными продуктами *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Термин «ненативный продукт» обозначает продукт, который продуцируется генетически модифицированным микроорганизмом, но не продуцируется генетически немодифицированным микроорганизмом, из которого получен генетически модифицированный микроорганизм.

Термин «селективность» обозначает отношение объемов продуцирования целевого продукта к продуцированию всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом. Микроорганизм по данному изобретению может быть сконструирован с возможностью продуцирования продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В одном варианте реализации изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, в результате чего микроорганизм по данному изобретению характеризуется селективностью по целевому продукту, составляющей по меньшей мере 10%. В другом варианте реализации изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 30% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, так что микроорганизм по данному изобретению характеризуется селективностью по целевому продукту, составляющей по меньшей мере 30%.

Термины «повышение эффективности», «повышенная эффективность» и тому подобные означают среди прочего увеличение скорости роста микроорганизмов, скорости получения продукта или его объема, объема продукта на единицу объема потребляемого субстрата или селективности продукта. Эффективность может определяться по отношению к производительности родительского микроорганизма, из которого получен микроорганизм по данному изобретению.

Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин «биореактор» обозначает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или нескольких сосудов, конструкций башенного типа или трубопроводов, таких как реактор непрерывного действия с механическим перемешиванием (РНДМП), реактор с 5 иммобилизованными клетками (РИК), реактор с орошаемым слоем (РОС), барботажная колонна, газлифтный ферментёр, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, пригодное для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Субстрат можно подавать в один или оба 10 таких реактора. В контексте данного документа термины «культивирование» и «ферментация» используются взаимозаменяемо. Указанные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

Культивирование, как правило, проводят в водной культуральной среде, содержащей питательные вещества, витамины и/или минералы, достаточные для 15 обеспечения роста микроорганизма. Водная культуральная среда предпочтительно представляет собой среду для анаэробного микробного роста, такую как минимальная среда для анаэробного микробного роста. Пригодные среды хорошо известны в данной области техники.

Требуется, чтобы культивирование/ферментация проводились в соответствующих 20 условиях для продуцирования целевого продукта. Как правило, культивирование/ферментацию проводят в анаэробных условиях. Условия реакции, которые следует учитывать, включают давление (или парциальное давление), температуру, скорость газового потока, скорость потока жидкости, pH среды, восстановительно-окислительный потенциал среды, скорость перемешивания (при 25 применении реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень посевного материала, максимальные концентрации газового субстрата, обеспечивающие то, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, а также максимальные концентрации продукта для предупреждения ингибирования продукта. В частности, скорость введения субстрата можно регулировать таким образом, чтобы гарантировать, 30 что концентрация газа в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, поскольку в условиях ограниченного количества газа указанная культура может потреблять продукты.

В некоторых вариантах реализации изобретения ферментацию проводят в отсутствие света или в присутствии некоторого количества света, недостаточного для 35 удовлетворения энергетических потребностей фотосинтетических микроорганизмов. В некоторых вариантах реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению представляет собой нефотосинтезирующий микроорганизм.

В некоторых вариантах реализации, 2-фенилэтанол отделяют или очищают от ферментативного бульона, используя любой способ или комбинацию способов, известных в данной области техники, включая, например, фракционную перегонку, выпаривание, испарение через полупроницаемую перегородку, отдувку газом, разделение фаз и экстрактивную ферментацию, включая, например, экстракцию жидкости жидкостью. В некоторых вариантах реализации, 2-фенилэтанол извлекают из ферментационного бульона непрерывным удалением части бульона из биореактора, отделением микробных клеток от бульона (обычно фильтрованием), и выделением 2-фенилэтанола из бульона. Как правило, спирты и/или ацетон можно извлекать, например, с помощью перегонки. Отделенные микробные клетки предпочтительно рециклируют в биореактор. Бесклеточный пермеат, оставшийся после удаления 2-фенилэтанола, также предпочтительно возвращают в биореактор. Для восполнения среды перед ее возвратом в биореактор к бесклеточному пермеату могут быть добавлены дополнительные питательные вещества.

#### 15           **Варианты реализации**

В одном из вариантов реализации изобретение относится к микроорганизму, способному продуцировать 2-фенилэтанол, где микроорганизм содержит гетерологичный фермент, который превращает фенилпируват в фенилацетальдегид, и гетерологичный фермент, который превращает фенилацетальдегид в 2-фенилэтанол.

20           В некоторых вариантах реализации гетерологичным ферментом, который превращает фенилпируват в фенилацетальдегид, является декарбоксилаза, а гетерологичным ферментом, который превращает фенилацетальдегид в 2-фенилэтанол, является фенилацетальдегидредуктаза. В частности, декарбоксилаза может представлять собой фенилпируват-специфическую декарбоксилазу. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент декарбоксилазу, содержит *aro10* (из *Saccharomyces cerevisiae*) или *abPPDC* (из *Azospirillum brasilense*). В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент декарбоксилазу, включает: (i) SEQ ID NO: 1, 2 или 4; (ii) нуклеиновую кислоту, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, 2 или 4, которая кодирует фермент декарбоксилазу, функционально гомологичную ферменту декарбоксилазе, кодируемому SEQ ID NO: 1, 2 или 4; или (iii) нуклеиновую кислоту, которая кодирует функционально гомологичный полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен ферменту декарбоксилазе, кодируемому SEQ ID NO: 1, 2 или 4.

35           В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент декарбоксилазу, содержит *aro10*, *abPPDC* или SEQ ID NO: 1, 2

или 4, или их функциональный гомолог, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты с ним. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент декарбоксилазу, кодирует функционально гомологичный полипептид, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96 %, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичность полипептидной последовательности ферменту декарбоксилазе, кодируемому *aro10*, *abPPDC* или SEQ ID NO: 1, 2 или 4.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент ФАР, включает *bIPAR*, *ecPAR*, *lePAR*, *rrPAR*, *rsPAR* или *adh6* (источник указан на Фиг. 4A). В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент ФАР, включает: (i) SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8 или 9; (ii) нуклеиновую кислоту, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8 или 9, которая кодирует фермент ФАР, который функционально гомологичен ферменту ФАР, кодируемому SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8 или 9; или (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую функционально гомологичный полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен ферменту ФАР, кодируемому SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8 или 9.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент ФАР, включает *bIPAR*, *ecPAR*, *lePAR*, *rrPAR*, *rsPAR*, *adh6* или SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8 или 9, или их общий функциональный гомолог, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты с ними. В некоторых вариантах

реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент ФАР, кодирует функционально гомологичный полипептид, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности полипептидной последовательности ферменту ФАР, кодируемому *bIPAR*, *ecPAR*, *lePAR*, *rrPAR*, *rsPAR*, *adh6* или SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8 или 9.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм по настоящему изобретению дополнительно содержит один или несколько гетерологичных ферментов, которые превращают фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат; гетерологичный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат; или гетерологичный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

В некоторых вариантах реализации гетерологичный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат, представляет собой 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфатсинтазу; гетерологичным ферментом, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, представляет собой шикиматдегидрогеназу; или гетерологичным ферментом, который превращает хоризмат в фенилпируват, представляет собой бифункциональную хоризматмутазу/префенатдегидратазу.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент шикиматдегидрогеназу, содержит *cgAroE* (из *Corynebacterium glutamicum*) или *ecAroE* (из *Escherichia coli*). В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент шикиматдегидрогеназу, содержит: (i) SEQ ID NO: 11 или 12; (ii) нуклеиновую кислоту, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 11 или 12, которая кодирует фермент шикиматдегидрогеназу, который функционально гомологичен ферменту шикиматдегидрогеназе, кодируемому SEQ ID NO: 11 или 12; или (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую функционально гомологичный полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен ферменту шикиматдегидрогеназе, кодируемому SEQ ID NO: 11 или 12.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент шикиматдегидрогеназу, содержит *cgAroE*, *ecAroE* или SEQ ID NO: 11 или 12, или их функциональный гомолог, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%,

или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по  
меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по  
меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по  
меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по  
5 меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности  
последовательности нуклеиновой кислоты с ним. В некоторых вариантах реализации  
нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент шикиматдегидрогеназу,  
кодирует функционально гомологичный полипептид, имеющий, например, по меньшей  
мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере  
10 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%,  
или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по  
меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по  
меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по  
меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности полипептидной  
15 последовательности ферменту шикиматдегидрогеназе, кодируемому *cgAroE*, *ecAroE* или  
SEQ ID NO: 11 или 12.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая  
гетерологичный фермент DAHP-синтазу, содержит *aroG*. В некоторых вариантах  
реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фермент DAHP-синтазу,  
20 содержит: (i) SEQ ID NO: 10; (ii) нуклеиновую кислоту, по меньшей мере на 90%  
идентичную SEQ ID NO:10, кодирующую фермент DAHP-синтазу, функционально  
гомологичную ферменту DAHP-синтазе, кодируемому SEQ ID NO:10; или (iii) нуклеиновую  
кислоту, кодирующую функционально гомологичный полипептид, который по меньшей  
мере на 90% идентичен ферменту DAHP-синтазе, кодируемому SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая  
гетерологичный фермент DAHP-синтазу, содержит *aroG* или SEQ ID NO: 10 или их  
функциональный гомолог, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей  
мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере  
86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%,  
30 или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по  
меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по  
меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по  
меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты с  
ним. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая  
35 гетерологичный фермент DAHP-синтазу, кодирует функционально гомологичный  
полипептид, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или  
по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по

5 меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности полипептидной последовательности ферменту DAHP-синтазе, кодируемому *aroG* или SEQ ID NO: 10.

10 В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу, содержит *pheA1* или *pheA2*. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу, содержит: (i) SEQ ID NO: 13 или 14; (ii) нуклеиновую кислоту, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 13 или 14, которая кодирует бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу, который функционально гомологичен бифункциональному ферменту хоризматмутазу/префенатдегидратазе, кодируемому SEQ ID NO: 13 или 14; или (iii) нуклеиновую кислоту, которая кодирует функционально гомологичный полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен бифункциональному ферменту хоризматмутазу/префенатдегидратазе, кодируемому SEQ ID NO: 13 или 14.

20 В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу, содержит *pheA1*, *pheA2* или SEQ ID NO: 13 или 14, или их функциональный гомолог, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты с ним. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу, кодирует функционально гомологичный полипептид, имеющий, например, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 86%, или по меньшей мере 87%, или по меньшей мере 88%, или по меньшей мере 89%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности полипептидной последовательности

бифункциональному ферменту хоризматмутазе/префенатдегидратазе, кодируемому *pheA1*, *pheA2* или SEQ ID NO: 13 или 14.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм содержит набор гетерологичных ферментов, выбранных из следующих вариантов:

- 5 (1) *ecAroE*, *kivD*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (2) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (3) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (4) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (5) *cgAroE*, *kivD*, *rrPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 10 (6) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (7) *pheA1*, *aroG*, *abPPDC* и *ecPAR*;  
 (8) *egAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (9) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (10) *cgAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 15 (11) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (12) *cgAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (13) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (14) *ecAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (15) *ecAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 20 (16) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (17) *cgAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (18) *cgAroE*, *abPPDC*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (19) *ecAroE*, *kivD*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (20) *cgAroE*, *aro10*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 25 (21) *ecAroE*, *abPPDC*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (22) *ecAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA1* и *aroG*;  
 (23) *cgAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*;  
 (24) *cgAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (25) *ecAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 30 (26) *ecAroE*, *aro10*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*; или  
 (27) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм содержит набор гетерологичных нуклеиновых кислот, выбранных из следующих вариантов:

- (1) *ecAroE*, *kivD*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 35 (2) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (3) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

- (4) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (5) *cgAroE*, *kivD*, *rrPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (6) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (7) *pheA1*, *aroG*, *abPPDC* и *ecPAR*;  
 5 (8) *egAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (9) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (10) *cgAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (11) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (12) *cgAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 10 (13) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (14) *ecAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (15) *ecAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (16) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;  
 (17) *cgAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 15 (18) *cgAroE*, *abPPDC*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (19) *ecAroE*, *kivD*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (20) *cgAroE*, *aro10*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (21) *ecAroE*, *abPPDC*, *blPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (22) *ecAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA1* и *aroG*;  
 20 (23) *cgAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*;  
 (24) *cgAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (25) *ecAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (26) *ecAroE*, *aro10*, *adh6*, *pheA2* и *aroG* ; или  
 (27) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*.

25 В некоторых вариантах реализации микроорганизм содержит гетерологичные гены и промоторы комбинаторного штамма 2C03, 1C10, 2C54, 2C09, 2C47, 2C55, 2C53, H57, 1C47, 2C10, 2A18, 1C54, 2C01, 1C31, 2B17, 2C52, 1C09, H18, H58, 2C27, 2D22, 2D07, 2D24, 2D03, 1C29, 2B26, 2C38, 2A27, 2C12 или 2B27, как описано в Таблице 3.

30 В другом варианте реализации настоящего изобретения предложены плазмиды, которые можно использовать для трансформации бактерий с получением бактерий, продуцирующих 2-фенилэтанол, согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации плазмиды содержат (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент декарбоксилазу; и (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент фенилацетальдегидредуктазу (ФАР). В некоторых вариантах  
 35 реализации плазмиды содержат (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент декарбоксилазу; (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент фенилацетальдегидредуктазу (ФАР); (в) нуклеиновую кислоту, кодирующую

гетерологичный фермент шикиматдегидрогеназу; (г) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент ДАНР-синтазу; и (д) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу. В некоторых вариантах реализации в описании предложена двухплазмидная система, первая плазида содержит (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент декарбоксилазу; (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент фенилацетальдегидредуктазу (ФАР); и (в) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент шикиматдегидрогеназу; и вторую плазмиду, содержащую (г) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фермент ДАНР-синтазу; и (д) нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный бифункциональный фермент хоризматмутазу/префенатдегидратазу. Когда плазида или плазмиды трансформируются в бактерии, желательнее, чтобы бактерии экспрессировали ферменты. Альтернативно, ферменты могут экспрессироваться только при индуцировании, если для экспрессии используется индуцибельный промотор.

Один вариант реализации представляет собой микроорганизм, способный продуцировать 2-фенилэтанол, где микроорганизм содержит: (а) гетерологичный фермент, который превращает фенилпируват в фенилацетальдегид; и (б) гетерологичный фермент, который превращает фенилацетальдегид в 2-фенилэтанол.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где: (а) гетерологичным ферментом, который превращает фенилпируват в фенилацетальдегид, является декарбоксилаза; и (б) гетерологичным ферментом, который превращает фенилацетальдегид в 2-фенилэтанол, является фенилацетальдегидредуктаза.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где декарбоксилаза представляет собой фенилпируват-специфическую декарбоксилазу.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм представляет собой C1-фиксирующий микроорганизм.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм представляет собой микроорганизм Вуда-Льюнгадала.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм представляет собой бактерию.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где указанный микроорганизм является представителем рода, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм нативно способен продуцировать фенилпируват.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм включает путь Вуда-Льонгдала, который превращает CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub> в ацетил-КоА.

- 5 Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм содержит одно или несколько из: (в) нативный фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват; (г) нативный фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват; (д) природный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат; (э) нативный фермент, который превращает 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат в 3-дегидрохинат; (е) природный фермент, который превращает 3-дегидрохинат в 3-дегидрошикимат; (ж) природный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат; (з) природный фермент, который превращает шикимат в шикимат-3-фосфат; (и) природный фермент, который превращает шикимат-3-фосфат в 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат; (к) природный фермент, который превращает 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат в хоризмат; или (л) природный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

- Микроорганизм согласно варианту реализации, где: (в) нативный фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват, представляет собой пируват:ферредоксиноксидоредуктазу; (г) нативный фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват, представляет собой пируватфосфаткиназу; (д) нативный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат, представляет собой 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфатсинтазу; (э) нативный фермент, который превращает 2-дегидро-3-дезоксид-арабиногептонат-7-фосфат в 3-дегидрохинат, представляет собой 3-дегидрохинатсинтазу; (е) нативный фермент, который превращает 3-дегидрохинат в 3-дегидрошикимат, представляет собой 3-дегидрохинатдегидратазу; (ж) нативный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, представляет собой шикиматдегидрогеназу; (з) нативный фермент, который превращает шикимат в шикимат-3-фосфат, представляет собой шикиматкиназу; (и) нативный фермент, который превращает шикимат-3-фосфат в 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат, представляет собой 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу; (к) нативный фермент, который превращает 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат в хоризмат, представляет собой хоризматсинтазу; или (л) природный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват, представляет собой бифункциональную хоризматмутазу/префенатдегидратазу.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм дополнительно содержит один или более из: (д) гетерологичный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат; (ж) гетерологичный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат; или (л) гетерологичный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где: (д) гетерологичный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат, представляет собой 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфатсинтазу; (ж) гетерологичный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, представляет собой шикиматдегидрогеназу; или (л) гетерологичный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват, представляет собой бифункциональную хоризматмутазу/префенатдегидратазу.

Микроорганизм по любому из вариантов реализации, где микроорганизм содержит:

- 15 (1) *ecAroE*, *kivD*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (2) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (3) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (4) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (5) *cgAroE*, *kivD*, *rrPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- 20 (6) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (7) *pheA1*, *aroG*, *abPPDC* и *ecPAR*;
- (8) *egAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (9) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (10) *cgAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- 25 (11) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (12) *cgAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (13) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (14) *ecAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;
- (15) *ecAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;
- 30 (16) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;
- (17) *cgAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;

- (18) *cgAroE*, *abPPDC*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (19) *ecAroE*, *kivD*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (20) *cgAroE*, *aro10*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (21) *ecAroE*, *abPPDC*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 5 (22) *ecAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA1* и *aroG*;  
 (23) *cgAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*;  
 (24) *cgAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (25) *ecAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (26) *ecAroE*, *aro10*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*; или  
 10 (27) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*.

Микроорганизм по любому из вариантов реализации, где микроорганизм содержит гетерологичные гены и промоторы комбинаторного штамма 2C03, 1C10, 2C54, 2C09, 2C47, 2C55, 2C53, H57, 1C47, 2C10, 2A18, 1C54, 2C01, 1C31, 2B17, 2C52, 1C09, H18, H58, 2C27, 2D22, 2D07, 2D24, 2D03, 1C29, 2B26, 2C38, 2A27, 2C12 или 2B27.

- 15 Микроорганизм по любому из вариантов реализации, где микроорганизм ферментирует газообразный субстрат, содержащий CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub>, с получением 2-фенилэтанола.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где газообразный субстрат включает синтез-газ или промышленные газообразные отходы.

- 20 Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм не продуцирует какие-либо другие спирты C3+.

Микроорганизм согласно варианту реализации, где микроорганизм не продуцирует какие-либо другие спирты C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или C10.

- 25 Один из вариантов реализации представляет собой способ получения 2-фенилэтанола, включающий культивирование микроорганизма по любому из вариантов реализации в присутствии газообразного субстрата.

Способ согласно варианту реализации, где газообразный субстрат содержит источник C1-углерода, включающий CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub>.

- 30 Способ по любому из вариантов реализации, где газообразный субстрат включает синтез-газ или промышленные газообразные отходы.

## ПРИМЕРЫ

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют способы и композиции данного изобретения, но, разумеется, они никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие его сущность.

5 В этой работе была проведена целевая метаболическая инженерия декарбоксилазы и фенилацетальдегидредуктазы (ФАР) в C1-фиксирующих бактериях для улучшения селективности и продуцирования 2-ФЭ. Для дальнейшего улучшения потока к биосинтезу 2-ФЭ три гетерологичных гена из пути шикимата были дополнительно включены комбинаторным образом. Путь биосинтеза 2-ФЭ и гены, которые были  
10 гетерологично экспрессированы в следующих примерах, выделены в Фиг. 1.

### **Пример 1. 2-ФЭ Толерантность к *C. autoethanogenum* в бутылках Шотта**

Сообщалось, что 2-ФЭ ингибирует рост грамположительных микроорганизмов, таких как *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecium*, при концентрации 26 - 43 мМ (3,2  
15 - 5,3 г/л) (Corre et al., Res Microbiol. 1990;141(4):483-97). Для изучения токсичности 2-ФЭ в отношении автотрофного роста *C. autoethanogenum*, в бутылках Шотта проводили контрольные эксперименты с 2-ФЭ (при 0, 0,2, 0,6, 2 и 5 г/л) со смесью синтез-газа (50% CO, 10% H<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub> и 10% N<sub>2</sub>). По сравнению с неконтрольной культурой, 2 г/л 2-ФЭ приводил к увеличению лаг-фазы роста и снижению концентрации биомассы (Фиг. 2А-  
20 Б). При уровне контроля 5 г/л рост не был обнаружен (Фиг. 2А-Б). Контроль 2-ФЭ в дозах 0,2 г/л и 0,6 г/л мало повлиял на автотрофный рост *C. autoethanogenum*.

### **Пример 2. Тестирование вариантов декарбоксилазы на улучшенную селективность и продуцирование 2-ФЭ**

25 Для оптимизации штамма 2-ФЭ две плазмиды со специфическими для фенилпирувата декарбоксилазами (*aro10* из *Saccharomyces cerevisiae* (Kneen et al., FEBS J. 2011;278:1842-53) (SEQ ID NO: 4) и *abPPDC* из *Azospirillum brasilense* (Spaepen et al., J Bacteriol. 2007; 189:7626 LP-7633) (SEQ ID NO: 2)) трансформировали в *C. autoethanogenum*, в результате чего были получены штаммы sFA212 и sFA213,  
30 соответственно. Эти два декарбоксилазных штамма вместе с контрольным штаммом (sFA200), который экспрессирует декарбоксилазу *kivd\_1a* (из *Lactococcus lactis*) (SEQ ID NO: 1), подвергали автотрофному росту в смеси синтез-газов (50% CO, 10% H<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub> и 10% N<sub>2</sub>) в бутылках Шотта (Фиг. 3 А-Б). Три штамма декарбоксилазы демонстрировали сходные профили роста, но разные профили спирта (Фиг. 3 А-  
35 Б). Результаты газовой хроматографии конечной точки с пламенно-ионизационным

детектированием (ГХ-ПИД) показали, что штамм *aro10* продуцирует на 57% меньше 2-ФЭ, чем контрольный штамм *kivd\_1a*, при этом продуцируя 5,6 мг/л 2-метил-1-пропанола и 4,0 мг/л 3-метил-1-бутанола. Напротив, штамм *abPPDC* продуцировал такие же количества 2-ФЭ, как и контрольный штамм, но не продуцировал спиртов с разветвленной цепью. В некоторых вариантах реализации повышенная селективность штамма *abPPDC* по отношению к 2-ФЭ может упростить последующее разделение продуктов и улучшить стабильность штамма, поскольку спирты с разветвленной цепью могут оказывать аддитивное действие на клеточную токсичность.

Для этого и других примеров, раскрытых в данном документе, ГХ-ПИД выполняли для линейных и разветвленных спиртов следующим образом. Концентрации спирта измеряли методом газовой хроматографии с использованием ГХ Agilent 7890B, оснащенного автоматическим пробоотборником, пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и колонкой Phenomenex ZB-WAXplus (30 м x 0,32 мм x 1 мкм), соединенной последовательно с колонкой ZB-1 (30 м x 0,32 мм x 0,3 мкм). Образцы готовили путем переноса 1400 мкл образца в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл с последующим добавлением 20 мкл раствора внутреннего стандарта (фенилацетат в этаноле). К этому добавляли 400 мкл хлороформа и регистрировали массу. Образцы встряхивали горизонтально в течение 60 секунд, центрифугировали при 14000 g в течение 5 минут, затем 200 мкл нижнего слоя переносили в стеклянный флакон, содержащий вставку малого объема. Анализ инъекции объемом 1 мкл выполняли с использованием коэффициента деления 10:1 и температуры на входе 250 °С. Разделение было достигнуто при начальной температуре печи 70 °С (без выдержки), начальном повышении температуры до 120 °С со скоростью 3 °С/мин (без выдержки) и окончательном повышении температуры до 230 °С со скоростью 7 °С/мин (выдержка 14 минут). Скорость потока через колонку устанавливали равной 35 см/сек с гелием в качестве газа-носителя. ПИД был настроен на 280 °С с воздухом со скоростью 400 мл/мин, газообразным водородом со скоростью 40 мл/мин и гелием (добавочный газ) со скоростью 15 мл/мин. Результаты были рассчитаны с использованием калибровки внутреннего стандарта с использованием линейной аппроксимации.

30

### **Пример 3. Тестирование вариантов фенилацетальдегидредуктазы (ФАР) для улучшения получения 2-ФЭ**

Пять вариантов гена (*lePAR* (SEQ ID NO: 9), *ecPAR* (SEQ ID NO: 6), *blPAR* (SEQ ID NO: 5), *rrPAR* (SEQ ID NO: 7) и *rsPAR* (SEQ ID NO: 8); Фиг. 4А-Б) фенилацетальдегидредуктазы (ФАР), которая катализирует последнюю стадию пути 2-ФЭ (Фиг. 1), индивидуально клонировали в векторы экспрессии с декарбоксилазой

*abPPDC* (SEQ ID NO: 2) и шикиматдегидрогеназой *ecAroE* (SEQ ID NO: 11). После трансформации в *C. autoethanogenum* полученные рекомбинантные штаммы тестировали на продуцирование 2-ФЭ в 12-луночных планшетах со смесью синтез-газа 200 кПа (50 % CO, 10 % H<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> и 10 % N<sub>2</sub>). Индуктор добавляли в 1-й день, а образцы для анализа ГХ-ПВД отбирали на 7-й день. Три новых штамма ФАР (*biPAR*, *ecPAR* и *rsPAR*) продуцировали больше 2-ФЭ (нормализованное по биомассе), чем контрольный штамм *adh6* (SEQ ID NO: 3) (Фиг. 4В).

#### Пример 4. Комбинаторный анализ пути 2-ФЭ

Чтобы определить оптимальный поток и варианты генов для биосинтеза 2-ФЭ, комбинаторная сборка генов и промоторов пути 2-ФЭ с использованием способа Золотые Ворота (GG) была сначала выполнена в *Escherichia coli* (Фиг. 5) перед трансформацией в C1-утилизирующие микроорганизмы. Чтобы облегчить скрининг сборки, маркер *ccdB* токсин-антитоксин, встречно селективный, фланкированный сайтами Золотые Ворота GG1 и GG6, сначала клонировали в челночный вектор *Clostridium-E. coli* pMTL8225 (Heap, J Microbiol Methods, 78: 79-85, 2009). Эти челночные векторы имеют предварительно клонированный кластридиальный промотор (показан как P<sub>1</sub> на Фиг. 5) и терминатор (показан как T<sub>3</sub> на Фиг. 5). Гены, которые кодируют шикиматдегидрогеназу (кодируется *aroE*), ДАНП-синтазу (кодируется *aroG*), бифункциональную хоризматмутаза/префенатдегидратазу (*pheA*), декарбоксилазу и фенилацетальдегид (ФАР), вместе с двумя донорными векторами (pDonor 2 и pDonor 4, которые обеспечивают терминаторы и промоторы), добавляли к челночным векторам для сборки GG. Промоторные последовательности. Сайты Золотые Ворота и рабочий процесс сборки описаны в Synthetic Biology (2020) vol 5(1): ysa019. Полученные комбинаторные плазмиды с селективируемым маркером антибиотика *ermB* (вместе называемые плазмидой 1 в Таблице 3) имеют промотор и терминатор для экспрессии каждой из *aroE* (или *pheA+aroG*), декарбоксилазы и ФАР изолированным образом.

Для этой работы были сконструированы и протестированы две комбинаторные библиотеки 2-ФЭ: одноплазмидная и двухплазмидная библиотеки (Табл. 3). Варианты гена (2х *aroE* (SEQ ID NO: 11, 12), 3х декарбоксилазы (SEQ ID NO: 1, 2, 4), 6х ФАР (SEQ ID NO: 3, 5, 6, 7, 8, 9), 2х бифункциональная хоризматмутаза/префенатдегидратаза (*pheA*) (SEQ ID NO: 13, 14) и 1х ДАНП-синтаза (*aroG*) (SEQ ID NO: 10)), которые были включены в комбинаторный анализ, показаны в Таблице 2. (Фиг. 12) показывает варианты генов и промоторов, которые использовались для двух комбинаторных библиотек 2-ФЭ, описанных в Примере 4.

Таблица 2. Варианты гена пути 2-ФЭ, используемые для комбинаторного анализа.

Фермент	Ген [SEQ ID NO]	Описание	Ссылка
ДАHP-синтаза (EC 2.5.1.54)	<i>aroG</i> [10]	<i>E. coli</i> ; L175D для облегчения регуляции обратной связи фенилаланина	Hu et al., J Basic Microbiol. 2003;43(5):399-406.
Шикиматдегидрогеназа (EC 1.1.1.25)	<i>cgAroE</i> [12]	<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i>	Kubota et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97:8139–49.
	<i>ecAroE</i> [11]	<i>E. coli</i>	Sun et al., Appl Environ Microbiol. 2013; 79(13):4024-30.
Хоризматмутаза/ префенатдегидратаза (EC 4.2.1.51)	<i>pheA1</i> [13]	<i>E. coli</i> ; Делеция 49 остатков на 3'-конце для облегчения регуляции фенилаланина по принципу обратной связи	US 4753883
	<i>pheA2</i> [14]	<i>E. coli</i> ; W338R для облегчения регуляции обратной связи фенилаланина	US 4753883
Декарбоксилаза (EC 4.1.1.74)	<i>abPPDC</i> [2]	<i>Azospirillum brasilense</i>	Spaepen et al., J Bacteriol. 2007; 189:7626 LP – 7633.
	<i>apo10</i> [4]	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Kneen et al., FEBS J. 2011; 278:1842–53.
	<i>kivD_la</i> [1]	<i>Lactococcus lactis</i>	De La Plaza et al., FEMS Microbiol Lett. 2004; 238(2):367- 74.

Фенилацетальдегидредуктаза (EC 1.1.1.1)	<i>blPAR</i> [5]	<i>Brevibacterium linens</i>	Hirano et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2007;76(2):357-63.
	<i>ecPAR</i> [6]	<i>E. coli</i>	Guo et al., Microbiologyopen. 2017 Aug;6(4).
	<i>lePAR</i> [9]	<i>Solanum lycopersicum</i> (помидор)	Tieman et al., Phytochemistry. 2007;68(21):2660-9.
	<i>rrPAR</i> [7]	<i>Rhodococcus ruber</i>	Giersberg et al., J Ind Microbiol Biotechnol. 2012 Sep;39(9):1385-96.
	<i>rsPAR</i> [8]	<i>Rhodococcus</i> sp. ST-10	Itoh et al., Appl Environ Microbiol. 1997 Oct;63(10):3783-8.
	<i>adh6</i> [3]	<i>S. cerevisiae</i>	Larroy et al., Chem Biol Interact. 2003 Feb 1;143-144:229-38.

В случае библиотеки с двумя плазмидами для экспрессии каждого из *aroE*, декарбоксилазы и ФАР в плазмиде 1 использовали три промотора разной силы ( $P_{fer-lacO-US}$ ,  $P_{WL}$  и  $P_{por}$ ). Плазмида 2 (селектируемый маркер антибиотика *catP*), которая имела только один промотор ( $P_{WL}$ ), управляющий экспрессией *pheA1+aroG* или *pheA2+aroG*, индивидуально трансформировали в *C. autoethanogenum*. Полученные трансформанты впоследствии становились хозяином, в который была перенесена комбинаторная плазмида 1, в результате чего были получены рекомбинантные штаммы, несущие два вектора экспрессии, придающие различную устойчивость к антибиотикам с совместимыми грамположительными репликационными. Общая перестановка для двухплазмидной комбинаторной библиотеки составила 1944 ( $3 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3 \times 6 \times 1 \times 2 \times 1$ ).

В случае библиотеки с одной плазмидой *aroE* в плазмиде 1 был заменен на (*pheA1/pheA2*) + *aroG*. В результате была получена только 1 плазмида (с опущенным *aroE*) и перестановка 972 ( $3 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3 \times 6$ ). Во время этого процесса спейсерное расстояние между сайтом связывания рибосомы и кодоном START *aroG* было увеличено с 5 до 8 нуклеотидов для усиления трансляции *aroG*.

Чтобы определить эффективность сборки комбинаторных плазмид в *E. coli*, и для исследования комбинаций промотора и варианта гена 400 плазмид экстрагировали из трансформированного штамма *E. coli* NEB10-бета и подвергали секвенированию. Анализ результатов секвенирования показал скорость сборки 51,3% при хорошем разнообразии каждого промотора и варианта гена. После трансформации этих комбинаторных плазмид с проверенной последовательностью в *C. autoethanogenum* всего 162 комбинаторных

штамма (42 одноплазмидных штамма и 120 двухплазмидных штаммов) подвергали автотрофному росту в 12-луночных планшетах.

Эксперименты по выращиванию проводились с техническими дубликатами в 12-луночных планшетах с минимальной средой 2 мл и смесью синтез-газов 200 кПа (50% CO, 10% H<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub> и 10% N<sub>2</sub>) при 37 °C в течение 8-10 дней (Фиг. 7А-В). Затем брали образцы бульона для измерения биомассы и анализа ГХ-ПВД для определения титра 2-ФЭ. В качестве контрольного штамма были выбраны три биологических клона штамма sFA212, который содержит плазмиду (с тем же каркасом, что и плазида 1), которая экспрессирует *adh6* с *abPPDC* под индуцируемым промотором P<sub>ip112</sub>, поскольку этот штамм постоянно продуцировал высокие количества 2-ФЭ в 12-луночные планшеты, бутылки Шотта и реакторы непрерывного перемешивания (CSTR). В качестве отрицательного контроля была включена одна контрольная лунка с холостой средой на 12-луночный планшет, а анализ ГХ-ПВД показал <1,7 мг/л 2-ФЭ, что указывает на незначительное перекрестное загрязнение или его отсутствие.

Через 8-10 дней инкубации комбинаторные штаммы с 2-ФЭ достигли концентрации биомассы 0,6-1,0 г МСК/л (Фиг. 7В). Из этих 162 комбинаторных штаммов 80 штаммов (49% проверенной библиотеки) продуцировали более чем в 1,5 раза больше 2-ФЭ, чем контрольный штамм (Фиг. 7А). 48 штаммов (30% проверенной библиотеки) продуцировали менее половины 2-ФЭ, продуцируемого контрольным штаммом (Фиг. 7А).

Был проведен детальный анализ комбинаторной библиотеки 2-ФЭ, чтобы определить влияние вариантов генов и количества плазмид на продуцирование 2-ФЭ (Фиг. 8А-Д). Не наблюдалось существенной разницы в титре 2-ФЭ между одноплазмидными и двухплазмидными библиотеками, декарбоксилазами и шикиматдегидрогеназами (Фиг. 8А, 8В и 8Г). Штаммы с *pheA2* показали немного более высокие титры 2-ФЭ, чем штаммы с *pheA1* (Фиг. 8Б). Некоторые из вариантов ФАР (например, *bIPAR*) продуцировали больше 2-ФЭ, чем вариант *adh6* (Фиг. 8Д). Большие вариации титра 2-ФЭ, наблюдаемые в каждом варианте гена или номере плазмиды, могут быть связаны с коллективным действием других вариантов генов пути и комбинаций промоторов, которые ослабляют действие отдельных параметров в комбинаторном дизайне.

Путем ранжирования титра 2-ФЭ относительно контрольного штамма sFA212 был составлен список из 30 лучших комбинаторных штаммов, продуцирующих 2-ФЭ, с указанием их генотипа (Таблица 3). Хотя 74% проверенной комбинаторной библиотеки представляли собой штаммы с двумя плазмидами либо с *aroE*, 90% из 30 лучших штаммов-продуцентов 2-ФЭ несли две плазмиды. Все 10 лучших штаммов, продуцирующих 2-ФЭ, состояли либо из варианта декарбоксилазы *kivD\_la*, либо из

*abPPDC*, тогда как штаммы с декарбоксилазой *aro10* появлялись 8 раз между 11 и 30 лучшими продуцентами 2-ФЭ. Штаммы с вариантом ФАР *lePAR* и *ecPAR* составляли 70% 30 лучших продуцентов 2-ФЭ, что непропорционально много по сравнению с их общей представленностью в 57% в проверенной библиотеке. Штаммы с ФАР вариантом *adh6* были значительно недопредставлены среди 30 лучших продуцентов 2-ФЭ: только 6,7% среди 30 лучших продуцентов по сравнению с 13,6% в проверенной библиотеке в целом.

**Таблица 3.** Генотип 30 лучших комбинаторных штаммов, продуцирующих 2-ФЭ, в анализе роста на 12-луночном планшете.

Название штамма	Средний титр 2ФЭ относит. sFA212	Плазмид 1					Плазмид 2			
		P1	Ген 1	P2	Ген 2	P3	Ген 3	P4	Ген 4	Ген 5
2C03	3,01	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pwl	<i>kivD</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
1C10	2,99	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pwl	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>ecPAR</i>	Pwl	<i>pheA1</i>	<i>aroG</i>
2C54	2,94	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C09	2,92	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C47	2,91	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C55	2,85	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Pwl	<i>kivD</i>	Pwl	<i>riPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C53	2,75	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
H57	2,72	Pwl	<i>pheA1 + aroG</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>ecPAR</i>	Нет		
1C47	2,71	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA1</i>	<i>aroG</i>
2C10	2,70	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pwl	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>ecPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2A18	2,69	Pfer	<i>cgAroE</i>	Pwl	<i>aro10</i>	Ppfor	<i>ecPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
1C54	2,66	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA1</i>	<i>aroG</i>
2C01	2,63	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Pfer	<i>aro10</i>	Pfer	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
1C31	2,62	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pfer	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA1</i>	<i>aroG</i>
2B17	2,54	Pwl	<i>ecAroE</i>	Ppfor	<i>aro10</i>	Ppfor	<i>ecPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C52	2,52	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pfer	<i>aro10</i>	Ppfor	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
1C09	2,48	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA1</i>	<i>aroG</i>
H18	2,48	Pwl	<i>pheA1 + aroG</i>	Pfer	<i>abPPDC</i>	Ppfor	<i>ecPAR</i>	Нет		
H58	2,43	Ppfor	<i>pheA1 + aroG</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>ecPAR</i>	Нет		
2C27	2,39	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Pwl	<i>aro10</i>	Ppfor	<i>rsPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2D22	2,35	Pfer	<i>cgAroE</i>	Pfer	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>biPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2D07	2,33	Pfer	<i>ecAroE</i>	Pwl	<i>kivD</i>	Pfer	<i>biPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2D24	2,33	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Pwl	<i>aro10</i>	Ppfor	<i>biPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2D03	2,32	Pfer	<i>ecAroE</i>	Pfer	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>biPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
1C29	2,29	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pfer	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>lePAR</i>	Pwl	<i>pheA1</i>	<i>aroG</i>
2B26	2,28	Pwl	<i>cgAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>adh6</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C38	2,27	Ppfor	<i>cgAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pfer	<i>ecPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2A27	2,26	Pfer	<i>ecAroE</i>	Pwl	<i>aro10</i>	Ppfor	<i>rsPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2C12	2,26	Ppfor	<i>ecAroE</i>	Pwl	<i>aro10</i>	Pfer	<i>Adh6</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>
2B27	2,24	Pwl	<i>ecAroE</i>	Ppfor	<i>abPPDC</i>	Pwl	<i>ecPAR</i>	Pwl	<i>pheA2</i>	<i>aroG</i>

10

### Пример 5. Получение 2-ФЭ путем ферментации синтез-газа в CSTR

В общей сложности 12 комбинаторных штаммов были охарактеризованы в CSTR в режиме непрерывной ферментации, чтобы сравнить их продуцирование 2-ФЭ с эталонным штаммом sFA212. Активно растущая (ранняя экспоненциальная) культура из 15 бутылок Шотта использовалась в качестве инокулята для 2-литровых CSTR со смесью

синтез-газов (40% CO, 20% H<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub> и 20% N<sub>2</sub>) при атмосферном давлении. Как только концентрация биомассы достигла ~0,5 г МСК/л, поддерживали скорость разбавления среды 1/день и скорость разведения бактерий 0,5/день.

5 В этих непрерывных условиях CSTR эталонный штамм sFA212 достиг титра 2-ФЭ 70 мг/л. Пять комбинаторных штаммов (1C29, 2C54, 2C03, 2C53 и 2C31) продуцировали больше 2-ФЭ, чем эталонный штамм (Фиг. 9А). В частности, штамм 1C29 продуцировал 200 мг/л 2-ФЭ, что в 2,9 раза выше, чем у эталонного штамма. Основываясь на их выходе 2-ФЭ, 10 из 12 комбинаторных штаммов продемонстрировали превосходную эффективность 2-ФЭ по сравнению с эталонным штаммом (Фиг. 9Б).

10 Производительность комбинаторного штамма 1C29 в двух повторах CSTR показана на Фиг. 10А-Б. Для повышения продуцирования 2-ФЭ подача азота в форме NH<sub>4</sub>ОН была ограничена до 15 мМ на 7-й день для повтора 1 (Фиг. 10А) и на 9-й день для повтора 2 (Фиг. 10Б). В результате продуцирование 2-ФЭ увеличилось в обоих экспериментах и достигло пика 350 и 300 мг/л, соответственно. Продуцирование 2-ФЭ  
15 мгновенно достигла пика в 16 мг/л/ч для запуска 1.

Синтез-газ, полученный в результате газификации отходов, таких как биомасса, отходы лесного хозяйства и твердые бытовые отходы, часто содержит токсичные загрязнители. Например, метан, этан, этилен и ацетилен входят в число обнаруженных загрязняющих веществ, и известно, что они токсичны для микробов на уровне частей на миллион. Для оценки устойчивости биосинтеза 2-ФЭ *de novo* в сконструированном *S. autoethanogenum* штамм sFA212 подвергали непрерывному запуску CSTR с использованием синтез-газа, полученного из кукурузной соломы. Этот «настоящий» синтетический газ был предварительно обработан с использованием системы газоочистки, в результате чего состав газа после обработки составил 23,3% H<sub>2</sub>, 38,7% CO,  
20 19,6% CO<sub>2</sub> и 18,4% N<sub>2</sub>. Из-за ограниченной доступности настоящего синтез-газа сначала использовался синтетический смешанный газ (с аналогичным газовым составом) для создания устойчивой культуры ферментации до того, как подача газа была переключена на настоящий синтез-газ в день 6,9.

Результаты ферментации настоящего синтез-газа показаны на (Фиг. 11А-В), при  
30 этом настоящий синтез-газ использовался между 6,9 и 10,9 днями (всего 4 дня). Чтобы обеспечить более продолжительный непрерывный цикл CSTR, было использовано несколько настоящих баллонов с синтез-газом с немного отличающимся составом газа, что привело к наблюдаемым колебаниям поглощения газа (Фиг. 11Б). После перехода на настоящий синтез-газ продуцирование 2-ФЭ продолжало расти и достигло устойчивого  
35 состояния на 10-й день. Средний титр и продуктивность 2-ФЭ между 8,0 и 13,7 днями составляют 208 мг/л и 11,95 мг/л/ч, соответственно.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Таблица 4. Последовательности нуклеиновых кислот, описанные в примерах и обобщенные в Таблице 2.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Адаптирована к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>kivD<sub>la</sub></i>	ATGTATACAGTTGGAGATTATTTATTAGATAGATTACATGAATTAGG AATAGAAGAAATATTTGGTGTACCAGGAGATTACAATTTACAATTTT TAGATCAAATAATAAGTAGAAAAAGATATGAAATGGGTGGGGAATGCA AATGAGTTAAATGCAAGTTACATGGCTGATGGATATGCAAGAACSTAA AAAGGCAGCTGCATTCCTTACAACCTTTGGAGTAGGAGAACSTAAAGTG CAGTAAATGGGCTTGCAGGTTTCATATGCTGAAAACTTACCTGTAGTT GAAATCGTAGGTAGTCCAACTTCAAAAAGTCCAAAAACGAAGGAAAAAT TGTACACCATACTCTGGCTGACGGAGATTTTAAACATTTTATGAAAA TGCATGAACCTGTAACAGCTGCGAGAACCCTTTTAACTGCGGAAAAAT GCTACAGTTGAAATAGATAGAGTTTAAAGTGCTCTTTTAAAGGAGAG AAAGCCTGTTTATATTAATCTTCCCGTAGATGTAGCTGCTGCTAAGG CAGAGAAAACCTTCTTTACCTTTGAAAAAGGAAAACAGCACTTCTAAT ACTTCCGATCAAGAGATATTAATAAAAAATCAAGAATCCTTAAAAAA TGCTAAAAAACCTATAGTTATTACAGGACACGAAATAATATCTTTTG GCCTAGAAAAACAGTAAGTCAGTTTATAAGTAAAAACAAAATTACCT ATAACACTTTTAAATTTTCGGTAAGAGTTCTGTTGACGAGGCACCTCC AAGTTTTTTAGGAATATATAATGGAAAAATGAGTGAACCAAATCTAA AAGAGTTTTGTAGAGTCAGCAGACTTTATACTAATGCTTGGTGTGAAG TTAACCTGATTCAGTACTGGAGCCTTTACTCATCATTTAAATGAAAA CAAAATGATAAGTTTAAACATTTGATGAGGGCAAAATTTTCAATGAGT CAATTCAAAATTTTGATTTTGAATCTTTAATTTTCATCACTTCTGGAT TTATCAGAAATAGAGTATAAAGGCAAAATATAATGATAAGAAACAAGA AGATTTTGTCCAAGTAATGCACTATTAAGTCAAGATAGGTTATGGC AGGCAGTTGAAAAATTTAACTCAAAGCAATGAGACTATAGTAGCAGAA CAGGGAACATCACTATTTGGAGCGTCTTCTATTTTTCTTAAAGCCAAA AAGTCATTTTTATAGGTCAGCCATTATGGGGTTCTATAGGATATACTT TTCCAGCTGCATTAGGATCACAGATAGCAGATAAAGAATCTAGACAT CTTTTGTTCATAGGCGATGGTTCCCTTGCAGTTAACAGTCCAGGAATT AGGACTTGCAATAAGAGAAAAAATAAACCCATTTGTTTTATAATAA ATAATGATGGATATACTGCTGAAAGAGAAATACATGGACCAAATCAG AGCTATAATGATATTCCAATGTGGAACATTTCTAAACTGCCTGAATC ATTTGGGGCTACAGAAGAAAGGGTAGTGTCAAAAATAGTTAGAACAG AAAATGAATTTGTAAGTGTGATGAAAGAAGCTCAGGCTGATCCAAAC AGAATGTATTTGGATTTGAACCTATACTTGCAAAAAGAGGATGCTCCAAA AGTATTAAGAAAAATGGGGAACTTTTTGCTGAACAAAACAAATCTT AA

2	<p>Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>abPPDC</i></p>	<p>ATGAAATTTGGCAGAAGCATTACTCAGAGCATTGAAAGATAGAGGGGC  ACAGGCAATGTTTTGGTATACCTGGAGATTTTGCACCTTCCTTTTTTCA  AAGTTGCTGAAGAACTCAAATACTTCCTTTGCACACTCTTAGCCAT  GAACCTGCTGTAGGTTTTGCAGCAGATGCAGCTGCAAGATATTCCTC  TACATTAGGTGTAGCAGCAGTTACTTACGGAGCAGGAGCATTAAATA  TGGTAAATGCAGTTGCTGGTGCCTATGCAGAAAAAGCCCTGTAGTA  GTTATATCTGGTGCCTGGTACAACAGAAGGAAATGCTGGTCTTTT  ACTTCACCATCAGGGAAGAACTTTAGACACTCAATTCAGGTATTTA  AGGAGATAACAGTTGCCCAGGCTAGATTAGATGATCCTGCTAAGGCT  CCTGCCGAAATAGCAAGAGTACTTGGTGCCTAGAGCGCTCTCAAG  ACCAGTTTATTTAGAAATACCTAGAAATATGGTAAATGCTGAAGTAG  AACCAGTAGGGGATGATCCAGCATGGCCAGTAGACAGAGATGCTTTA  GCTGCCTGTGCTGATGAAGTACTTGCAGCTATGAGATCTGCTACAAG  TCCTGTTTTAATGGTTTGTGTAGAGGTTAGAAGATATGGACTTGAAG  CAAAAGTTGCTGAATTAGCACAGAGACTTGGAGTACCTGTAGTAAACA  ACATTTATGGGACGCGGATTACTTGCAGATGCACCCACTCTCCTTTT  AGGAACCTATATAGGAGTAGCAGGAGATGCAGAAATAACTTAGTTAG  TGGAAGAATCAGATGGATTATTTTTACTTGGAGCAATTCCTTTCAGAT  ACAAATTTTGCAGTCTCTCAAAGAAAAATAGACTTAAAGAAAAACCAT  TCATGCATTTGATCGTGCAGTTACCCCTGGATATCATACTTATGCTG  ACATTCCTTTAGCAGGACTAGTTGATGCCCTTCTAGAAAGACTTCCT  CCTTCAGACAGGACGACTAGAGGTAAGAGCCACATGCCATCCTAC  AGGTCTTCAGGCTGATGGAGAACCAATAGCTCCAATGGACATTCGCC  GTGCTGTGAACGACAGAGTACGTGCTGGTCCAGGAACCTCTTTTAATA  GCAGCTGATATGGGTGACTGCTTATTTACAGCTATGGATATGATAGA  TGCTGGTCTTATGGCACCAGGCTATTTATGCAGGCATGGGATTTGGAG  TTCCAGCTGGTATTGGTGCCTCAATGTGTATCAGGCGGCAAAAGAATA  CTTACTGTTGTTGGTGACGGAGCATTCAGATGACAGGCTGGGAACCT  TGGAAATTTGTAAGAGATTAGGTATTGACCCATAGTAATACTTTTTTA  ATAATGCTTCTTTGGGAAATGTTAAGAACATTTCCAGCCTGAAAGTGCT  TTTAATGATTTAGATGATTGGAGATTTGCAGATATGGCTGCTGGAAT  GGGCGGCGACGGTGAAGAGTCAGGACAAGGGCTGAGTTGAAGGCTG  CATTAGATAAAGCATTTGCCACAAGGGGCGAGATTCAGCTTATAGAA  GCAATGATACCGAGAGGTGTGCTTTCCGATACCCCTTGCTAGATTTGT  TCAAGGCCAAAAAGAGGCTTCACGCAGCTCCTAGAGAATAA</p>
3	<p>Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>adh6</i></p>	<p>ATGTCGTATCCTGAAAAATTTGAAGGTATAGCTATTCAATCCCATGA  AGACTGGAAAAATCCCAAAAAACAAAGTACGACCCAAAACSTTTCT  ATGACCATGATATAGATATAAAGATTGAAGCATGTGGAGTATGTGGA  AGTGATATTCATTTGTGCGGCAGGCCATTTGGGGAAATATGAAATGCC  ATTAGTTGTGGGACATGAAATTTGTTGGAAAAGTTGTAAAGTTAGGTC  CTAAATCAAATTTCTGGACTAAAAGTTGGACAGAGAGTTGGAGTTGGT  GCTCAAGTATTTCTTGTTTAGAGTGTGATAGATGTAAAAATGACAA  TGAACCTTACTGTACTAAATTTGTTACTACTTATTCACAACCTTATG  AAGATGGATATGTAAGTCAGGGAGGCTATGCAAAATATGTTAGAGTT  CACGAGCACTTTGTAGTACCTATTTCCAGAAAAATATTCATCTCACTT  AGCAGCTCCTCTTTTATGCGGTGGACTTACTGTTTTATAGTCCACTTG  TTAGAAATGGTTGTGGTCTTGGGAAAAAGTCGGAATAGTTGGACTT  GGCGGAATTTGGAAGTATGGGAACTTTAATAAGTAAAGCTATGGGAGC  TGAAACTTATGTAATTTCTAGATCATCAAGAAAGAGAGAAGATGCAA  TGAAGATGGGAGCAGATCACTATATTTGCTACATTAGAAGAGGGGGAT  TGGGGGAAAAGTACTTTGATACTTTTGATTTAATTTGTCGTATGTGC  TTCAAGCTTACAGATATAGATTTTAAATATAATGCCAAAAGCAATGA  AAGTTGGTGGACGAATAGTATCTATAAGTATACCTGAACAGCACGAA  ATGTTATCTTTAAAACCTTATGGACTAAAGGCTGTATCTATTTCTTA  TTCTGCATTTGGGCTCTATTAAGAATTTGAATCAATTTAATAAAGTGG  TTAGTGAAAAAGATATAAAAAATTTGGGTAGAAACACTTCCTGTAGGT  GAGGCAGGAGTCCATGAGGCTTTTGAGAGAATGGAAAAAGGTGATGT  AAGATATAGATTTACACTTGTGGCTATGATAAAGAGTTTTCTGATTT  AG</p>

4	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>aro10</i>	ATGGCACCAGTAACAATTGAAAAATTTGTAAATCAAGAGGAAAGACA TTTGGTATCAAACCCTTCAGCTACAATTCATTTGGGGAATATATAT TCAAGAGACTTTTGGAGTATAGATACAAAAAGTGTTTTTGGAGTTCCT GGAGATTTTAATCTTTCCCTCTTAGAGTACTTATATTCACCATCAGT TGAATCTGCAGGATTGAGATGGGTTGGTACTTGTAAATGAACTAAATG CTGCTTATGCAGCAGATGGTTATAGCAGATATCAAATAAAATAGGG TGTCTTATAACAACCTTATGGAGTAGGCGAGTTATCTGCATTGAATGG AATAGCAGGATCATTTGCAGAAAAATGTTAAAGTGCTTCACATTGTAG GCGTTGCTAAGAGCATAGATAGCCGATCTTCAAATTTCTCAGATAGA AATCTACATCATCTTGTTCACAACCTACATGATTCAAACCTCAAAGG ACCTAATCATAAAAGTTTATCATGATATGGTAAAAGATAGGGTAGCAT GCTCTGTTGCTTATCTTGAAGACATAGAAAACCTGCTTGTGATCAAGTT GATAATGTAATAAGAGATATATACAAAATACTCAAACCAGGATATAT ATTTGTTCCAGCAGACTTTGCAGATATGTCAGTTACATGTGATAACT TAGTTAATGTACCAAGAATAAGTCAACAGGATTGCATAGTTTATCCA TCTGAAAAATCAGTTAAGTGACATTATAAAATAAAATAAATCTCCTGGG TTACAGTTCTAAAACCCAGCCATTTTAGGTGATGTATTAACCTGATA GATATGGTGTATCAAATTTTTTAAATAAACTTATATGTAAGACTGGA ATCTGGAATTTTTCAACTGTTATGGGTAAATCAGTTATAGATGAAAG TAATCCAACCTTACATGGGTCAATATAATGGAAAAGAAGGTCTTAAAC AAGTGTATGAACATTTTGGAGCTTTGTGATTTAGTGCTTCACTTTGGT GTGGACATAAACGAAATTAACAATGGACATTATACTTTTACTTATAA ACCTAACGAAAAATAATACAATTTTCACTCAAACCTATATAAGACTTG TAGATACAAGACAAGGAAATGAGCAAATGTTCAAAGGCATAAACCTTT GCTCCTATACTAAAAGAGCTGTATAAAAGAATAGATGTATCAAAGTT GTCACTTCAGTATGATTCAAATGTAACCTCAATACACTAATGAGACAA TGAGATTAGAAGATCCCCTAATGGACAATCTTCAATTATTACCCAG GTACATCTTCAAAAAACGATGCCAAAAATTCCTCAATCCAGGAGATGT TGTTGTCTGTGAAACAGGTTCTTTTCAATTTTCTGTGAGGGATTTTG CATTCCTTCTCAATTAATAATATATATCTCAAGGATTTTTCTTTTCA ATCGGTATGGCATTACCAGCTGCATTGGGAGTTGGAATAGCAATGCA AGACCATTCAAATGCTCATATAAATGGCGGCAATGTTAAAGAGGATT ATAAACCAAGACTTATTTTATTTGAAGGAGATGGTGCCTGCACAAATG ACAATTCAAGAATCTACAAATATAAAATGTAATATTCCTCTTGA AGTAATAATTTGGAACAACAATGGATATACTATTGAAAGAGCAATAA TGGGTCCAACAAGATCTTATAATGATGTAATGTCGTGGAAATGGACT AAATTATTTGAGGCATTTGGTGAATTCGATGGAAAGTATACAAATTC TACTTTGATACAGTGTCTTCAAAGTTAGCTTTAAAACCTGAAGAAC TCAAGAACTCAAATAAAAGATCTGGAATAGAATTATTAGAAGTTAAA CTTGGAGAGTTAGACTTCCCTGAGCAACTAAAATGCATGGTAGAAGC AGCAGCACTTAAGAGAAACAAAAATAA
---	---	--

5	<p>Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность фенилацеталидереда уктазы (<i>blPAR</i>) из <i>Brevibacterium linens</i></p>	<p>ATGAAAAGCAAGTTTGGCAACGGCAATTGGCGGCGAATTCACAGTACA  TGACGTAGTAATAGATGACCCACAAGGAAGAGAGGTCCTTGTGGATG  TGAAAAGCTTCAGGATTATGTCATTCTGATTTACACTTAATAGATCAT  GATTTCCGGTCTCCCTCTTCCAGCTGTAGGCGGCCATGAAATTTCAGG  TGTAGTGAGAAGTGTAGGACCAGGCGTTACCAGTATGTCTGTTGGAG  ACCATGTTGTAGCTTGTCTTATAACTTTTTGCGGTGCATGTGCAGAA  TGCCTTTCAGGAAAACTACTTTATGTTCAAATCCTACTGCTGTAGC  AAGAAAAGAAGGAGAAAAGCCAAGAGTTTCATTCCTGATGGTCAGG  AAATGACACAATCAGTTAATGTTGGCGGCTTTCAGAACAAAGTACTA  GTTTCATGAAAATCAGCTTGCAGTAGTAAACAATCAGATACCTTTCCC  TCAGGCAGCACTTTTAGGGTGCTCAGTTGTCACAGGAGCAGGAGCAG  CTATAAATACAGCTCATGTAAGACCAGGGGATACAGTAGCGGTTATA  GGAACAGGCGGCATAGGATTAAACGCAATAAGCGGAGCAAGATTAGC  AGGGGCTAAGCACATTTATAGCTATTGATATAGTTGATTTCAAATTAG  AGGCTGCAAAAAAGTTTGGAGCTACAGATCTTATAAATTCATCAACT  ACTGATCCAGTGGCAGCAGTTCAAGAAATTAACAGGCGGCTAGATCA  TGCATTTGAAGTAATTGGATTAGAAGCTACGCAGAGGCAAGTTTCAGC  AATTAACAAAACCAGGCGGCACGGCATAATTAATAGGCATAGCACCA  CCAGGAACAACACTACTGAATTTACATCATCATTAGATAGTTTTGTTTGC  TCAAAGAAGACTGCAGGCTGTTTTGATGGGTAGTAGTAATGTTAAAA  GAGATATAGCATTATATGCAGACTTGTATGTTTCAGGGACGTTTTGAA  TTAGATCATTTAGTATCAAGAGAAATATCCATAAATGAGATAAATGA  TGGTTATGAAGCATTAAAAAAAGGTGAAGTTATACGTTTCAGTTATAA  CCAGTTTTTAA</p>
6	<p>Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность фенилацеталидереда уктазы (<i>ecPAR</i>) из <i>Escherichia coli</i></p>	<p>ATGTC AATGATAAAATCATATGCAGCAAAAAGAAGCAGGCGGCGAATTT  AGAAGTTTACGAATATGATCCAGGGGAATTAAGGCTCAAGATGTAG  AAGTTCAAGTTGATTACTGTGGAATATGCCATTCGGATTTATCTATG  ATAGATAATGAATGGGATTTAGTCAGTATCCTCTTGTAGCAGGACA  TGAAGTTATTGGCAGAGTTGTAGCTCTTGGTTCAGCAGCTCAGGATA  AGGGCTTACAGGTAGGTGAGAGAGTAGGGATAGGCTGGACTGCCCGT  TCGTGTGGACACTGCGATGCATGTATCAGTGGAAATCAAATAAATTTG  TGAACAAGGTGCAGTTCCAACATAAATGAATAGGGGCGGCTTTGCAG  AAAAATTAAGAGCAGATTTGGCAATGGGTAATTCCTCTTCCAGAAAAC  ATAGATATAGAATCAGCAGGTCCTCTCCTTTGTGGCGGCATTACAGT  ATTTAAACCTCTTCTTATGCATCATATTAAGTCTACATCAAGAGTAG  GAGTAATCGGTATAGGCGGCTTGGACATATAGCAATTAACCTTCTT  CATGCTATGGGTTGTGAAGTTACGGCATTTAGTTCAAATCCAGCTAA  AGAGCAAGAAGTTCTTGCTATGGGTGCCGACAAGGTAGTTAACAGTA  GGGATCCACAGGCACTGAAAGCACTGGCGGGACAATTTGATCTTATA  ATAAATACAGTAAACGTTTCTCTAGATTGGCAACCATATTTGAGGC  ATTAACCTTATGGCGGCAATTTCCATACAGTTGGAGCCGTTCTTACAC  CACTATCTGTTCCAGCTTTTACACTTATAGCAGGAGATCGTAGTGT  TCCGGCTCTGCAACTGGTACTCCTTATGAACTTAGAAAACCTTATGAG  ATTTGCAGCAAGATCTAAAGTTGCACCTACCACAGAGCTTTTCCCTA  TGAGCAAGATAAATGATGCAATTCAGCACGTTAGAGATGGAAAAGCA  AGATATAGGGTTGTGTTAAAGGCTGATTATTAG</p>

7	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность фенилацеталидереда уктазы ( <i>rrPAR</i> ) из <i>Rhodococcus ruber</i>	<p>ATGAAAAGCTTTGCAATATACAGAAATAGGAAGTGAACCAGTAGTAGT  AGATGTACCAACACCAGCGCCAGGACCAGGAGAGATCTTATTAAGG  TAACTGCAGCAGGACTTTGTCATTTCAGATATATTTGTAATGGATATG  CCTGCTGAACAGTATATTTATGGCCTTCCATTAACGCTTGGCCATGA  GGGTGTTGGAACAGTTGCAGAAATAGGGGCAGGTGTAACAGGATTTG  AAACAGGTGATGCTGTTGCTGTTTATGGACCTTGGGGATGCGGTGCC  TGCCATGCTTGTGCCCGTGGAAAGGGAAAACTATTGTACTAGAGCTGC  AGAGTTAGGAATAACACCCCCCTGGACTGGGATCACCTGGAAGTATGG  CAGAGTATATGATTGTAGATTCTGCAAGACATTTAGTTCCTATAGGT  GATTTGGATCCTGTTGCACTGTTCTTCTTACAGATGCTGGATTGAC  ACCTTATCATGCAATAAGTAGAGTGTACCCTTCTTGGACCAGGAT  CTACAGCTGTAGTTATAGGAGTTGGCGGCTTAGGACATGTTGGCATC  CAAATATTAAGAGCAGTGTTCAGCAGCAAGAGTTATAGCAGTTGATTT  AGATGATGACAGATTAGCTTTAGCAAGAGAAGTTGGTGCAGATGCAG  CTGTTAAAAGTGGAGCAGGAGCAGCAGATGCTATTTCGTGAACCTACA  GGCGGCGAAGGAGCAACTGCTGTGTTTGTATTTTAGGAGCTCAGAG  TACAATTGATACTGCACAGCAGGTAGTAGCAATAGACGGCCATATAT  CCGTAGTTGGTATTTCATGCAGGTGCTCATGCAAAAGTAGTTTTTTTT  ATGATACCTTTTTGGAGCTTCTGTTGTAACCTCCTTACTGGGGTACCCG  TTCTGAACTTATGGATGTAGTAGATCTTGCAGAGCAGGCAGACTTG  ATATACATACTGAGACTTTTACTTTTAGATGAAGTCCGACTGCATAT  AGAAGACTAAGAGAAGGTTCCATAAGAGGTAGGGGAGTAGTAGTGCC  TGGATAA</p>
8	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность фенилацеталидереда уктазы ( <i>rsPAR</i> ) из <i>Rhodococcus</i> sp. ST-10	<p>ATGAAAAGCAATTCAATACACAAGAATAGGAGCAGAACCAGAACTTAC  AGAAAATACCAAAACCAGAGCCAGGACCAGGGGAAGTTCTTCTTGAAG  TAACTGCAGCTGGAGTATGTCACAGTGATGATTTTATAATGTCGCTG  CCTGAAGAACAGTATACATATGGACTACCCTTACATTTAGGTTCATGA  AGGTGCAGGAAAAGTAGCAGCTGTAGGTGAGGGAGTAGAAGGTTTAG  ACATAGGAACTAATGTAGTAGTATATGGACCTTGGGGATGTGGAAT  TGCTGGCACTGCTCTCAAGGCTTGGAAAACACTGTTCAAGAGCTCA  GGAACCTTGAATAAATCCACCTGGACTTGGTGCACCAGGTGCATTAG  CTGAATTTATGATTGTAGATTCAACACGTCATTTAGTGCCTATAGGA  GATTTGGATCCTGTTAAAACGTACCCTAACTGATGCAGGACTTAC  ACCTTATCATGCTATAAAAAAGAAGTTTACCAGGTTAAGAGGCGGCT  CCTATGCCGTTGTAATAGGAACAGGCGGCTTGGACATGTAGCTATC  CAATTATTAAGACATTTGTCTGCAGCTACTGTTATAGCACTTGACGT  TTCAGCAGATAAATTGGAACTTGTACTAAGGTAGGTGCACATGAAG  TTGTATTATCAGACAAGGATGCAGCTGAAAATGTAAGGAAAATTACA  GGATCACAAGGAGCAGCCTTAGTTTTAGATTTTGTGGATATCAACC  TACAATTGACACTGCTATGGCTGTAGCTGGTGTGGAAAGTATGTTA  CAATAGTAGGTATAGGTGATGGTCAAGCTCATGCAAAGGTAGGTTTC  TTTTCAAAGTCCTTATGAAGCTTCAGTAACTGTACCTTATTTGGGGAGC  TAGAAAATGAGTTAATAGAACTCATAGATTTAGCTCATGCAGGTATAT  TTGATATTTAGTAGAAACTTTTTCACTTGACAAATGGCGCAGAAGCA  TATAGAAGATTAGCTGCTGGAACACTTTTCAGGAAGAGCAGTAGTAGT  TCCAGGATTATAA</p>

9	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность фенилацеталидередуктазы ( <i>lePAR</i> ) из <i>Solanum lycopersicum</i>	ATGTCAGTTACAGCAAAAACAGTTTGTGTTACAGGTGCTTCAGGTTA CATTGCTTCATGGTTAGTTAAATTTTTACTTCATTCCTGGATATAATG TTAAGGCATCTGTTAGGGATCCAAATGATCCTAAAAAGACCCAGCAT СТАТТААГТСТТGGCGGCCTAAAAGAAAGGCTTCACTTATTTAAGGC АААТСТАСТТGAAGAAAGGTAGCTTTGATGCTGTTGTAGATGGTTGTG AAGGAGTATTCACACTGCGTCACCATTTTATTACTCTGTAAC TGAC CCACAAGCTGAATTGCTTGATCCAGCTGTAAGAGGTACACTGAACTT GTTAGGAAGTTGTGCAAAGGCACCAAGCGTAAAGAGAGTTGTATTAA CTAGCAGTATTGCTGCTGTTGCATACTCTGGTCAGCCAAGAACCCCA GAAGTAGTTGTAGATGAATCATGGTGGACATCACCAGATTACTGTAA AGAAAAACAACCTTTGGTATGTTTTAAGTAAAACTTTAGCTGAAGATG CTGCTTGGAAATTTGTTAAAAGAAAAGGGAATAGATATGGTTGTAGTT AATCCAGCTATGGTTATTTGGACCACTTTTGCAGCCAACATTAATAAC TAGCTCTGCAGCAGTACTTTCACTTGTAATGGTGTGAGACATAACC CAAATTCAGTTTTGGATGGGTAAATGTAAGGACGTAGCAAATGCT CATATATTAGCATTTGAAAATCCATCCGCCAATGGAAGATATCTTAT GGTAGAAAAGAGTAGCTCATTTATTCTGATATATTGAAAATTTTAAGAG ATCTATATCCAACCTATGCAGTTACCAGAAAAGTGTGCAGATGATAAT CCTCTTATGCAAAAATTATCAGGTTTCAAAGAAAAGGCCAAATCTTT AGGAATAGAAATTTACGACTTTAGAAAGAACTATCAAAGAACTGTTG AATCACTAAAAGGAGAAAAAATTTCTTTGGCGGCTCGTCTCCATGTAA
10	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>AroG</i> из <i>Escherichia coli</i>	ATGAATTATCAAAAATGATGATTTAAGAATAAAAAGAAATTAAGAATTT ATTACCTCCTGTAGCTTTATTAGAAAAATTTCTGCAACTGAAAATG CAGCAAATACTGTAGCACATGCAAGAAAAGCAATACATAAAATACTT AAAGGTAATGATGATAGATTATTAGTAGTAATAGGACCTTGTAGTAT ACATGATCCTGTAGCAGCAAAAAGAAATATGCAACTAGACTTTTAGCAT TAAGAGAAGAATTAAGAAATGAAATAGAAAATAGTAATGAGAGTATAT TTTTGAAAAACCTAGAACTACTGTAGGATGGAAAGGACTTATAAATGA TCCTCATATGGATAATAGTTTTCAAATAAATGATGGACTTAGAATAG CAAGAAAAATACTTTTAGATATAAATGATAGTGGATTACCTGCAGCT GGTGAATTTTTAGATATGATAACTCCTCAATATTTAGCAGATTTAAT GAGTTGGGGAGCAATTTGGAGCAAGAACTACTGAAAGTCAAGTACATA GAGAAGATGCAAGTGGACTTAGTTGTCTGTAGGATTTAAAAATGGA ACTGATGGAACATAAAAAGTAGCAATAGATGCAATAAATGCAGCTGG TGCACCTCATTTGTTTTCTTAGTGTAAACAAAATGGGGACATAGTGCAA TAGTAAATACTAGTGGAAATGGTGATTTGTATATAAATACTTAGAGGT GGAAAAAGAACCTAATTTATTCTGCAAAACATGTAGCAGAAGTAAAAGA AGGACTTAATAAAGCTGGACTTCCTGCACAGGTAATGATAGATTTTTT CTCATGCAAAATAGTAGTAAACAATTTAAGAAAACAAATGGATGTATGT GCAGATGTATGTCAGCAAATAGCTGGAGGTGAAAAGCAATAAATTTGG AGTAATGGTAGAAAGTCATTTAGTAGAAGGTAATCAAAGTTTAGAAA GTGGTGAACCTTTAGCTTATGGAAAAAGTATAACTGATGCATGTATA GGATGGGAAGATACTGATGCACTTCTTAGACAACCTTGCAAAATGCAGT AAAAGCAAGAAGAGGATAA
11	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>ecAroE</i> из <i>Escherichia coli</i>	ATGGAACTTATGCAGTATTTGGCAATCCTATAGCACATTCAAAATC ACCATTTATACATCAACAATTTGCTCAGCAATTAATAATTTGAACATC CTTATGGAAGAGTTTTAGCTCCAATAAATGATTTTATAAAATACTTTA AATGCTTTTTTTTTCAGCAGGCGGCAAAGGAGCAAATGTAACGTACC TTTTAAAGAGGAAGCTTTTGCCAGAGCAGATGAGTTAACTGAAAGAG CAGCATTAGCTGGTGCGGTTAATACATTTGATGAGACTAGAAGATGGT AGGCTTTTAGGAGATAATACTGATGGGGTAGGTCTTTTGTCTGATCT TGAAAGACTTTCTTTTATAAGACCTGGCCTCCGGATCCTTTTAATAG GTGCAGGCGGCGCATCCAGGGGAGTATTACTTCCATTACTATCACTG GATTTGTGCAGTTACTATCACTAACAGAACAGTTTTCAAGAGCTGAAGA GCTTGCTAAAATTTATTTGCACATACAGGATCAATCCAGGCACCTTTCCA TGGATGAACTAGAGGGACATGAATTTGACTTAATTTATAAAATGCCACT AGCAGTGGTATAAAGTGGGGATATACCAGCTATTCCCAGCTCTTTAAT ACATCCTGGAATATACTGCTATGATATGTTTTATCAAAGGTAAGA CACCGTTCTTAGCTTGGTGTGAACAAAGAGGAAGCAAGAGAAATGCA GATGGTCTTGGCATGCTGGTTGCACAAGCAGCTCATGCATTTTTACT ATGGCATGGAGTTTTACCTGATGTTGAACCTGTTATAAAACAGCTGC AAGAAGAATTTGTCAGCATAA

12	<p>Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>cgAroE</i> из <i>Corynebacterium glutamicum</i></p>	<p>ATGGGATCACATATAACTCACAGAGCAGCAGTTTTAGGCTCACCAAT  TGAACATTCAAAATCACCAGTGCTTCATAATACAGGATATAAAGCTT  TAGGACTTGATCAATGGGAATATGACAGGTTTGAATGCACAGGAGAT  ATGTTACCGGGCATAAGTTTCAGGAGCAGATGAACTTATCGAGGATT  TTCTGTTACAATGCCTTCTAAATTTGCTGCTTTAGAATTTGCAGATG  AAGTAACTGAAAGAGCAAGAGCTATTGGATCAGCAAATACATTACTT  AGAACTGAAACAGGATGGAGAGCGGATAAATACTGATGTGGATGGAAT  AAGAGGTGCATTAGGTGAATTTGTTAGGAAGTGCATCTCTTGCAGGAA  AACATGCTATTGTAATAGGATCAGGCGGCACTGCAAGACCTGCAATT  TGGGCACTTATAGAAGCAGGAGTAGCAAGAATAACTGTACTTAATAG  ATCAGATAGAACTGCTGAACTTCAAACCTTTATTTGATGAAACACCAA  CTACGTTAGCATATGCTCCACTTGAGCACTTGGATATTGAAGCTGAC  GTTGTAGTTTCTACTGTTCTTTCAGCTGCTATAGCTGGTCTTGAAGA  TACACTGGCTATAGCACCAGTGTGGATGTTATATATGATCCATGGC  CAACTCCTTTAGTAGAAGTTGCAAGAGCTAAAGGACTTAAGGCTGTA  GGCGCCACGTAATGTTGGCCCATCAATCATATGGTCAATTTGAACA  GTTTACAGGAATGGATGCTCCAAGGGATGCAATGAGAGAAGCTTTAG  AAGAATCACTTGAATAAGTGAAGAACATTAG</p>
13	<p>Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>pheA1</i> из <i>Escherichia coli</i></p>	<p>ATGACTAGTGAAAAATCCATTACTTGCTTTAAGAGAAAAAATATCTGC  CCTTGATGAAAAATTAAGGCAAAAGTTGCTTTTATTAGCAGAAAGAAGAGAGCTTG  CAGTTGAGGTAGGTAAGGCAAAAGTTGCTTTTCGCACAGGCCTGTTAGA  GATATTGATAGGGAAAAGAGATCTTTTGGAAAAGATTAATAACTCTTGG  TAAGGCTCATCATTTGGATGCTCATATATAACAAGATTATTTTCAGC  TCATAATAGAAGACTCAGTTCTTACTCAACAGGCATTGCTTCAACAA  CATTTGAATAAGATCAATCCTCACTCAGCCAGAATAGCTTTTTTTAGG  CCAAAAGGTTCTTATTCACATCTGGCTGCTAGACAATATGCAGCAA  GGCATTTTGAACAGTTCATTGAATCAGGGTGTGCTAAATTTGCAGAT  ATATTTAACCAGGTAGAAACAGGTCAAGCCGATTATGCTGTAGTACC  TATAGAAAATACGTGAGTGGTGTATTAATGATGTATATGATCTTTT  TACAGCACACTAGCCTATCCATAGTAGGAGAAATGACTTTAACTATA  GATCACTGCCTTTTAGTATCAGGTACTACAGATCTTTCAACTATAAA  TACAGTATATTTCTCATCCACAGCCATTTCAACAATGTAGTAAATTTCC  TAAACAGATATCCTCACTGGAAGATTGAATATACTGAAAGTACCAGT  GCAGCAATGGAAAAAGTTGCACAGGCTAAATCACCACATGTAGCTGC  ATTAGGTTCTGAGGCTGGCGGCACGTTGTATGGATTACAAGTACTAG  AAAGAATAGAAGCCAATCAAAGGCAAAATTTTACAAGATTTGTGGTT  TTGGCAAGAAAAGCAATAAATGTTTCAGATCAAGTCCCAGCAAAAAC  TACATTAATAATGGCTACAGGACAACAGGCTGGGGCTTTAGTTGAGG  CTTTATTAGTGTGAGAAAATCACAAATTTAATAATGACTAGGCTTGAA  TCAAGACCTATTGATGAAAATCCTTAA</p>

14	Адаптированная к кодону LZ1561 нуклеотидная последовательность <i>pheA2</i> из <i>Escherichia coli</i>	ATGACATCAGAAAAATCCATTATTGGCACTTAGAGAAAAGATATCAGC ACTTGACGAAAAATTA CT TGCATTATTGGCAGAGAGAAGAGAGCTTG CTGTTGAAGTTGGAAAAGGCTAAGCTGTTGTCCCACCGTCCAGTTAGA GATATTGACAGAGAACGGGACTTATTAGAAAAGACTCATTACATTAGG AAAGGCTCATCATTTGGATGCACATTATATACAAGATTATTTTCAGC TCATAATAGAAGATT CAGTATTA ACTCAACAGGCTTTACTTCAACAG CACTTAAATAAAAATAAATCCACATTCAGCTAGGATTGCATTCTTAGG ACCAAAAGGAAGTTATAGTCATCTTGCTGCAAGACAATATGCAGCAA GACACTTTGAACAATTTATTTGAATCAGGATGTGCTAAATTTGCAGAT ATCTTCAATCAAGTAGAAACAGGTCAGGCTGATTATGCAGTAGTTCC AATAGAAAAATACGTC AAGCGGTGCTATAAATGATGTATATGATTTAC TTCAGCATACAAGCTTATCTATAGTTGGTGAGATGACATTGACTATA GATCACTGCTTACTTGTAAAGTGGAACTACAGATTTGTCCACTATAAA TACTGTTTACAGCCATCCACAGCCATTTCAACAGTGTAGTAAATTTT TAAATAGATATCCACACTGGAAAATAGAATACACAGAAAAGTACTTCC GCAGCAATGAAAAGGTTGCACAGGCAAAGTCTCCTCACGTTGCAGC ATTAGTGTAGTGAAGCAGGCGGCACACTTTATGGACTTCAAGTACTCG AAAGGATTGAAGCAAACCAAAGGCAAAAATTTTACTAGATTTGTTGTA CTTGCCAGAAAAGGCTATAAATGTAAGTGATCAGGTACCAGCTAAAAC TACTTTACTTATGGCAACAGGACAACAGGCAGGAGCACTAGTAGAAG CACTTTTAGTATTTGAGAAAATCATAATCTCATAATGACGAGGTTAGAG TCAAGACCAATTCATGGTAATCCAAGAGAGGAAATGTTTTACCTTGA TATCCAAGCAAATCTTGAATCAGCAGAAATGCAGAAAGCATTAAAGG AACTGGGTGAAAATAACAAGATCAATGAAAGTGCTTGGATGTTATCCT TCTGAAAATGTGTTACCTGTAGATCCAACCTAA
----	--	---

Все ссылки, в том числе публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в настоящем документе, тем самым включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана для включения в настоящий документ посредством ссылки и изложена в полном объеме. Упоминание какого-либо предшествующего уровня техники в данном описании не является и не должно восприниматься как подтверждение того, что такой предшествующий уровень техники составляет часть общедоступных сведений в данной области науки в любой стране.

Использование определений в единственном числе в контексте описания изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «вмещающий» следует рассматривать как неограничивающие термины (то есть имеющие значение «включающий, но не ограничивающийся им»), если не указано иное. Термин «по сути состоящий из» ограничивает объем композиции, процесса или способа указанными материалами или этапами, или тем, что не оказывает существенного влияния на основные и новые характеристики композиции, процесса или способа. Следует понимать, что применение альтернативного варианта (например, «или») означает одну, обе или любую их комбинацию альтернативных вариантов. В контексте данного документа термин «около» означает  $\pm 20\%$  от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

Перечисление в данном документе диапазонов значений предназначено только для того, чтобы служить сокращенным способом ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, попадающее в указанный диапазон, если в данном документе не указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было отдельно приведено в данном документе. Например, любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон соотношений, диапазон целых чисел, диапазон размеров или диапазон толщины следует понимать, как содержащий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, если это уместно, его долей (например, одной десятой и одной сотой целого числа), если не указано иное.

10 Все способы, описанные в настоящем документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любого или всех примеров, или вводного слова перед примером (такого как «например») в данном документе предназначено только для лучшего освещения способов и композиций описания и не накладывает ограничения на  
15 объем описанных способов и композиций изобретения, если не заявлено иное. Ни одно выражение, приведенное в настоящем описании изобретения, не следует понимать как указание на какой-либо незаявленный элемент как необходимый для практической реализации описанных способов и композиций.

В данном документе описаны предпочтительные варианты реализации  
20 изобретения. Вариации указанных предпочтительных вариантов реализации станут очевидными для специалистов в данной области техники при прочтении представленного выше описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие вариации при необходимости, при этом авторы изобретения предполагают, что описанные способы и композиции будут осуществляться  
25 на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем документе. Вследствие этого настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенные в прилагаемой формуле изобретения, в пределах применимых правовых норм. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех их возможных вариациях включена в описанные способы и композиции, если в настоящем документе не  
30 указано иное или иное явно не противоречит контексту.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микроорганизм, способный продуцировать 2-фенилэтанол, где указанный  
5 микроорганизм содержит:

(а) гетерологичный фермент, превращающий фенилпируват в  
фенилацетальдегид; и

(б) гетерологичный фермент, превращающий фенилацетальдегид в 2-  
10 фенилэтанол.

2. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что:

(а) гетерологичным ферментом, превращающим фенилпируват в  
фенилацетальдегид, является декарбоксилаза; и

(б) гетерологичным ферментом, превращающим фенилацетальдегид в 2-  
15 фенилэтанол, является фенилацетальдегидредуктаза.

3. Микроорганизм по п. 2, отличающийся тем, что декарбоксилаза представляет  
собой фенилпируват-специфическую декарбоксилазу.

4. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм представляет  
20 собой C1-фиксирующий микроорганизм.

5. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм представляет  
собой микроорганизм Вуда-Льюндала.

6. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм представляет  
25 собой бактерию.

7. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм является  
30 представителем рода, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*,  
*Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и  
*Thermoanaerobacter*.

8. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм нативно способен  
35 продуцировать фенилпируват.

9. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм включает путь  
Вуда-Льюндала, который превращает CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub> в ацетил-КоА.

10. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм содержит один или большее количество из:

- (в) нативный фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват;
- (г) нативный фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват;
- 5 (д) нативный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-D-арабино-гептонат-7-фосфат;
- (э) нативный фермент, который превращает 2-дегидро-3-дезоксид-D-арабиногептонат-7-фосфат в 3-дегидрохинат;
- (е) нативный фермент, который превращает 3-дегидрохинат в 3-дегидрошикимат;
- 10 (ж) нативный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат;
- (з) нативный фермент, который превращает шикимат в шикимат-3-фосфат;
- (и) нативный фермент, который превращает шикимат-3-фосфат в 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат;
- (к) нативный фермент, который превращает 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат в хоризмат; или
- 15 (л) нативный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

11. Микроорганизм по п. 10, отличающийся тем, что:

- (в) нативным ферментом, который превращает ацетил-КоА в пируват, является пируват:ферредоксиноксидоредуктаза;
- 20 (г) нативным ферментом, превращающим пируват в фосфоенолпируват, является пируватфосфатдикиназа;
- (д) нативным ферментом, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-D-арабино-гептонат-7-фосфат, является 2-дегидро-3-дезоксид-D-арабино-гептонат-7-фосфатсинтаза;
- 25 (э) нативным ферментом, который превращает 2-дегидро-3-дезоксид-D-арабиногептонат-7-фосфат в 3-дегидрохинат, является 3-дегидрохинатсинтаза;
- (е) нативным ферментом, который превращает 3-дегидрохинат в 3-дегидрошикимат, является 3-дегидрохинатдегидратаза;
- 30 (ж) нативным ферментом, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, является шикиматдегидрогеназа;
- (з) нативным ферментом, который превращает шикимат в шикимат-3-фосфат, является шикиматкиназа;
- (и) нативным ферментом, который превращает шикимат-3-фосфат в 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат, является 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтаза;
- 35 (к) нативным ферментом, который превращает 5-О-(1-карбоксивинил)-шикимат-3-фосфат в хоризмат, является хоризматсинтаза; или

(л) нативным ферментом, который превращает хоризмат в фенилпируват, является бифункциональная хоризматмутаза/префенатдегидратаза.

5 12. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм дополнительно содержит один или большее количество из:

(д) гетерологичный фермент, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат;

(ж) гетерологичный фермент, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат; или

10 (л) гетерологичный фермент, который превращает хоризмат в фенилпируват.

13. Микроорганизм по п. 12, отличающийся тем, что:

(д) гетерологичным ферментом, который превращает фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат в 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфат, является 2-дегидро-3-дезоксид-арабино-гептонат-7-фосфатсинтаза;

(ж) гетерологичным ферментом, который превращает 3-дегидрошикимат в шикимат, является шикиматдегидрогеназа; или

(л) гетерологичным ферментом, который превращает хоризмат в фенилпируват, является бифункциональная хоризматмутаза/префенатдегидратаза.

20 14. Микроорганизм по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанный микроорганизм содержит:

(1) *ecAroE*, *kivD*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

(2) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA1* и *aroG*;

25 (3) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

(4) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

(5) *cgAroE*, *kivD*, *rrPAR*, *pheA2* и *aroG*;

(6) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

(7) *pheA1*, *aroG*, *abPPDC* и *ecPAR*;

30 (8) *egAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;

(9) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;

(10) *cgAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;

(11) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;

(12) *cgAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

35 (13) *ecAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;

(14) *ecAroE*, *aro10*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;

(15) *ecAroE*, *aro10*, *lePAR*, *pheA2* и *aroG*;

(16) *cgAroE*, *abPPDC*, *lePAR*, *pheA1* и *aroG*;

- (17) *cgAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (18) *cgAroE*, *abPPDC*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (19) *ecAroE*, *kivD*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (20) *cgAroE*, *aro10*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 5 (21) *ecAroE*, *abPPDC*, *bIPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (22) *ecAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA1* и *aroG*;  
 (23) *cgAroE*, *abPPDC*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*;  
 (24) *cgAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 (25) *ecAroE*, *aro10*, *rsPAR*, *pheA2* и *aroG*;  
 10 (26) *ecAroE*, *aro10*, *adh6*, *pheA2* и *aroG*; или  
 (27) *ecAroE*, *abPPDC*, *ecPAR*, *pheA2* и *aroG*.

15. Микроорганизм по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что микроорганизм содержит гетерологичные гены и промоторы комбинаторного штамма 2C03, 1C10, 2C54,  
 15 2C09, 2C47, 2C55, 2C53, H57, 1C47, 2C10, 2A18, 1C54, 2C01, 1C31, 2B17, 2C52, 1C09, H18, H58, 2C27, 2D22, 2D07, 2D24, 2D03, 1C29, 2B26, 2C38, 2A27, 2C12 или 2B27.

16. Микроорганизм по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что микроорганизм ферментирует газообразный субстрат, содержащий CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub>, с образованием 2-фенилэтанола.  
 20

17. Микроорганизм по п. 16, отличающийся тем, что газообразный субстрат включает синтез-газ или промышленные газообразные отходы.

25 18. Микроорганизм по п. 16, отличающийся тем, что микроорганизм не продуцирует никаких других спиртов C3+.

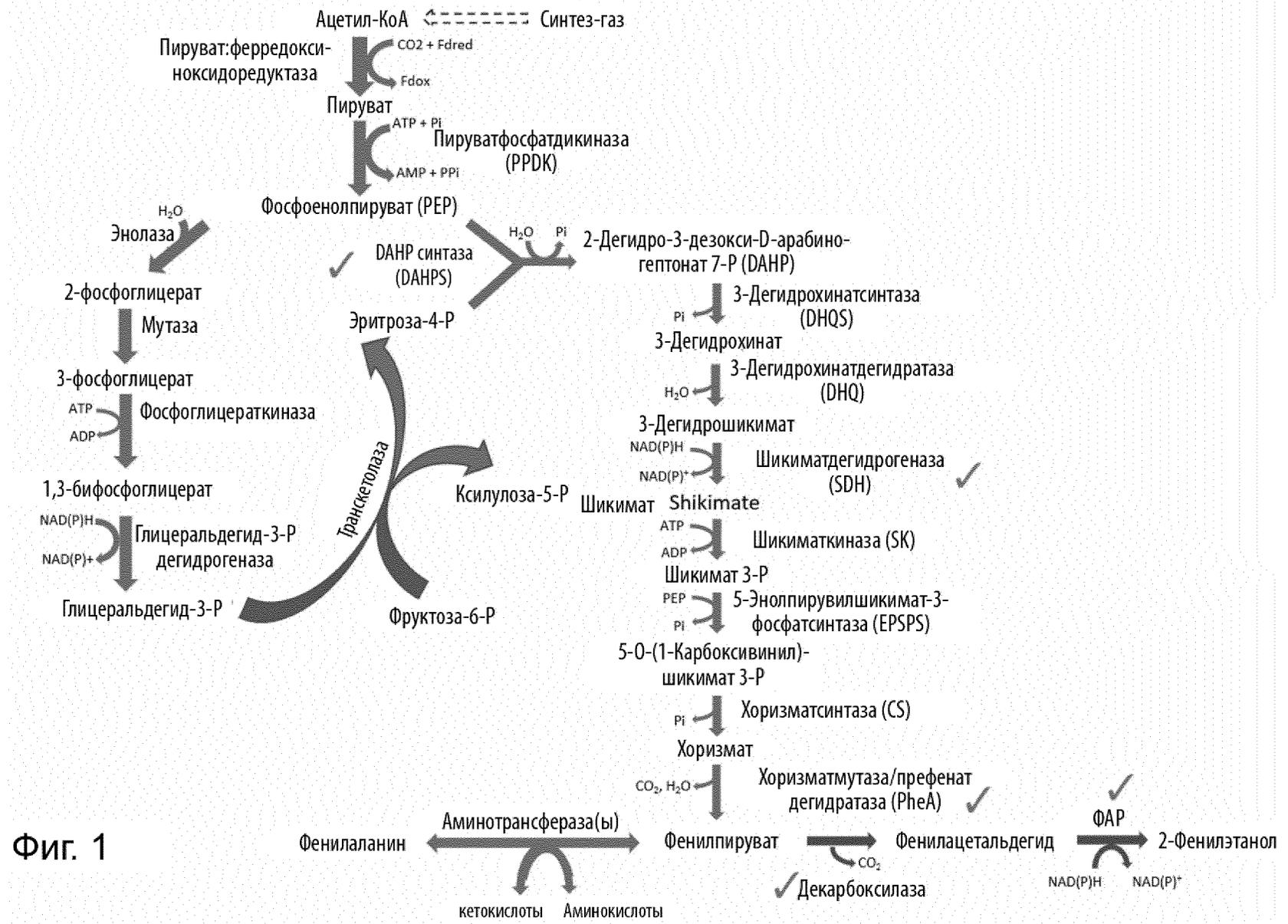
19. Микроорганизм по п. 18, отличающийся тем, что микроорганизм не продуцирует какие-либо другие спирты C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или C10.  
 30

20. Способ получения 2-фенилэтанола, включающий культивирование микроорганизма по любому из пп. 1-17 в присутствии газообразного субстрата.

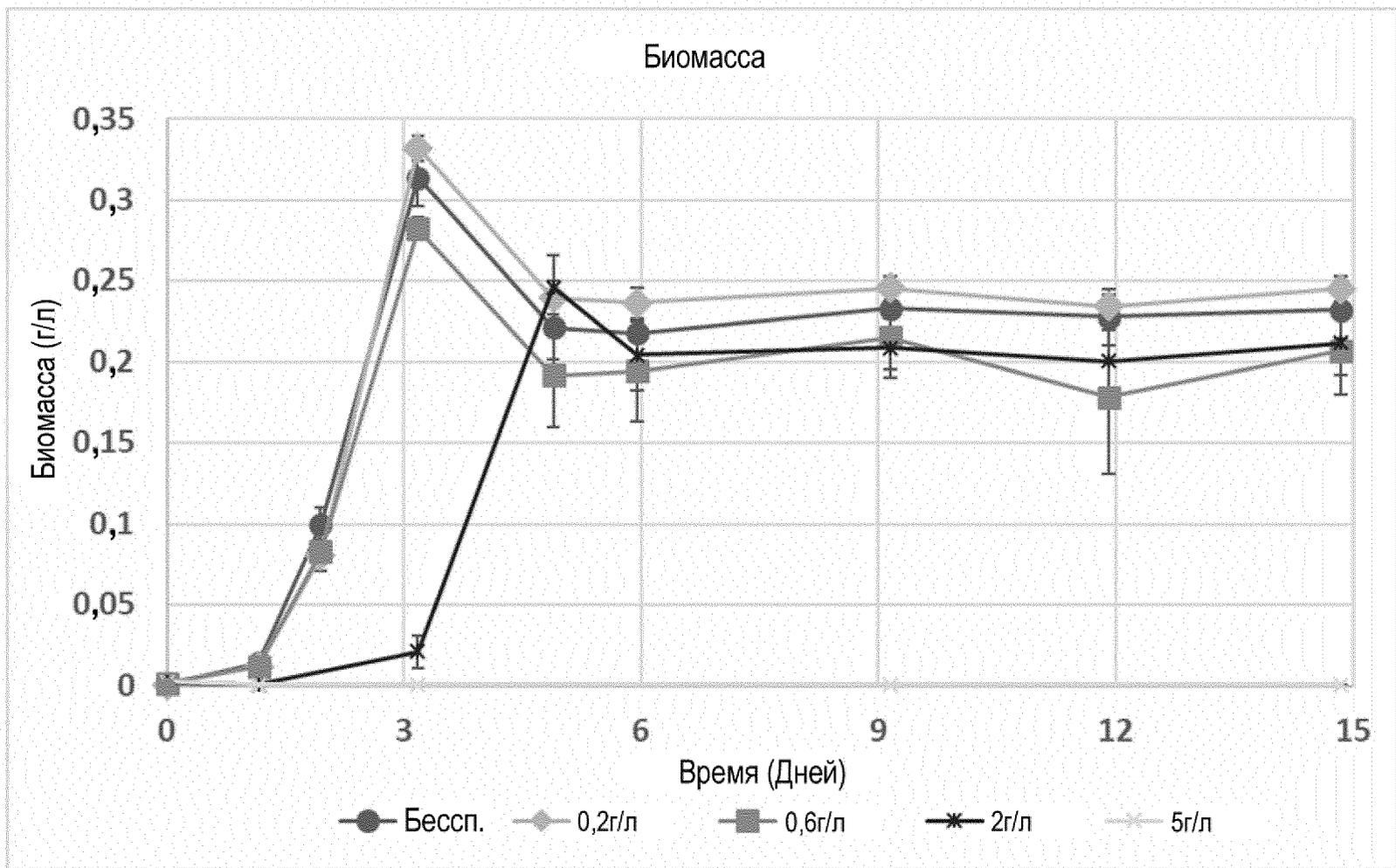
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит источник углерода C1, включающий CO, CO<sub>2</sub> и/или H<sub>2</sub>.  
 35

22. Способ по любому из пп. 20-22, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит синтез-газ или промышленные газообразные отходы.

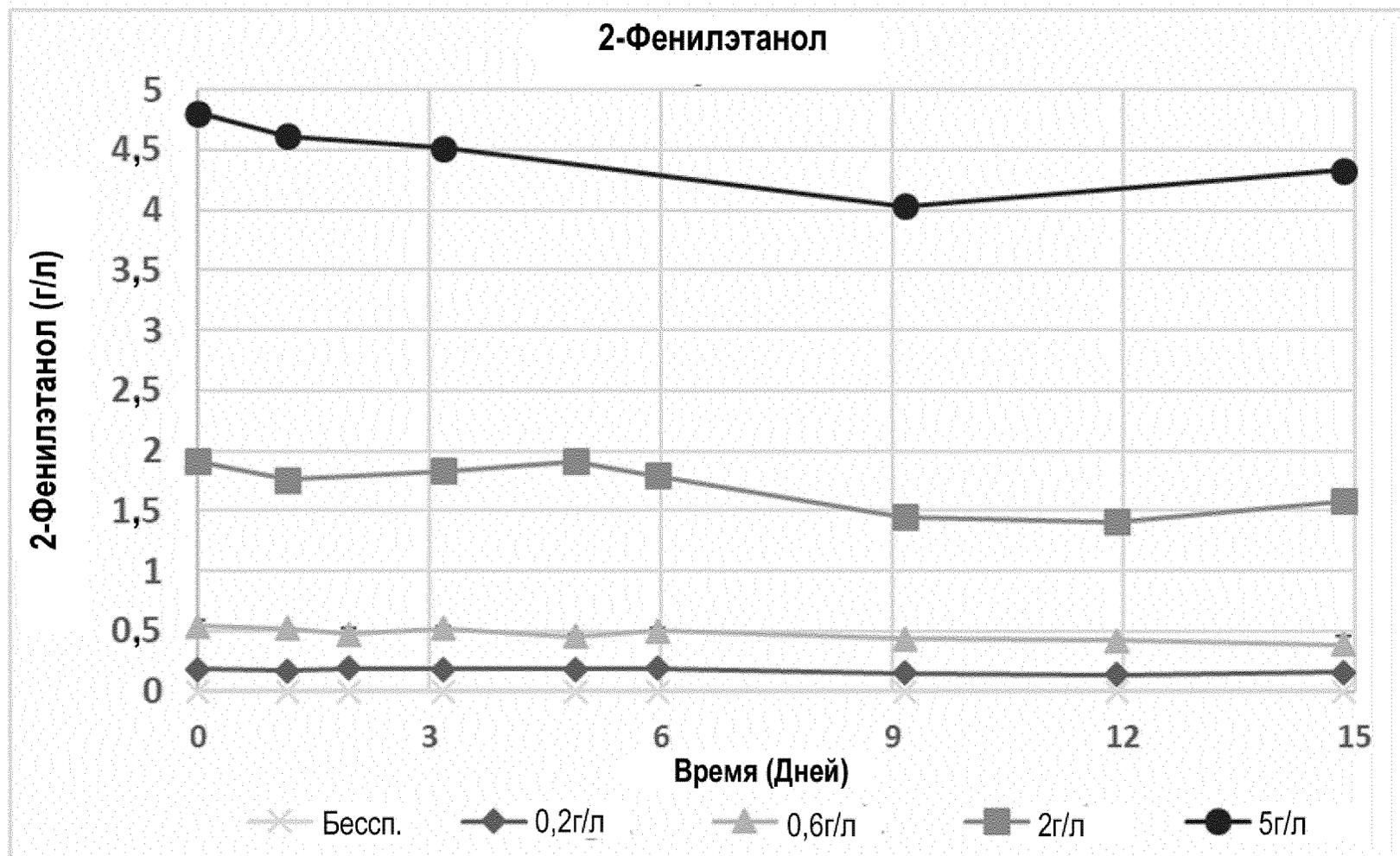
### Путь Вуда-Льюнгдала



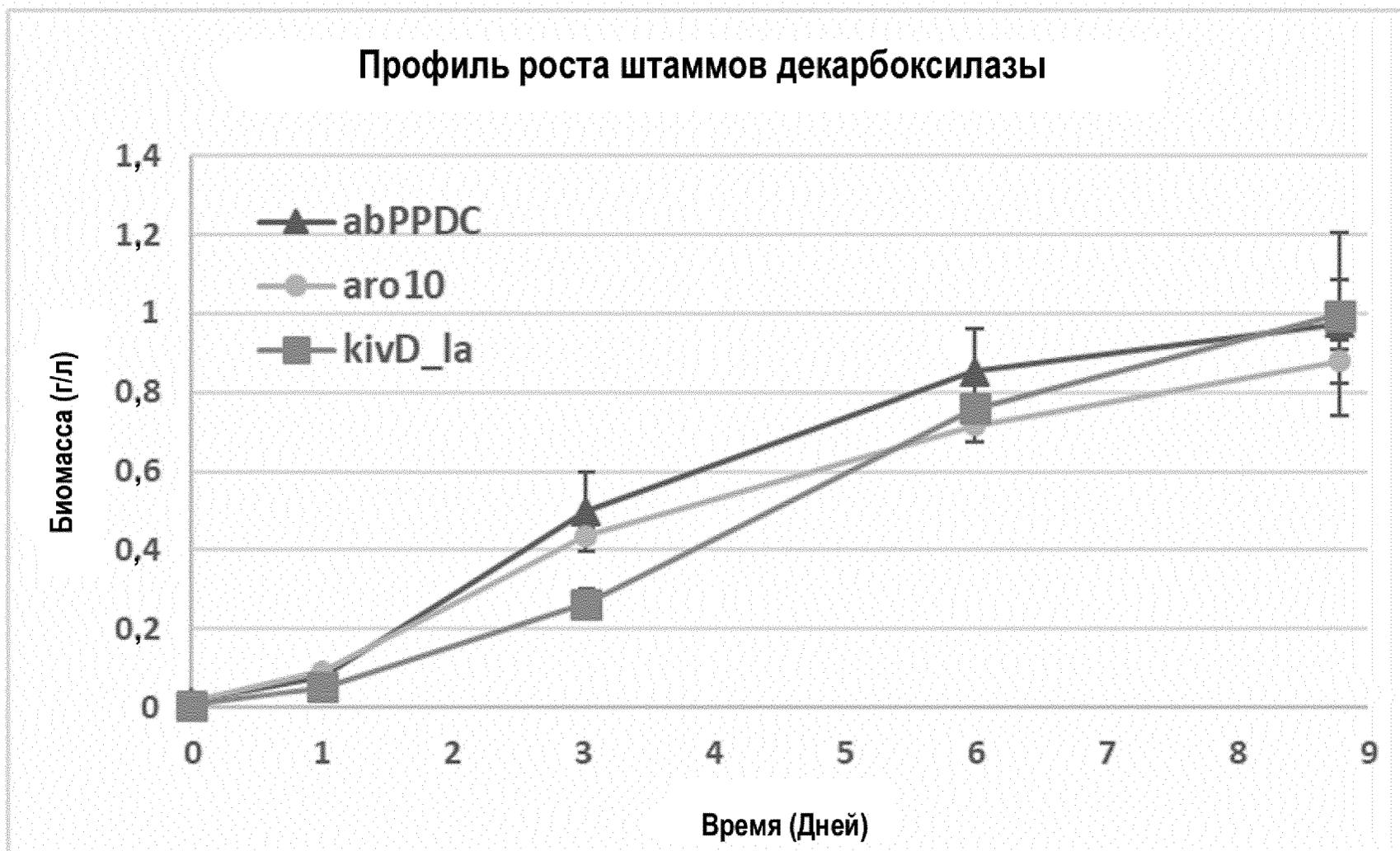
Фиг. 1



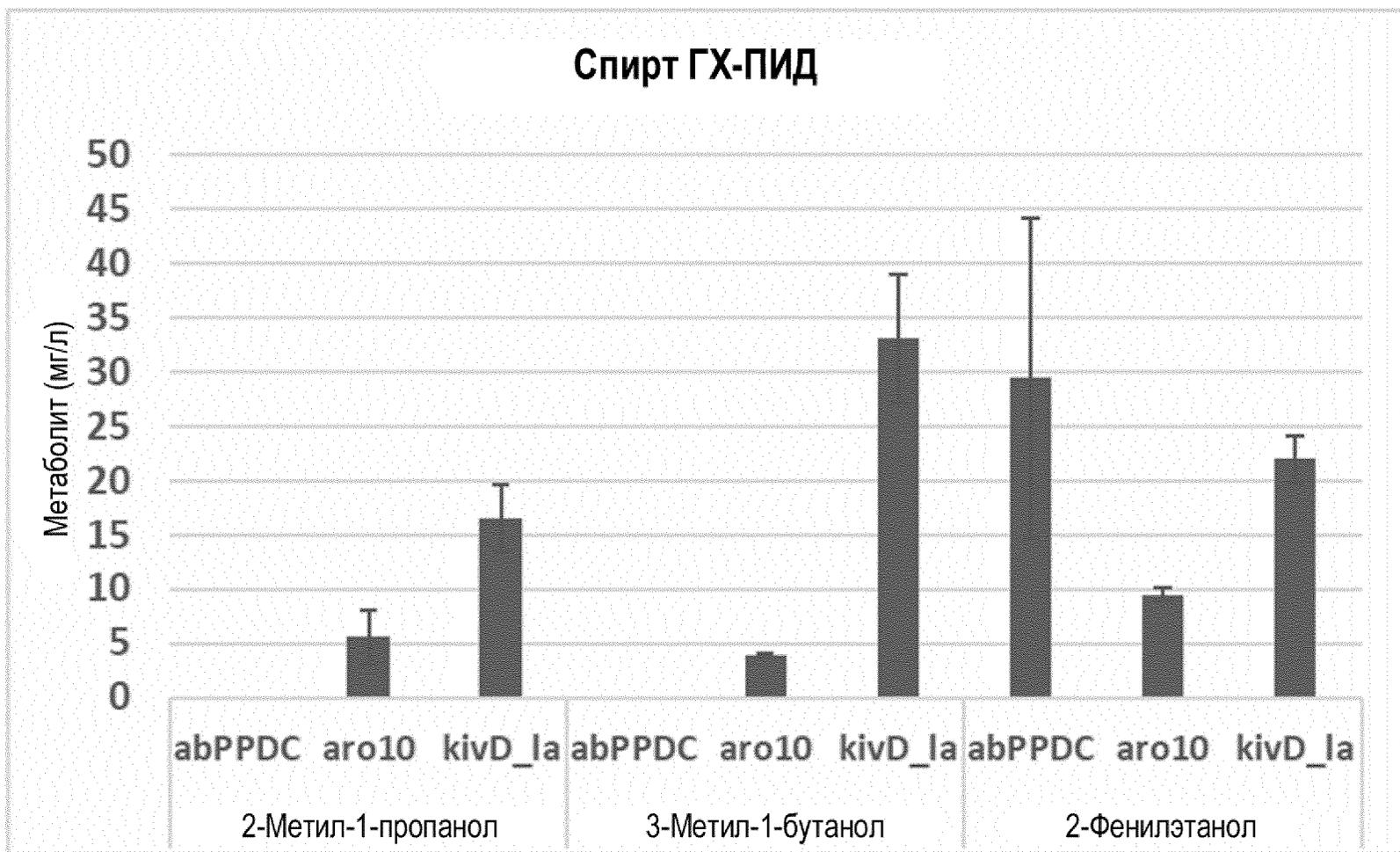
Фиг. 2А



Фиг. 2В



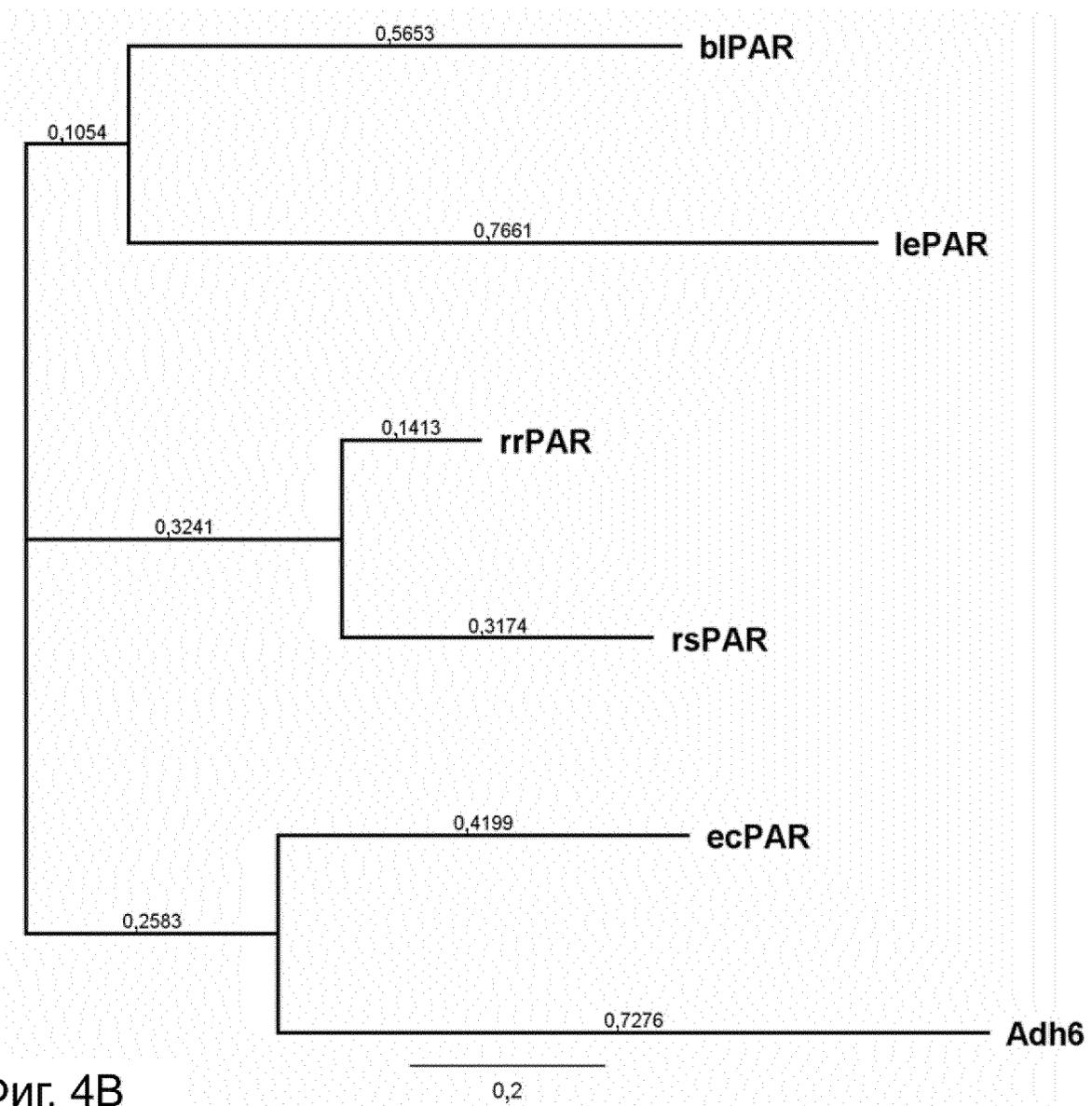
Фиг. 3А



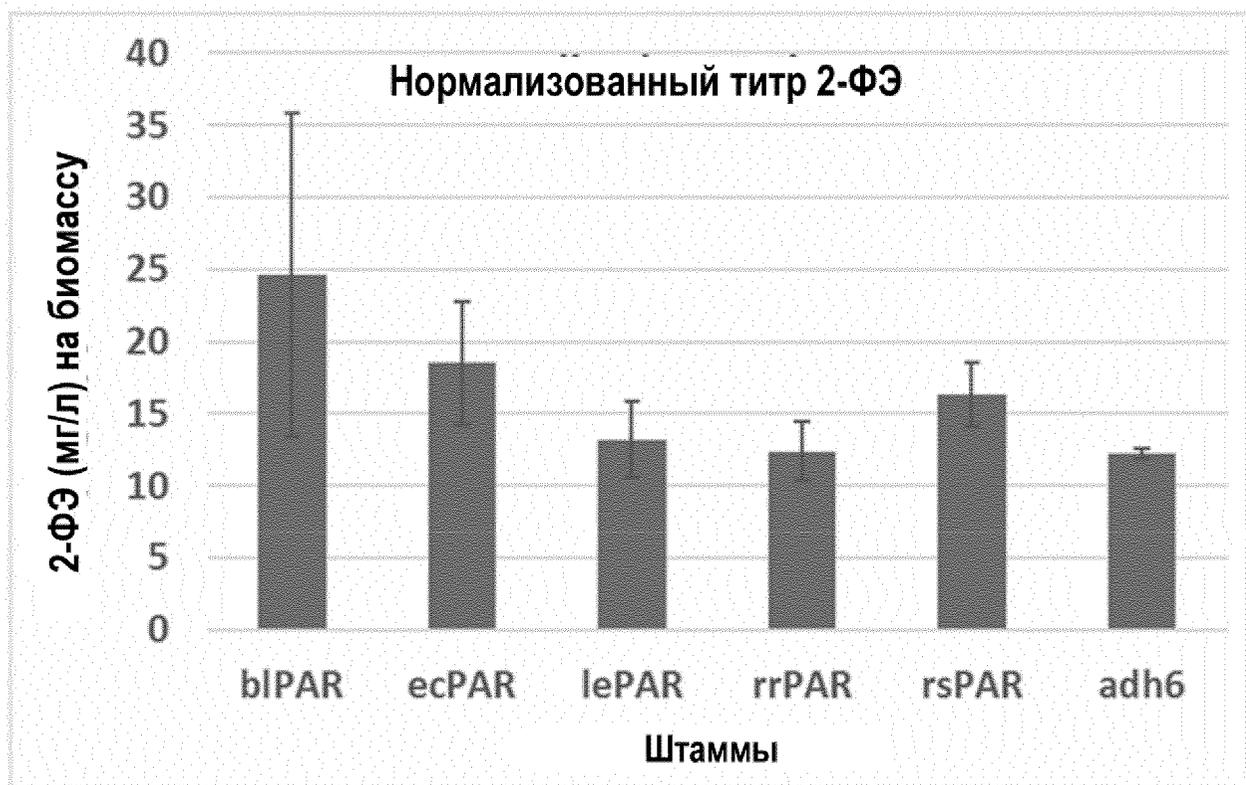
Фиг. 3В

Вариант ФАР	Вид	Длина АК	Кофактор	Ссылка
adh6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	360	NADPH	Chemico-Biological Interactions 143-144 (2003): 229-238
lePAR	<i>Solanum lycopersicum</i>	328	NADPH	Phytochemistry 68 (2007) 2660 - 2779
ecPAR	<i>Escherichia coli</i>	339	?	MicrobiologyOpen (2017) 6: e486
bIPAR	<i>Brevibacterium linens</i>	363	NADH	Journal of Bioscience and Bioengineering 100 (2005): 318 - 322
rrPAR	<i>Rhodococcus ruber</i>	346	NADH	Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 39 (2012): 1385 - 1396
rsPAR	<i>Rhodococcus sp. ST-10</i>	348	NADH	Applied and Environmental Microbiology 63 (1997): 3783 - 3788

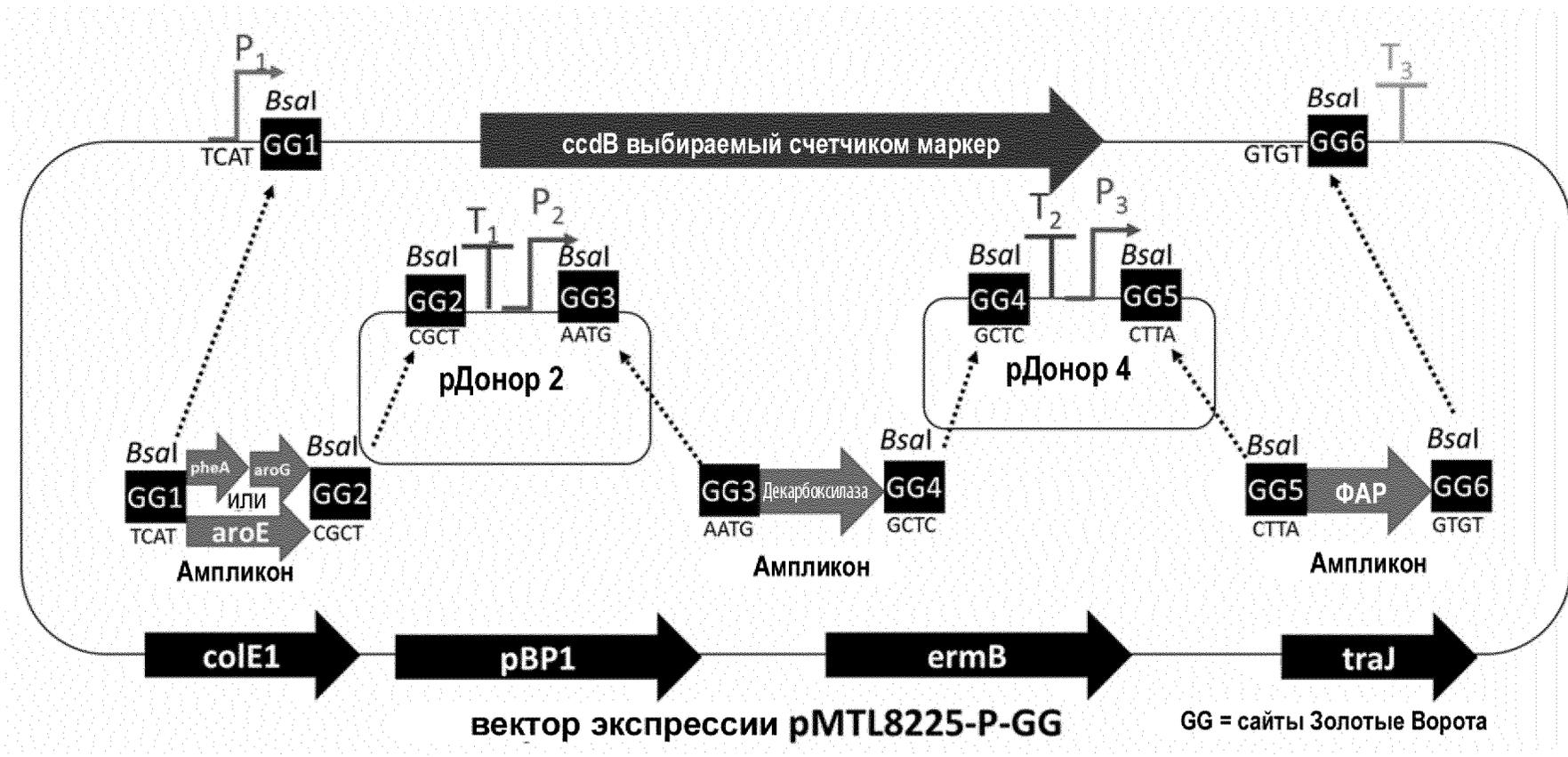
Фиг. 4А



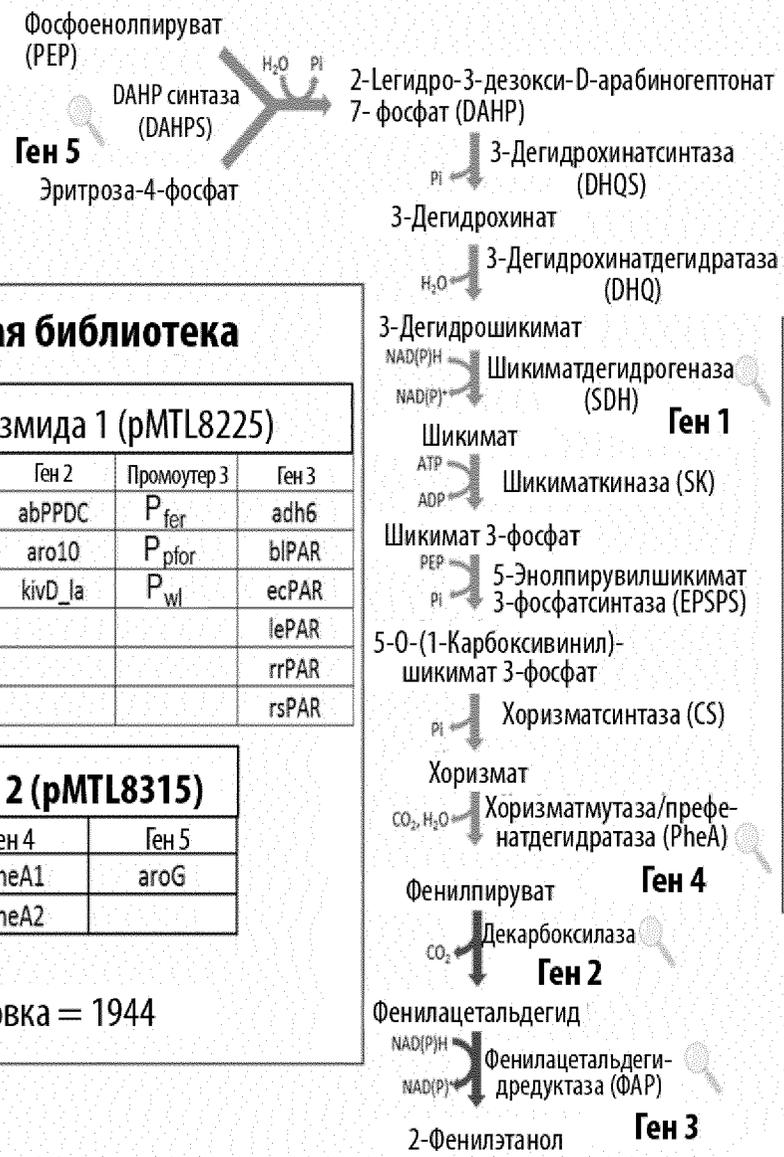
Фиг. 4В



Фиг. 4С



Фиг. 5



### Двуплазмидная библиотека

#### Комбинаторная плаزمида 1 (pMTL8225)

Промоутер 1	Ген 1	Промоутер 2	Ген 2	Промоутер 3	Ген 3
P <sub>fer</sub>	cgAroE	P <sub>fer</sub>	abPPDC	P <sub>fer</sub>	adh6
P <sub>pfor</sub>	ecAroE	P <sub>pfor</sub>	aro10	P <sub>pfor</sub>	blPAR
P <sub>wl</sub>		P <sub>wl</sub>	kivD_la	P <sub>wl</sub>	ecPAR
					lePAR
					rrPAR
					rsPAR

#### Плазмида 2 (pMTL8315)

Promoter	Ген 4	Ген 5
P <sub>wl</sub>	pheA1	aroG
	pheA2	

Перестановка = 1944

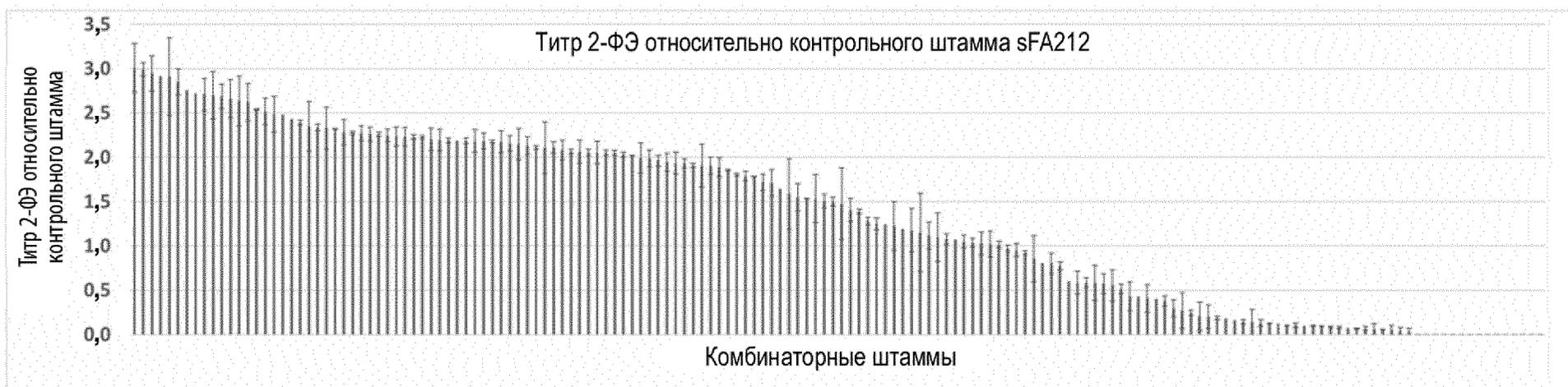
### Одноплазмидная библиотека

#### Комбинаторная плазмида 1 (pMTL8225)

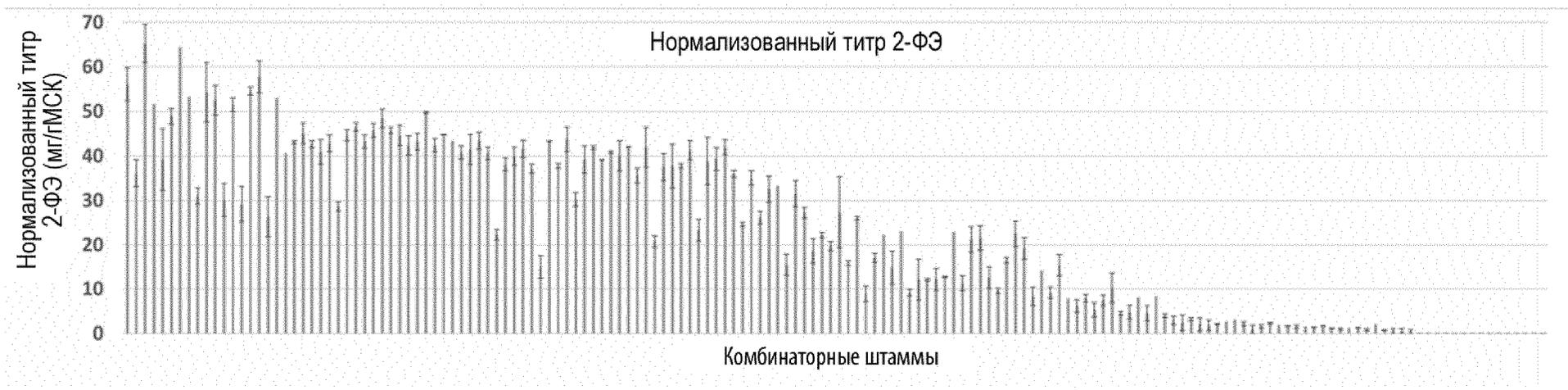
Промоутер 1	Ген 4+5	Промоутер 2	Ген 2	Промоутер 3	Ген 3
P <sub>fer</sub>	pheA1+aroG	P <sub>fer</sub>	abPPDC	P <sub>fer</sub>	adh6
P <sub>pfor</sub>	pheA2+aroG	P <sub>pfor</sub>	aro10	P <sub>pfor</sub>	blPAR
P <sub>wl</sub>		P <sub>wl</sub>	kivD_la	P <sub>wl</sub>	ecPAR
					lePAR
					rrPAR
					rsPAR

Перестановка = 972

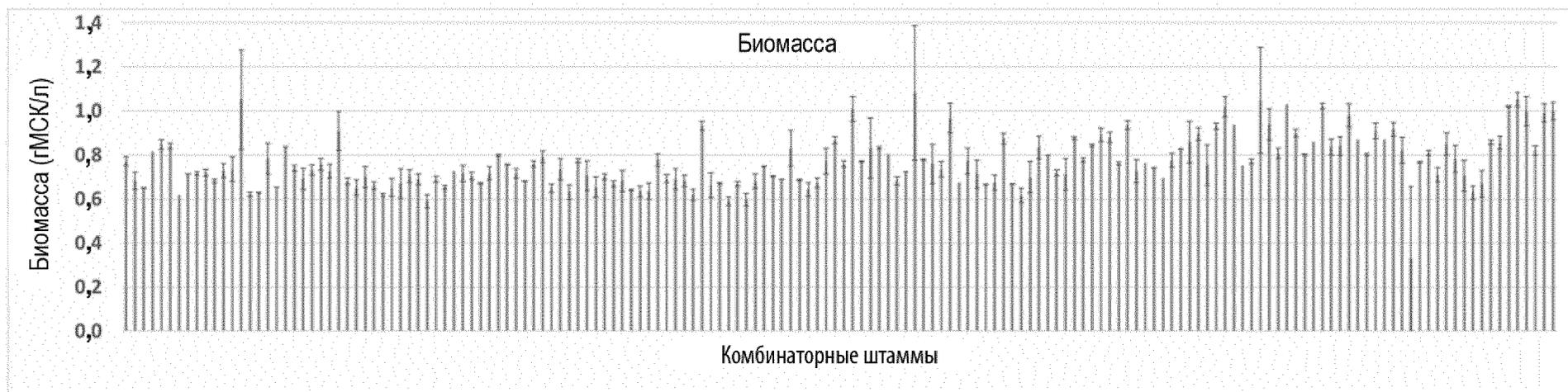
Фиг. 6

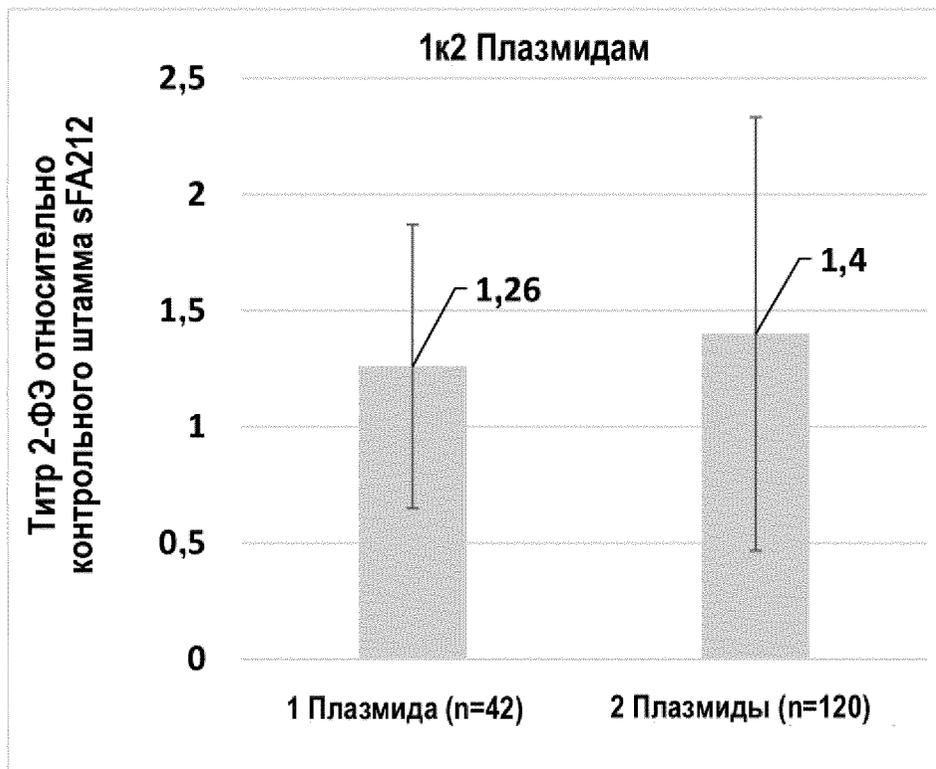


Фиг. 7А

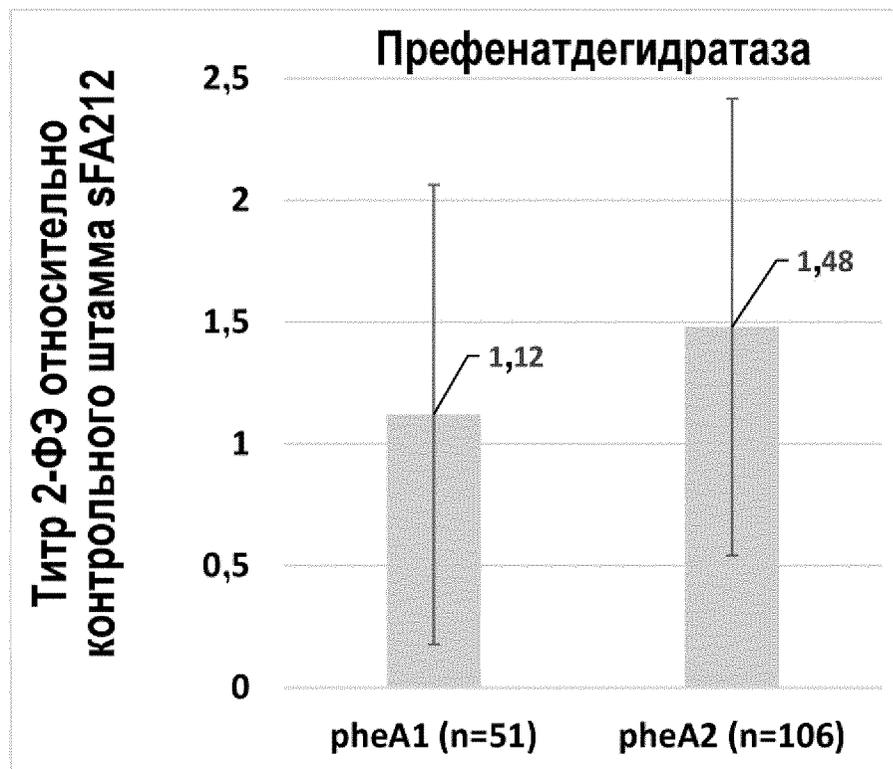


Фиг. 7В

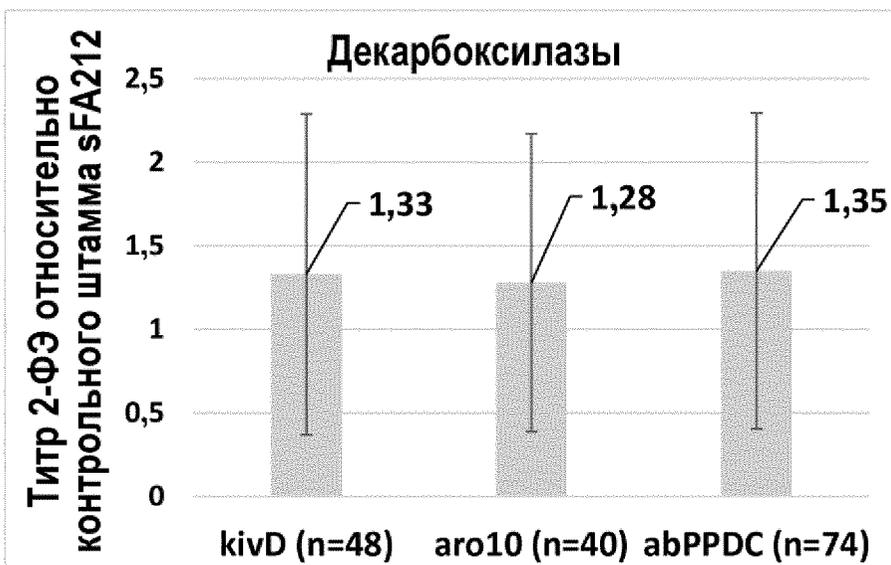




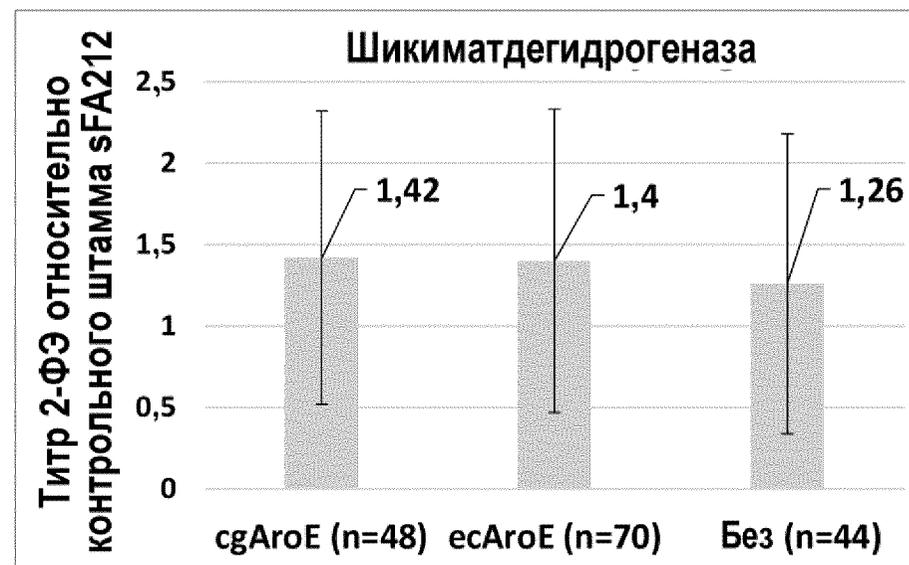
Фиг. 8А



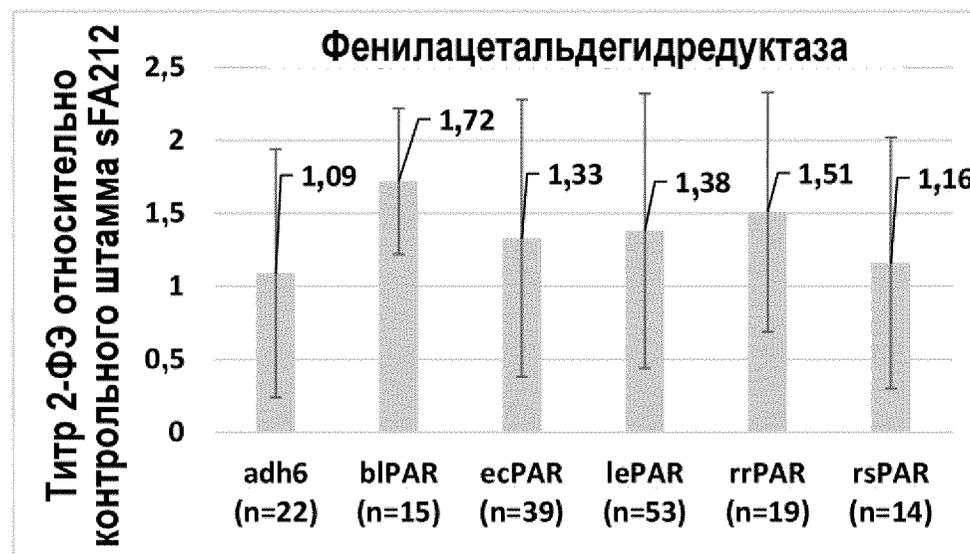
Фиг. 8В



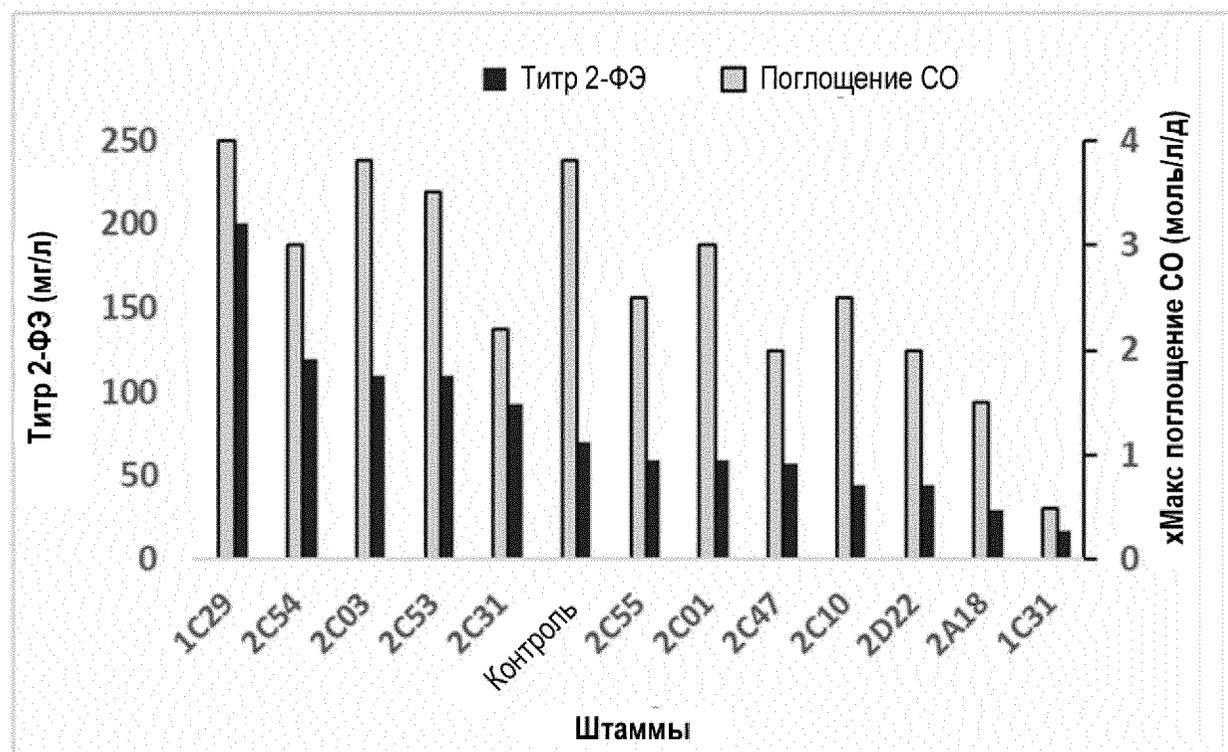
Фиг. 8С



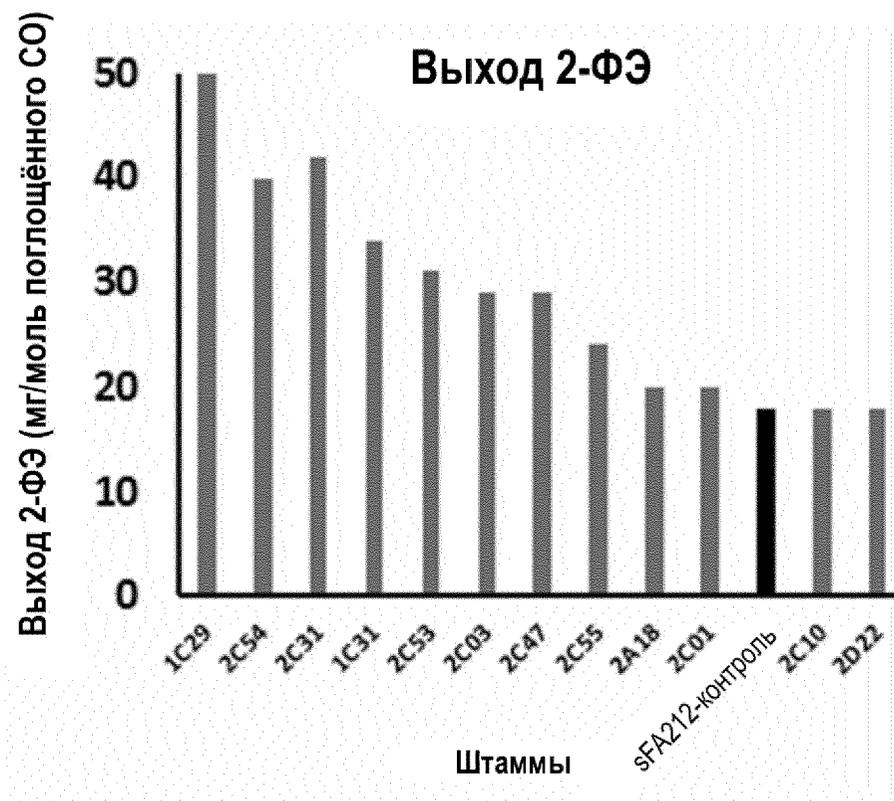
Фиг. 8D



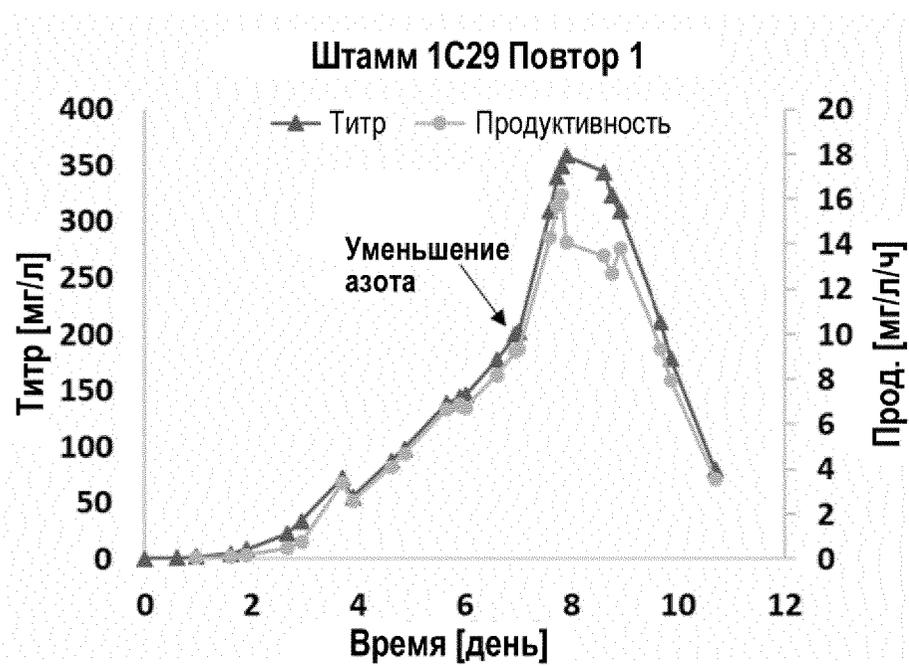
Фиг. 8Е



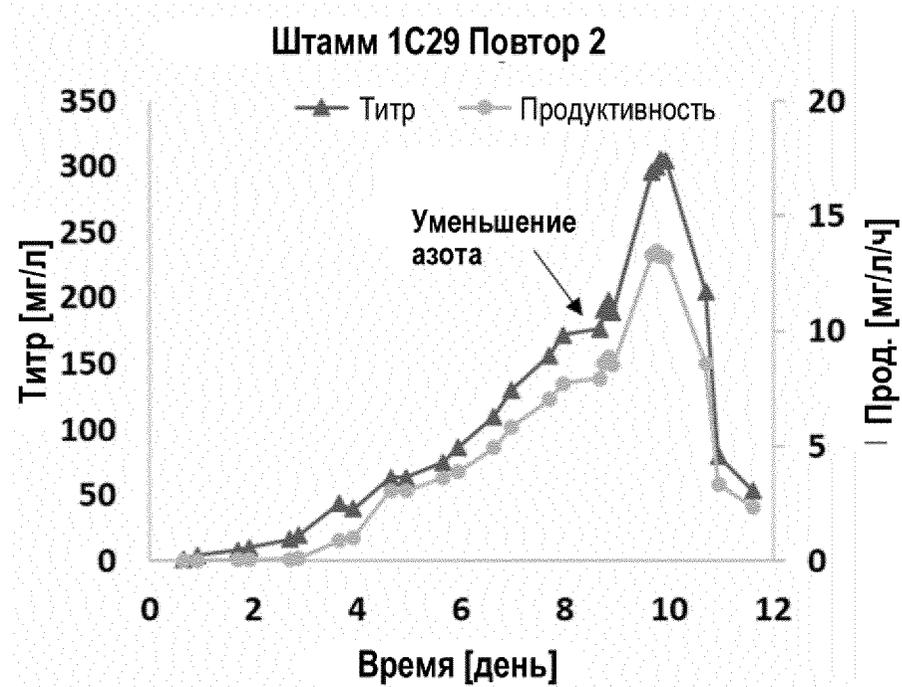
Фиг. 9А



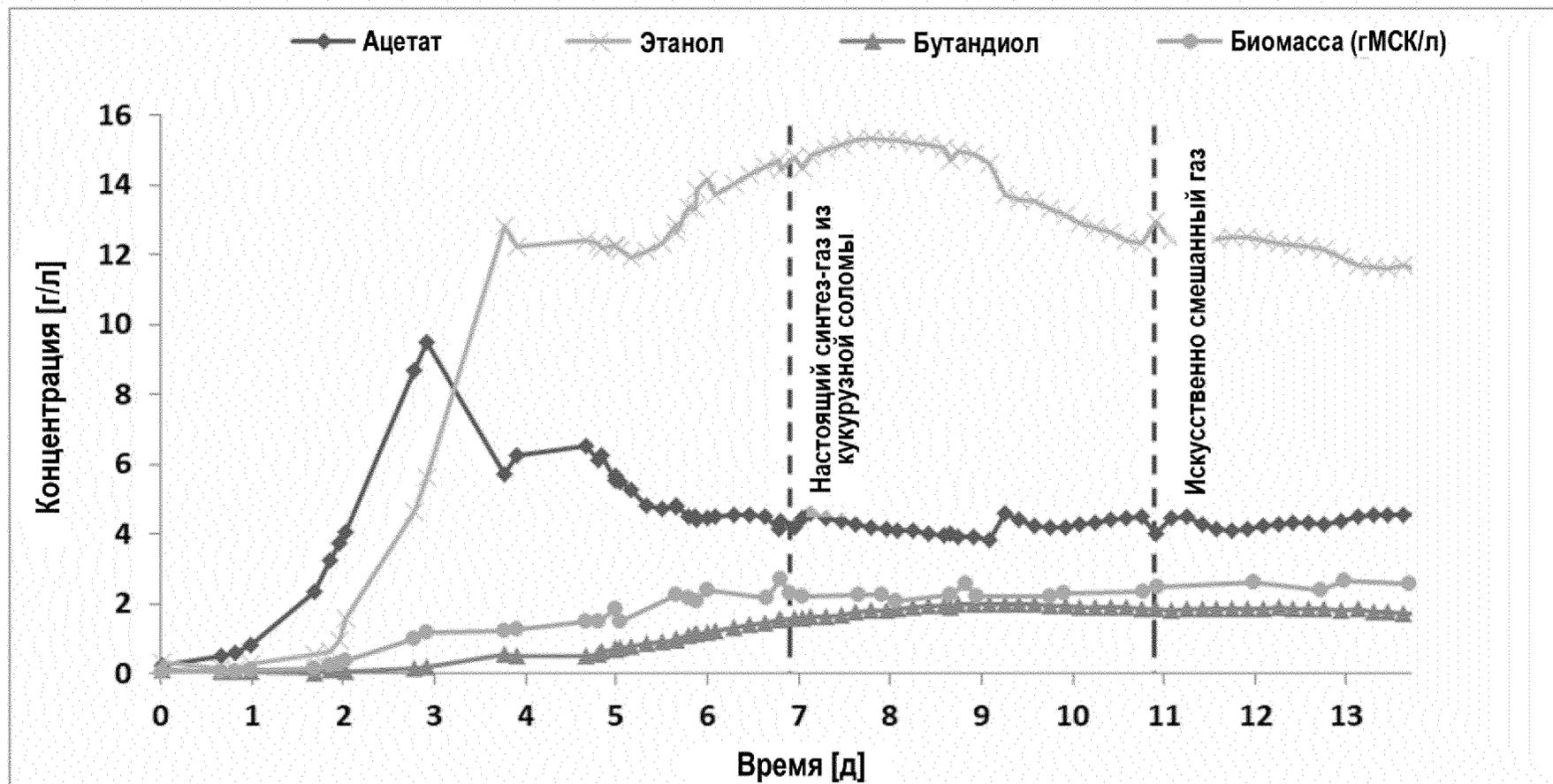
Фиг. 9В



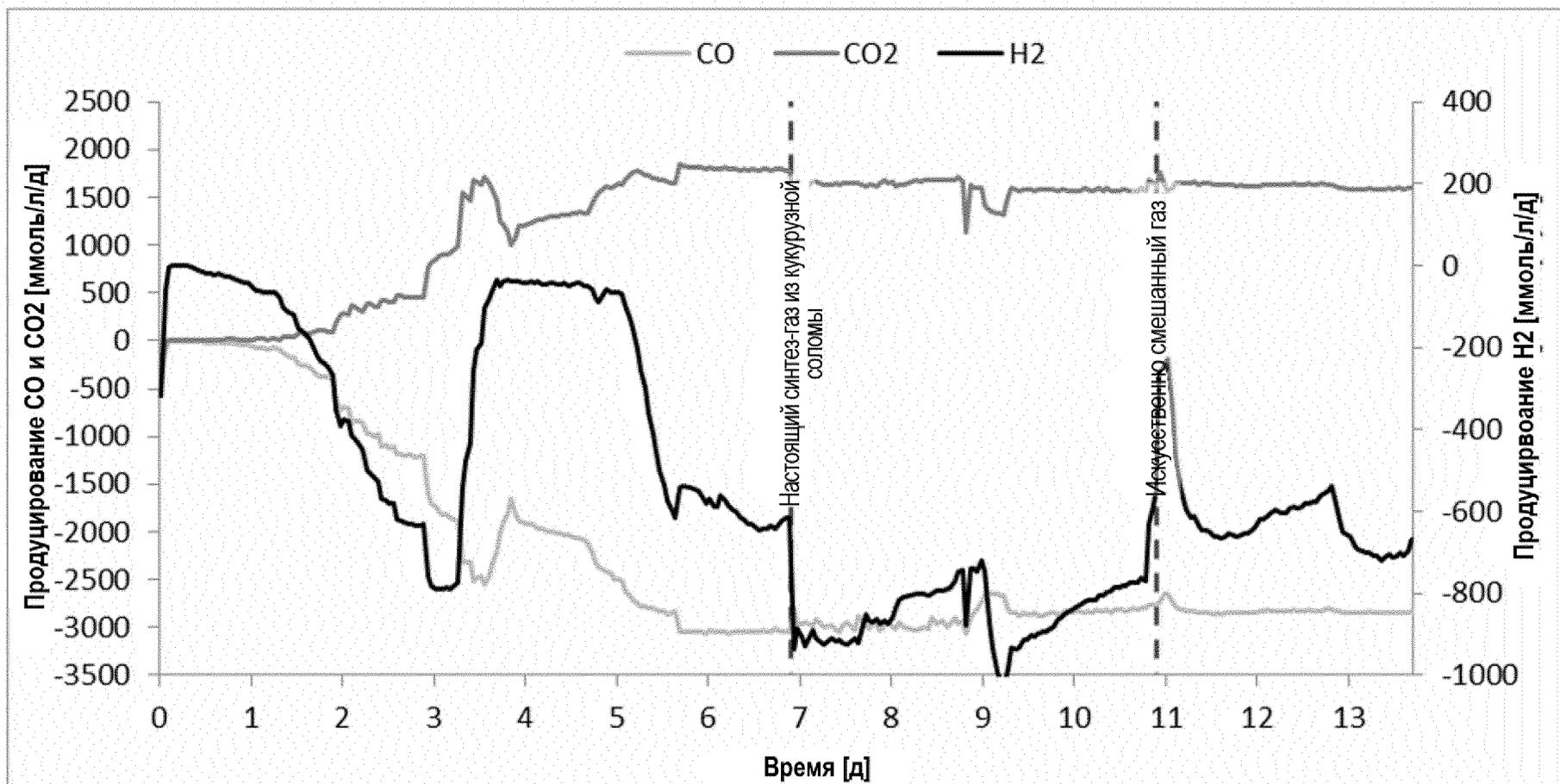
Фиг. 10А



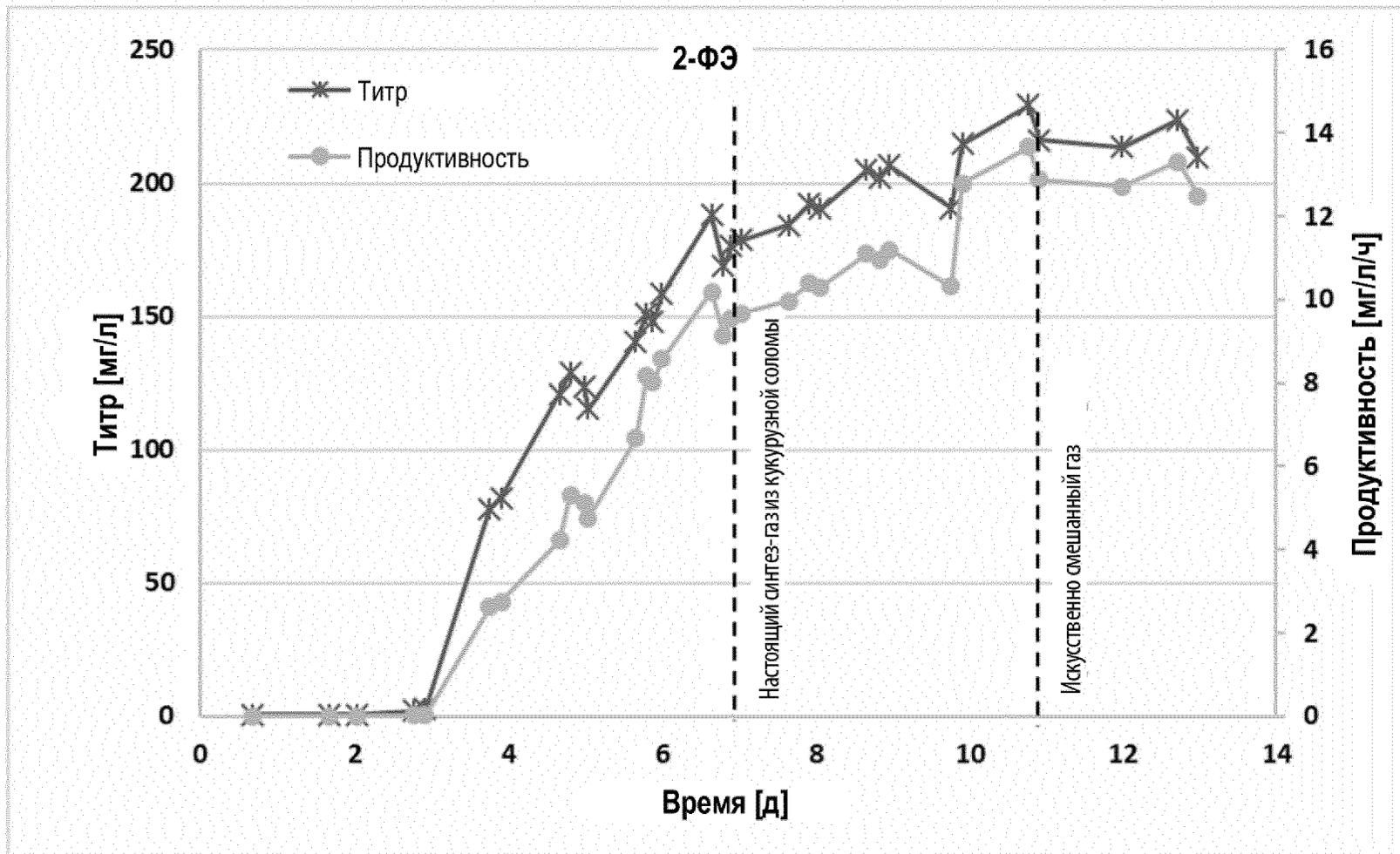
Фиг. 10В



Фиг. 11А



Фиг. 11В



Фиг. 11С