(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 042922 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.05

(21) Номер заявки
202091457

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. ***C12P 7/18*** (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(54) МИКРООРГАНИЗМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

(31) **62/607,446; 62/683,454**
(32) **2017.12.19; 2018.06.11**
(33) **US**
(43) **2020.09.10**
(86) **PCT/US2018/066619**
(87) **WO 2019/126400 2019.06.27**

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

(72) Изобретатель:
Кёпке Михель, Енсен Расмус (US)

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

(56) WO-A1-2014004625
US-A1-20110312049
ISLAM, M.A. et al., "Exploring biochemical pathways for mono-ethylene glycol (MEG) synthesis from synthesis gas", Metabolic Engineering, Epub. 2017.04.19, vol. 41, pp. 173-181, See pages 173-180
US-A1-20130330809
US-A1-20100151543

(57) Изобретение предлагает генетически сконструированные микроорганизмы и способы биологического производства этиленгликоля и прекурсоров этиленгликоля. В частности, микроорганизм согласно изобретению продуцирует этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля через одно или большее количество из 5,10-метилентетрагидрофолата, оксалоацетата, цитрата, малата и глицина. Изобретение дополнительно предлагает композиции, содержащие этиленгликоль или полимеры этиленгликоля, такие как полиэтилентерефталат.

042922 B1

042922 B1

Уровень техники

Область техники

Изобретение относится к генетически модифицированным микроорганизмам и способам получения этиленгликоля и прекурсоров этиленгликоля посредством микробиологической ферментации, в частности, посредством микробиологической ферментации газообразного субстрата.

Описание родственной области техники

Этиленгликоль, также известный как моноэтиленгликоль (МЭГ), имеет текущий объем рынка более чем 33 миллиарда долларов США, и является важным компонентом огромного множества промышленных, медицинских и потребительских товаров. Этиленгликоль в настоящее время производится с использованием процессов химического катализа, которые требуют большого количества энергии и воды, производят ряд нежелательных побочных продуктов, и зависят от нефтехимического сырья. Спрос на экологически чистые материалы привел к некоторому технологическому прогрессу, например каталитическому производству этиленгликоля из этанола, полученного из сахарного тростника.

Прекурсоры этиленгликоля также являются коммерчески ценными. Например, гликолят используется для ухода за кожей, личной гигиены, окрашивания, дубления и в качестве чистящего средства. Глиоксилат является промежуточным продуктом для ванилина, сельскохозяйственных химикатов, антибиотиков, аллантоина и комплексообразующих агентов.

Однако известно, что ни один микроорганизм не способен биологически продуцировать этиленгликоль, и нет хорошо налаженного полностью биологического пути производства этиленгликоля. Некоторые биологические пути к этиленгликолю из сахаров были описаны в литературе. Например, Alkim et al., Microb Cell Fact, 14: 127, 2015 продемонстрировали продуцирование этиленгликоля из (D)-ксилозы в E. coli, но отметили, что для достижения высоких выходов необходимы аэробные условия. Аналогичным образом, Pereira et al., Metab Eng, 34: 80-87, 2016, добились продуцирования этиленгликоля из пентоз в E. coli. Несколько исследований по производству этиленгликоля из пентоз также были выполнены с S. cerevisiae, но показали противоречивые результаты; смотрите, например, Uranukul et al., Metab Eng, 51: 20-31, 2018.

Ферментация газа представляет путь для преобразования широкого спектра легко доступных дешёвых сырьевых материалов C1, таких как промышленные отходы газов, синтез-газ, или реформированный метан в химические продукты или топливо. Поскольку метаболизм ферментации газа значительно отличается от метаболизма ферментации сахаров, использование вышеупомянутых путей является нецелесообразным, так как эти пути потребуют получения прекурсоров сахаров из газа посредством глюконеогенеза, энергетически отрицательного процесса. На сегодняшний день не существует способа производства этиленгликоля из газообразных субстратов.

В исследовательском изыскании Islam et al., Metab Eng, 41: 173-181, 2017 предсказал сотни гипотетических путей получения этиленгликоля из синтез-газов в M. thermoacetia с использованием инструментов хемоинформатики. Однако даже для квалифицированного специалиста в данной области техники является невозможным внедрить эти пути в организм, ферментирующий газ, так как многие из путей невозможны из-за термодинамических или других ограничений. Например, почти 2000 реакций, зависящих от кислорода, или кислородосодержащих радикалов, были предусмотрены Islam et al., что являлось бы невозможным в строго анаэробной системе. Единственные, выявленные Islam et al. гипотетические пути, с известными реакциями, требуют глюконеогенеза или этанола в качестве промежуточного соединения. Следовательно, остается потребность в проверенных, энергетически выгодных рекомбинантных продуцирующих системах, которые могут продуцировать высокие выходы этиленгликоля и прекурсоров этиленгликоля из газообразных субстратов.

Сущность изобретения

В противопоставление вышеизложенному обоснованию данное изобретение предлагает определенные преимущества и достижения по сравнению с известным уровнем техники.

Хотя данное изобретение, раскрытое в данном документе, не ограничивается конкретными преимуществами или функциональными возможностями, изобретение предлагает генетически модифицированный микроорганизм, способный продуцировать этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля из газообразного субстрата.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм продуцирует этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля через одно или большее количество промежуточных соединений, выбранных из группы, состоящей из 5,10-метилентетрагидрофолата, оксалоацетата, цитрата, малата и глицина.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм содержит один или большее количество гетерологичных ферментов, способных превращать оксалоацетат в цитрат, гетерологичных ферментов, способных превращать глицин в глиоксилат, гетерологичных ферментов, способных превращать изоцитрат в глиоксилат, и гетерологичных ферментов, способных превращать гликолят в гликоальдегид.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, гетерологичный фермент, способный превращать оксалоацетат в цитрат, представляет собой цитрат [Si]-синтазу [2.3.3.1], АТФ-

цитрат-синтазу [2.3.3.8]; или цитрат (Re)-синтазу [2.3.3.3]; гетерологичный фермент, способный превращать глицин в глиоксилат, представляет собой аланин-глиоксилат-трансаминазу [2.6.1.44], серин-глиоксилат-трансаминазу [2.6.1.45], серин-пируват-трансаминазу [2.6.1.51], глицин-оксалоацетат-трансаминазу [2.6.1.35], глицин-трансаминазу [2.6.1.4], глицин-дегидрогеназу [1.4.1.10], аланин-дегидрогеназу [1.4.1.1] или глицин-дегидрогеназу [1.4.2.1]; гетерологичный фермент, способный превращать изоцитрат в глиоксилат, представляет собой изоцитрат-лиазу [4.1.3.1]; и/или гетерологичный фермент, способный превращать гликолят в гликоальдегид, представляет собой гликольальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.21], лактальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.22], сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.24], 2,5-диоксовалерат-дегидрогеназу [1.2.1.26], альдегид-дегидрогеназу [1.2.1.3/4/5], бетаин-альдегид-дегидрогеназу [1.2.1.8] или альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазу [1.2.7.5].

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, гетерологичные ферменты получают из рода, выбранного из группы, состоящей из Bacillus, Clostridium, Escherichia, Gluconobacter, Hyphomicrobium, Lysinibacillus, Paenibacillus, Pseudomonas, Sedimenticola, Sporosarcina, Streptomyces, Thermithiobacillus, Thermotoga и Zea.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, один или большее количество гетерологичных ферментов являются кодон-оптимизированными для экспрессии в микроорганизме.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм дополнительно содержит один или большее количество из: фермента, способного превращать ацетил-КоА в пируват; фермента, способного превращать пируват в оксалоацетат; фермента, способного превращать пируват в малат; фермента, способного превращать пируват в фосфенолпируват; фермента, способного превращать оксалоацетат в цитрил-КоА; фермента, способного превращать цитрил-КоА в цитрат; фермента, способного превращать цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат; фермента, способного превращать фосфоенолпируват в оксалоацетат; фермента, способного превращать фосфоенолпируват в 2-фосфо-D-глицерат; фермента, способного превращать 2-фосфо-D-глицерат в 3-фосфо-D-глицерат; фермента, способного превращать 3-фосфо-D-глицерат в 3-фосфонооксипируват; фермента, способного превращать 3-фосфонооксипируват в 3-фосфо-L-серин; фермента, способного превращать 3-фосфо-L-серин в серин; фермента, способного превращать серин в глицин; фермента, способного превращать 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин; фермента, способного превращать серин в гидроксипируват; фермента, способного превращать D-глицерат в гидроксипируват; фермента, способного превращать малат в глиоксилат; фермента, способного превращать глиоксилат в гликолят; фермента, способного превращать гидроксипируват в гликоальдегид; и/или фермента, способного превращать гликоальдегид в этиленгликоль.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм сверхэкспрессирует гетерологичный фермент, способный превращать оксалоацетат в цитрат, гетерологичный фермент, способный превращать глицин в глиоксилат, и/или гетерологичный фермент, способный превращать гликолят в гликоальдегид.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм сверхэкспрессирует фермент, способный превращать пируват в оксалоацетат, фермент, способный превращать цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат, фермент, способный превращать фосфоенолпируват в оксалоацетат, фермент, способный превращаться серин в глицин, фермент, способный превращать 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин, фермент, способный превращать глиоксилат в гликолят; и/или фермент, способный превращать гликоальдегид в этиленгликоль.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм содержит нарушающую мутацию в одном или большем количестве ферментов, выбранных из группы, состоящей из изоцитрат-дегидрогеназы, глицерат-дегидрогеназы, гликолят-дегидрогеназы, альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазы и альдегид-дегидрогеназы.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, указанный микроорганизм является представителем рода, выбранного из группы, состоящей из Acetobacterium, Alkalibaculum, Blautia, Butyribacterium, Clostridium, Eubacterium, Moorella, Oxobacter, Sporomusa и Thermoanaerobacter.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, указанный микроорганизм получают из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из Acetobacterium 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 kiuvi.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, указанный микроорганизм получают из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii и Clostridium ragsdalei.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм содержит нативный или гетерологичный путь Вуда-Льюнгдала.

В некоторых аспектах микроорганизма, раскрытого в данном документе, микроорганизм продуцирует глиоксилат или гликолят в качестве прекурсора этиленгликоля.

Изобретение дополнительно предлагает способ получения этиленгликоля или прекурсора этиленгликоля, включающий в себя культивирование микроорганизма, раскрытого в данном документе, в питательной среде и в присутствии субстрата, в результате чего микроорганизм продуцирует этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля.

В некоторых аспектах способа, раскрытого в данном документе, субстрат содержит один или большего количество из CO, CO_2 и H_2.

В некоторых аспектах способа, раскрытого в данном документе, по меньшей мере, часть субстрата представляет собой газообразные промышленные отходы, промышленный отработанный газ, или синтез-газ.

В некоторых аспектах способа, раскрытого в данном документе, микроорганизм продуцирует глиоксилат или гликолят в качестве прекурсоров этиленгликоля.

В некоторых аспектах способа, раскрытого в данном документе, способ дополнительно включает в себя отделение этиленгликоля или прекурсора этиленгликоля от питательной среды.

В некоторых аспектах способа, раскрытого в данном документе, микроорганизм дополнительно продуцирует одно или большее количество из: этанола, 2,3-бутандиола и сукцината.

Изобретение дополнительно предлагает композицию, содержащую этиленгликоль, полученный способом, описанным в данном документе. В некоторых аспектах, композиция представляет собой антифриз, консервант, дегидратирующий агент или буровой раствор.

Изобретение дополнительно предлагает полимер, содержащий этиленгликоль, полученный способом, описанным в данном документе. В некоторых аспектах, полимер представляет собой гомополимер или сополимер. В некоторых аспектах, полимер представляет собой полиэтиленгликоль или полиэтилентерефталат.

Изобретение дополнительно предлагает композицию, содержащую полимер, описанный в данном документе. В некоторых аспектах, композиция представляет собой волокно, смолу, пленку или пластик.

Эти и другие признаки и преимущества данного изобретения будут более понятны из нижеизложенного подробного описания, рассматриваемого в совокупности с прилагаемой формулой изобретения. Следует отметить, что объем формулы изобретения определяется приведенными в ней формулировками, а не конкретным рассмотрением признаков и преимуществ, изложенных в данном описании.

Краткое описание графических материалов

Следующее подробное описание вариантов осуществления данного изобретения может быть лучше понято при прочтении вместе со следующими графическими материалами, где одинаковая структура обозначена одинаковыми ссылочными цифрами и в которых:

фиг. 1 представляет собой схему, показывающую пути получения этиленгликоля, гликолята и глиоксилата из газообразного субстрата, содержащего CO, CO_2 и/или H_2;

фиг. 2A-2E представляют собой карты плазмид, использованных в примерах 1-4. Фиг. 2A - карта челночного вектора экспрессии pIPL12, как описано в примере 1. Фиг. 2B представляет собой карту плазмиды pMEG042, которая содержит цитрат-синтазу B. subtilis, изоцитрат-лиазу E.coli и гликольальдегид-дегидрогеназу G. oxydans, как описано в примере 1. Фиг. 2C представляет собой карту плазмиды pMEG058, которая содержит аланин-глиоксилат аминотрансферазу S. thiotaurini и альдегид-дегидрогеназу P. fluorescens, как описано в примере 2. Фиг. 2D представляет собой карту плазмиды pMEG059, которая содержит аланин-глиоксилат аминотрансферазу S. thiotaurini и альдегид-дегидрогеназу G. oxydans, как описано в примере 3. Фиг. 2E представляет собой карту плазмиды pMEG061, которая содержит аминотрансферазу класса V C. acidurici и альдегид-дегидрогеназу P. fluorescens, как описано в примере 4;

фиг. 3A демонстрирует уровни биомассы (г сухой массы клеток/л) C. autoethanogenum, экспрессирующей pMEG042 (клоны 1-3) или C. autoethanogenum, содержащей пустой вектор (отрицательный контроль). Фиг. 3B демонстрирует этиленгликоль, продуцируемый с течением времени в C. autoethanogenum, растущей автотрофно и несущей вектор экспрессии pMEG042, по сравнению с отрицательным контролем (пустой вектор). Фиг. 3C демонстрирует гликолят, продуцируемый с течением времени в C. autoethanogenum, растущей автотрофно и несущей вектор экспрессии pMEG042; смотрите пример 1;

фиг. 4A демонстрирует уровни биомассы (г сухой массы клеток/л) C. autoethanogenum, экспрессирующей pMEG058 (клоны 1-2) или C. autoethanogenum, содержащей пустой вектор (отрицательный контроль). Фиг. 4B демонстрирует этиленгликоль, продуцируемый с течением времени в C. autoethanogenum, растущей автотрофно и несущей вектор экспрессии pMEG058, по сравнению с отрицательным контролем (пустой вектор); смотрите пример 2;

фиг. 5A демонстрирует уровни биомассы (г сухой массы клеток/л) C. autoethanogenum, экспрессирующей pMEG059 (клоны 1-3) или C. autoethanogenum, содержащей пустой вектор (отрицательный контроль). Фиг. 5B демонстрирует этиленгликоль, продуцируемый с течением времени в C. autoethanogenum, растущей автотрофно и несущей вектор экспрессии pMEG059, по сравнению с отрицательным контролем (пустой вектор); смотрите пример 3;

фиг. 6A демонстрирует уровни биомассы (г сухой массы клеток/л) C. autoethanogenum, экспрессирующей pMEG061 (клон 1) или C. autoethanogenum, содержащей пустой вектор (отрицательный кон-

троль). Фиг. 6B демонстрирует этиленгликоль, продуцируемый с течением времени в C. autoethanogenum, растущей автотрофно и несущей вектор экспрессии pMEG061, по сравнению с отрицательным контролем (пустой вектор); смотрите пример 4.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение предлагает микроорганизмы для биологического производства этиленгликоля. "Микроорганизм" представляет собой микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или грибок. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой бактерию.

Подразумевается, что термин "не встречающийся в природе" при применении в отношении микроорганизма означает, что указанный микроорганизм имеет по меньшей мере одну генетическую модификацию, не встречающуюся в природном штамме перечисленных видов, в том числе в штаммах дикого типа перечисленных видов. Не встречающиеся в природе микроорганизмы, как правило, разрабатывают в лаборатории или исследовательском центре. Микроорганизм согласно данному изобретению не встречается в природе.

Термины "генетическая модификация", "генетическое изменение" или "генная инженерия" в широком смысле относятся к манипулированию геномом или нуклеиновыми кислотами микроорганизма руками человека. Аналогичным образом, термины "генетически модифицированный", "генетически измененный" или "генно-инженерный" относятся к микроорганизму, содержащему такие генетические модификации, генетические изменения или генно-инженерные элементы. Эти термины можно использовать для дифференциации полученного в лаборатории микроорганизма от микроорганизма, встречающегося в природе. Способы генетической модификации включают в себя, например, экспрессию гетерологичного гена, вставку или делецию гена или промотора, мутацию нуклеиновой кислоты, измененную экспрессию гена или инактивацию, ферментную инженерию, направленную эволюцию, конструирование на основе существующих знаний, способы случайного мутагенеза, генную перетасовку и оптимизацию кодонов. Микроорганизмы согласно данному изобретению являются генетически сконструированными.

"Рекомбинантный" означает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм является продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. В целом, термин "рекомбинантный" относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит или кодируется генетическим материалом, полученным из множества источников, например двух или большего количества различных штаммов или видов микроорганизмов. Микроорганизмы согласно данному изобретению в целом являются рекомбинантными.

"Дикий тип" относится к обычной форме организма, штамма, гена или характеристики, как они встречаются в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

"Эндогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует или экспрессируется в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого получают микроорганизм согласно данном изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который нативно присутствует в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого получают микроорганизм согласно данному изобретению. В одном варианте осуществления, экспрессию эндогенного гена можно контролировать с помощью экзогенного регуляторного элемента, например, экзогенного промотора.

"Экзогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который происходит из вне микроорганизма согласно данному изобретению. Например, экзогенный ген или фермент может быть создан искусственно или рекомбинантно, и введен в или экспрессирован в микроорганизме согласно данному изобретению. Экзогенный ген или фермент также может быть выделен из гетерологичного микроорганизма, и введен в или экспрессирован в микроорганизме согласно данному изобретению. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы для интеграции в геном микроорганизма согласно данному изобретению, или для сохранения в внехромосомном состоянии в микроорганизме согласно данному изобретению, например, в плазмиде.

"Гетерологичный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который отсутствует в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого получают микроорганизм согласно данному изобретению. Например, гетерологичный ген или фермент может быть получен из отличающегося штамма или видов, и введен в или экспрессирован в микроорганизме согласно данному изобретению. Гетерологичный ген или фермент может быть введен или экспрессирован в микроорганизме согласно данному изобретению в той форме, в которой он встречается в разных штаммах или видах. В альтернативном варианте, гетерологичный ген или фермент может быть модифицирован каким-либо образом, например, путем оптимизации его кодонов для экспрессии в микроорганизме согласно данному изобретению или путем его конструирования для изменения функции, например для изменения направления активности фермента или изменения субстратной специфичности.

В частности, гетерологичная нуклеиновая кислота или белок, экспрессируемый в микроорганизме, описанном в данном документе, может быть получен из Bacillus, Clostridium, Escherichia, Gluconobacter, Hyphomicrobium, Lysinibacillus, Paenibacillus, Pseudomonas, Sedimenticola, Sporosarcina, Streptomyces, Thermithiobacillus, Thermotoga, Zea, Klebsiella, Mycobacterium, Salmonella, Mycobacteroides, Staphylococcus, Burkholderia, Listeria, Acinetobacter, Shigella, Neisseria, Bordetella, Streptococcus, Enterobacter, Vibrio,

Legionella, Xanthomonas, Serratia, Cronobacter, Cupriavidus, Helicobacter, Yersinia, Cutibacterium, Francisella, Pectobacterium, Arcobacter, Lactobacillus, Shewanella, Erwinia, Sulfurospirillum, Peptococcaceae, Thermococcus, Saccharomyces, Pyrococcus, Glycine, Homo, Ralstonia, Brevibacterium, Methylobacterium, Geobacillus, bos, gallus, Anaerococcus, Xenopus, Amblyrhynchus, rattus, mus, sus, Rhodococcus, Rhizobium, Megasphaera, Mesorhizobium, Peptococcus, Agrobacterium, Campylobacter, Acetobacterium, Alkalibaculum, Blautia, Butyribacterium, Eubacterium, Moorella, Oxobacter, Sporomusa, Thermoanaerobacter, Schizosaccharomyces, Paenibacillus, Fictibacillus, Lysinibacillus, Ornithinibacillus, Halobacillus, Kurthia, Lentibacillus, Anoxybacillus, Solibacillus, Virgibacillus, Alicyclobacillus, Sporosarcina, Salimicrobium, Sporosarcina, Planococcus, Corynebacterium, Thermaerobacter, Sulfobacillus, или Symbiobacterium.

Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру, и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определенные при анализе сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (киРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микро-РНК (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 большее количество модифицированных нуклеотидов, например, метилированных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов. Модификации нуклеотидной структуры (при их наличии) можно внедрить до или после сборки полимера. Нуклеотидную последовательность можно прерывать ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, например, путем конъюгирования с метящим компонентом.

Как применяется в данном документе, "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт) и/или процессу, посредством которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды, или белки. Транскрипты и закодированные полипептиды могут быть совокупности называны "генными продуктами".

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения аминокислотных полимеров любой длины. Полимер может быть 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, ацетилированием, фосфорилированием или любой другой манипуляцией, например, конъюгированием с метящим компонентом. Как применяется в данном документе, термин "аминокислота" включает в себя 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.

"Ферментативная активность" или просто "активность" в широком смысле относится к ферментативной активности, включая активность фермента, количество фермента или доступность фермента, необходимого для катализа реакции, но не ограничиваясь лишь этими. Соответственно, "увеличение" ферментативной активности включает в себя увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или повышение доступности фермента, необходимого для катализа реакции. Аналогичным образом, "уменьшение" ферментативной активности включает в себя уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента, необходимого для катализа реакции.

"Мутированный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, модифицированным в микроорганизме согласно данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или исходным микроорганизмом, от которого происходит микроорганизм согласно данному изобретению. В одном варианте осуществления, мутация может представлять собой делецию, инсерцию или замену в гене, кодирующем фермент. В еще одном варианте осуществления, мутация может представлять собой делецию, инсерцию или замену одной или большего количества аминокислот в ферменте.

"Исходный микроорганизм" представляет собой микроорганизм, используемый для получения микроорганизма согласно данному изобретению. Исходный микроорганизм может являться природным микроорганизмом (т.е. микроорганизмом дикого типа) или предварительно модифицированным микроорганизмом (т.е. мутантным или рекомбинантным микроорганизмом). Микроорганизм согласно данному изобретению может быть модифицирован с целью экспрессии или сверхэкспрессии одного или большего количества ферментов, не экспрессируемых или сверхэкспрессируемых в исходном микроорганизме. Подобным образом микроорганизм согласно изобретению может быть модифицирован, чтобы содержать один или большее количество генов, которые не содержались в исходном микроорганизме. Микроорганизм согласно данному изобретению также может быть модифицирован, чтобы не экспрессировать или экспрессировать меньшие количества одного или большего количества ферментов, которые были экспрессированы в исходном микроорганизме.

Микроорганизм согласно данному изобретению может быть получен по существу из любого исходного микроорганизма. В одном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению может быть получен из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Escherichia coli, и Saccharomyces cerevisiae. В других вариантах осуществления, микроорганизм получают из исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из Acetobacterium woodii, Alkalibaculum bacchii, Blautia product, 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 kiuvi. В предпочтительном варианте осуществления, исходный микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, или Clostridium ragsdalei. В предпочтительном варианте осуществления, исходный микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum LZ1561, внесенный 7 июня 2010 г. в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)), расположенную по адресу Inhoffenstraß 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 7 июня 2010 г. в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры под номером доступа DSM23693. Этот штамм описан в международной заявке на патент № PCT/NZ2011/000144, опубликованной как WO 2012/015317.

Термин "происходит от" означает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицированы или адаптированы из другой (например, исходной или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма, с целью получения новой нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации обычно включают в себя вставку, делецию, мутацию или замену нуклеиновых кислот или генов. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению происходит от исходного микроорганизма. В одном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению происходит от Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению происходит от Clostridium autoethanogenum LZ1561, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM23693.

Микроорганизм согласно данному изобретению можно дополнительно классифицировать на основе функциональных характеристик. Например, микроорганизм согласно данному изобретению может представлять собой или может быть получен из С1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа.

В табл. 1 приведен типичный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

	Вуда-Льюнгдаля	С1-фиксирующий микроорганизм	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Автотроф	Карбоксидотроф
Acetobacterium woodii	+	+	+	+	+/- [1]	+	-
Alkalibaculum bacchii	+	+	+	+	+	+	+
Blautia producta	+	+	+	+	-	+	+
Butyribacterium methylotrophicum	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium aceticum	+	+	+	+	-	+	+
Clostridium autoethanogenum	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium carboxidivorans	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium coskatii	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium drakei	+	+	+	+	-	+	+
Clostridium formicoaceticum	+	+	+	+	-	+	+
Clostridium ljungdahlii	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium magnum	+	+	+	+	-	+	+/- [2]
Clostridium ragsdalei	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium scatologenes	+	+	+	+	-	+	+
Eubacterium limosum	+	+	+	+	-	+	+
Moorella thermautotrophica	+	+	+	+	+	+	+
Moorella thermoacetica (ранее *Clostridium thermoaceticum*)	+	+	+	+	- [3]	+	+
Oxobacter pfennigii	+	+	+	+	-	+	+
Sporomusa ovata	+	+	+	+	-	+	+/- [4]
Sporomusa silvacetica	+	+	+	+	-	+	+/- [5]
Sporomusa sphaeroides	+	+	+	+	-	+	+/- [6]
Thermoanaerobacter kiuvi	+	+	+	+	-	+	-

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

[2] Не было исследовано, можно ли выращивать Clostridium magnum на CO.

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

[4] Не было исследовано, можно ли выращивать Sporomusa ovata на CO.

[5] Не было исследовано, можно ли выращивать Sporomusa silvacetica на CO.

[6] Не было исследовано, можно ли выращивать Sporomusa sphaeroides на CO.

"Вуда-Льюнгдаля" относится к пути фиксации углерода Вуда-Льюнгдаля, описанном, например, в Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784: 1873-1898, 2008. "Микроорганизмы Вуда-Льюнгдала", ожидаемо, относятся к микроорганизмам, содержащим путь Вуда-Льюнгдала. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению содержит нативный путь Вуда-Льюнгдаля. В данном документе, путь Вуда-Льюнгдала может быть нативным, немодифицированным путем Вуда-Льюнгдала, или может быть путем Вуда-Льюнгдала с некоторой степенью генетической модификации (например, сверхэкспрессией, гетерологичной экспрессией, нокаутом и т.д.), пока он используется для преобразования CO, CO_2 и/или H_2 в ацетил-КоА.

"C1" относится к молекуле, содержащей один атом углерода, например, CO, CO_2, CH_4 или CH_3OH. "C1-оксигенат" относится к одноуглеродной молекуле, которая также содержит, по меньшей мере, один атом кислорода, например, CO, CO_2 или CH_3OH. "Источник C1-углерода" относится к одноуглеродной молекуле, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма согласно данному изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать одно или большее количество из: CO, CO_2, CH_4, CH_3OH или CH_2O_2. Источник C1-углерода предпочтительно содержит одно или большее количество из: CO и CO_2. "C1-фиксирующий микроорганизм" представляет собой микроорганизм, способный продуцировать один или большее количество продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. Согласно предпочтительному варианту осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению получают из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в табл. 1.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Анаэроб может реагировать негативно или даже умереть при наличии кислорода выше определенного порога. Тем не менее, некоторые анаэробы способны переносить низкие уровни кислорода (например, 0,000001-5% кислорода), иногда называемые "микрооксидными условиями". Часто микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой анаэроб. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению получают из анаэроба, приведенного в табл. 1.

"Ацетогены" представляют собой облигатно-анаэробные бактерии, использующие путь Вуда-Льюнгдаля в качестве их основного механизма для сохранения энергии и синтеза ацетил-КоА и продуктов, полученных из ацетил-КоА, например, ацетата (Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784: 1873-1898, 2008). В частности, ацетогены используют путь Вуда-Льюнгдала как (1) механизм для восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO_2, (2) терминальный электроноакцепторный, энергосберегающий процесс, (3) механизм для фиксации (ассимиляции) CO_2 при синтезе клеточного углерода (Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: The Prokaryotes, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все встречающиеся в природе ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, автотрофными и неметанотрофными организмами. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению получают из ацетогена, приведенного в табл. 1.

"Этанологен" представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой этанологен. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению получают из этанологена, приведенного в табл. 1.

"Автотроф" представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют неорганические источники углерода, такие как CO и/или CO_2. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой автотроф. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению получают из автотрофа, приведенного в табл. 1.

"Карбоксидотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода и энергии. Как правило, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой карбоксидотроф. В предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению получают из карбоксидотрофа, приведенного в табл. 1.

"Метанотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Согласно определенным вариантам осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой метанотроф, или получен из метанотрофа. Согласно другим вариантам осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению не является метанотрофом или не получен из метанотрофа.

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

Перечисленные три вида имеют много похожих свойств. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода Clostridium. Такие виды имеют аналогичные генотипы и фенотипы, и способы сохранения энергии

и ферментативного метаболизма. Кроме того, эти виды объединены в кластер гомологичной группы I клостридиальной рРНК, причем их ДНК 16S рРНК идентична больше чем на 99%, содержание G + C в ДНК составляет около 22-30% мол.%, они грамположительны, характеризуются схожей морфологией и размером (размер логарифмически растущих клеток находится в интервале между 0,5-0,7 × 3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальный рост при температуре 30-37°C), характеризуются схожими 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 имеют целый ряд различий. Эти виды были выделены из разных источников: Clostridium autoethanogenum - из кишечника кролика, Clostridium ljungdahlii - из отходов курятников и Clostridium ragsdalei - из пресноводных осадочных отложений. 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). Эти виды имеют различия в последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислот генов и белков пути Вуда-Льюнгдаля, хотя, как было обнаружено, общая организация и количество этих генов и белков одинаковы у всех видов (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011).

Таким образом, в заключении, многие из характеристик Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei не являются специфическими для этого вида, но представляют собой достаточно общие характеристики для этого кластера C1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных членов рода Clostridium. Однако, поскольку в действительности эти виды отличаются, генетическая модификация или манипулирование одним из этих видов может не иметь идентичного эффекта в другом из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

Микроорганизм согласно данному изобретению также может быть получен из изолята или мутанта Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei. Изоляты и мутанты Clostridium autoethanogenum включают в себя JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693) (WO 2012/015317). Изоляты и мутанты Clostridium ljungdahlii включают в себя ATCC 49587 (Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (US 5593886), C-01 (ATCC 55988) (US 6368819), 0-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using Clostridium ljungdahlii, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и мутанты Clostridium ragsdalei включают в себя PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Однако, в одном варианте осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению может также быть получен из по существу любого исходного микроорганизма, такого как исходный микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Escherichia coli, и Saccharomyces cerevisiae.

Изобретение предлагает микроорганизмы, способные продуцировать этиленгликоль, глиоксилат и гликолят, а также способы получения этиленгликоля, глиоксилата и гликолата, включающие в себя культивирование микроорганизма согласно данному изобретению в присутствии субстрата, посредством чего микроорганизм продуцирует этиленгликоль.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает ацетил-КоА, например ацетил-КоА, продуцируемое в пути Вуда-Люнгдала, в пируват (реакции 1 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой пируватсинтазу (PFOR) [1.2.7.1] или АТФ:пируват, ортофосфат-фосфотрансферазу [1.2.7.1]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает пируват в оксалоацетата (реакция 2 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой пируват:диоксид-лигазу [АДФ-образующая] [6.4.1.1]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает пируват в оксалоацетат, является эндогенным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает пируват в оксалоацетат.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает оксалоацетат в цитрил-КоА (реакция 3 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой цитрил-КоА-лиазу [4.1.3.34]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает оксалоацетат в цитрил-КоА, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает цитрил-КоА в цитрат (реакция 4 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой цитрат-КоА-трансферазу [2.8.3.10]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает цитрил-КоА в цитрат, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат (реакция 5 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой цитрат [Si]-синтазу [2.3.3.1], АТФ-цитрат-синтазу [2.3.3.8], или цитрат (Re)-синтазу [2.3.3.3]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат, является эндогенным ферментом. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат, представляет собой гетерологичный фермент. Например, в некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит цитрат-синтазу 1 [EC 2.3.3.16] из B. subtilis, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит цитратную (Re)-синтазу из C. kluyveri, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит цитрат (Si)-синтазу из Clostridium sp., так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит цитрат-синтазу 2 из B. subtilis, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат (реакции 6 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой аконитат-гидратазу [4.2.1.3]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат является эндогенным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат (реакция 7 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой изоцитратлиазу [4.1.3.1]. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит изоцитратлиазу из Z. mays, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит изоцитратлиазу из E. coli, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который преобразует глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой глицерат-дегидрогеназу [1.1.1.29], глиоксилат-редуктазу [1.1.1.26/79] или гликолят-дегидрогеназу [1.1.99.14]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает глиоксилат в гликолят, является эндогенным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает глиоксилат в гликолят.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который преобразует гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.21], лактальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.22], сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.24], 2,5-диоксовалерат-дегидрогеназу [1.2.1.26], альдегид-дегидрогеназу [1.2.1.3/4/5], бетаин-альдегид-дегидрогеназу [1.2.1.8] или альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазу [1.2.7.5]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, является эндогенным ферментом. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, является гетерологичным ферментом. Например, в некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит гамма-аминобутиральдегид-дегидрогеназу из E. coli, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит альдегид-дегидрогеназу из E. coli, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит НАДФ-зависимую сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназу I из E. coli, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит лактальдегид-дегидрогеназу/гликольаль дегид-дегидрогеназу из G. oxydans, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобре-

тению содержит альдегид-дегидрогеназу A из P. fluorescens, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 59, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 60, соответственно. Дополнительные не ограничивающие примеры ферментов, которые превращают гликолят к гликоальдегид могут быть найдены в номерах доступа GenBank: WP_003202098, WP_003182567, ACT39044, ACT39074, WP_041112005 и ACT40170. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой лактальдегид-редуктазу [1.1.1.77], алкоголь-дегидрогеназу [1.1.1.1], алкоголь-дегидрогеназу (НАДФ+) [1.1.1.2], глицерол-дегидрогеназу [1.1.1.72], глицерол-3-фосфатдегидрогеназу [1.1.1.8] или альдегидредуктазу [1.1.1.21]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль, является эндогенным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют эндогенный фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль, является гетерологичным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит лактальдегид-редуктазу из C. saccharoperbutylacetonicum, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит лактальдегид-редуктазу из C. ljungdahlii, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит лактальдегид-редуктазу из E. coli, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит лактальдегид-редуктазу из C. beijerinckii, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют гетерологичный фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает пируват в малат (реакция 11 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой малат-дегидрогеназу [1.1.1.37], малат-дегидрогеназу (оксалоацетат-декарбоксилирующую) [1.1.1.38], малат-дегидрогеназу (декарбоксилирующую) [1.1.1.39], малат-дегидрогеназу (оксалоацетат-декарбоксилирующую) (НАДФ+) [1.1.1.40], малат-дегидрогеназу (НАДФ+) [1.1.1.82], D-малат-дегидрогеназу (декарбоксилирующую) [1.1.1.83], диметил-малат-дегидрогеназу [1.1.1.84], 3-изопропил-малат-дегидрогеназу [1.1.1.85], малат-дегидрогеназу [НАД(Ф)+] [1.1.1.299] или малат-дегидрогеназу (хинон) [1.1.5.4]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает пируват в малат, является эндогенным ферментом. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает пируват в малат, является гетерологичным ферментом. Например, в некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-дегидрогеназу из C. autoethanogenum, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит НАД-зависимый малатный фермент из C. autoethanogenum, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который преобразует малат к глиоксилат (реакция 12 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой малат-синтазу [2.3.3.9] или изоцитратлиазу [4.1.3.1]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает малат в глиоксилат, является гетерологичным ферментом. Например, в некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу G из Sporosarcina sp., так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 33, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 34, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу G из Bacillus sp., так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 35, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 36, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу из S. coelicolor, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу G из B. infantis, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последо-

вательность, представленную в SEQ ID NO: 37, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу из C. cochlearium, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу G из B. megaterium, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малатсинтазу из Paenibacillus sp., так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малатсинтазу из Lysinibacillus sp., так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит малат-синтазу из B. cereus, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват (реакции 13 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой пируваткиназу [2.7.1.40], пируват фосфатдикиназу [2.7.9.1], или пируват водную дикиназу [2.7.9.2]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает фосфоенолпируват в 2-фосфо-D-глицерат (реакция 14 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой фосфопируват-гидратазу [4.2.1.11]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает фосфоенолпируват в 2-фосфо-D-глицерат, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает 2-фосфо-D-глицерат в 3-фосфо-D-глицерат (реакция 15 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой фосфоглицерат-мутазу [5.4.2.11/12]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает 2-фосфо-D-глицерат в 3-фосфо-D-глицерат, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает 3-фосфо-D-глицерат в 3-фосфонооксипируват (реакция 16 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой фосфоглицерат-дегидрогеназу [1.1.1.95]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает 3-фосфо-D-глицерат в 3-фосфонооксипируват, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает 3-фосфонооксипируват в 3-фосфо-L-серин (реакция 17 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой фосфосерин-трансаминазу [2.6.1.52]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает 3-фосфонооксипируват в 3-фосфо-L-серин, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает 3-фосфо-L-серин в серин (реакция 18 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой фосфосерин-фосфатазу [3.1.3.3]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает 3-фосфо-L-серин в серин, является эндогенным ферментом.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает серин в глицин (реакция 19 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой глицин-гидроксиметил-трансферазу [2.1.2.1]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает серин в глицин, является эндогенным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает серин в глицин.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает глицин к глиоксилат (реакция 20 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой аланин-глиоксилат аминотрансферазу/трансаминазу [2.6.1.44], серин-глиоксилат аминотрансферазу/трансаминазу [2.6.1.45], серин-пируват аминотрансферазу/трансаминазу [2.6.1.51], глицин-оксалоацетат аминотрансферазу/трансаминазу [2.6.1.35], глицин-трансаминазу [2.6.1.4], глицин-дегидрогеназу [1.4.1.10], аланин-дегидрогеназу [1.4.1.1] или глицин-дегидрогеназу [1.4.2.1]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает глицин в глиоксилат, является эндогенным ферментом. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает глицин в глиоксилат, является гетерологичным ферментом. Например, в некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит серин-глиоксилат аминотрансферазу из H. methylovorum, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит аланин-глиоксилат аминотрансферазу из S. thiotaurini, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 15, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит аланин-глиоксилат аминотрансферазу из T. tepidarius, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит аминотрансферазу класса V из C. acidurici, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит серин-пируват аминотрансферазу из T. maritima, так что микроорганизм содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает глицин в глиоксилат.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает серин в гидроксипируват (реакция 21 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой серин-пируват-трансаминазу [2.6.1.51], серин-глиоксилат-трансаминазу [2.6.1.45], аланин-дегидрогеназу [1.4.1.1], L-аминокислотную дегидрогеназу [1.4.1.5], серин-2-дегидрогеназу [1.4.1.7], аланину-трансаминазу [2.6.1.2], глутамин-пируват-трансаминазу [2.6.1.15], D-аминокислотную трансаминазу [2.6.1.21], аланин-глиоксилат-трансаминазу [2.6.1.44], или серин-пируват-трансаминазу [2.6.1.51]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает серин в гидроксипируват, является эндогенным ферментом. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает серин в гидроксипируват, является гетерологичным ферментом. Неограничивающие примеры ферментов, способных превращать серин в гидроксипируват, могут быть найдены под номерами доступа GenBank: WP_009989311 и NP_511062.1. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает серин в гидроксипируват.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает гидроксипируват в гликоальдегид (реакция 22 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой гидроксипируват-декарбоксилазу [4.1.1.40] или пируват-декарбоксилазу [4.1.1.1]. Этот фермент также может представлять собой любую другую декарбоксилазу [4.1.1.-]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает гидроксипируват в гликоальдегид, является гетерологичным ферментом. Неограничивающие примеры ферментов, способных превращать гидроксипируват в гликоальдегид могут быть найдены под номерами доступа GenBank: CCG28866, SVF98953, PA0096, CAA54522, KRU13460 и KLA26356.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает D-глицерат к гидроксипируват (реакция 23 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой глиоксилат-редуктазу [EC 1.1.1.26], глицерат-дегидрогеназу [EC 1.1.1.29], или гидроксипируват-редуктазу [EC 1.1.1.81]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает D-глицерат в гидроксипируват, является гетерологичным ферментом. Неограничивающие примеры ферментов, способных превращать D-глицерат в гидроксипируват могут быть найдены под номерами доступа GenBank: SUK16841, RPK22618, KPA02240, AGW90762, CAC11987, Q9CA90 и Q9UBQ7.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать комплекс ферментов, который превращает 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин (реакция 24 фиг. 1). 5,10-метилентетрагидрофолат является кофактором в восстановительной ветви пути Вуда-Льюнгдаля и выступает в качестве каркаса при производстве ацетил-КоА. Этот комплекс может представлять собой систему расщепления глицина, включающую в себя глициндегидрогеназу [1.4.4.2], дигидро-липоил-дегидрогеназу [1.8.1.4] и аминометил-трансферазу (глицинсинтазу) [2.1.2.10]. В некоторых вариантах осуществления, ферменты комплекса, который превращает 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин, являются эндогенными ферментами. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют ферменты системы расщепления глицином.

Микроорганизм согласно данному изобретению может содержать фермент, который превращает фосфоенолпируват в оксалоацетат (реакция 25 фиг. 1). Этот фермент может представлять собой фосфоенол-пируват-карбоксикиназу (АТФ) [4.1.1.49] или (ГТФ) [4.1.1.32]. В некоторых вариантах осуществления, фермент, который превращает фосфоенолпируват в оксалоацетат, является эндогенным ферментом. В других вариантах осуществления, фермент, который превращает фосфоенолпируват в оксалоацетат, является гетерологичным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, сверхэкспрессируют фермент, который превращает фосфоенолпируват в оксалоацетат.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в оксалоацетат (реакция 2 фиг. 1), фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат (реакция 5 фиг. 1), фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат (реакция 6 фиг. 1), фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат (реакция 7 фиг. 1), фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. В неогра-

ничивающем примере, фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат, может представлять собой цитрат-синтазу из B. subtilis (SEQ ID NO: 1-2). В неограничивающем примере, фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат, может представлять собой изоцитратлиазу из E. coli (SEQ ID NO: 11-12). В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликоль-альдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58). Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 2, 5, 6, 8, 9 и 10, как показано на фиг. 1; смотрите, например, пример 1 и фиг. 3B.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват (реакция 13 фиг. 1), фермент, который превращает фосфоенолпируват в 2-фосфо-D-глицерат (реакция 14 фиг. 1), фермент, который превращает 2-фосфо-D-глицерат в 3-фосфо-D-глицерат (реакция 15 фиг. 1), фермент, который превращает 3-фосфо-D-глицерат в 3-фосфонооксипируват (реакция 16 фиг. 1), фермент, который превращает 3-фосфонооксипируват в 3-фосфо-L-серин (реакция 17 фиг. 1), фермент, который превращает 3-фосфо-L-серин в серин (реакция 18 фиг. 1), фермент, который превращает серин в глицин (реакция 19 фиг. 1), фермент, который превращает глицин в глиоксилат (реакция 20 фиг. 1), фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. В неограничивающем примере, фермент, который превращает глицин в глиоксилат, может представлять собой аланин-глиоксилат-аминотрансферазу из S. thiotaurini (SEQ ID NO: 15-16) или аминотрансферазу класса V из C. acidurici (SEQ ID NO: 19-20). В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58). Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 19, 20, 8, 9 и 10, как показано на фиг. 1; смотрите, например, примеры 2-4 и фиг. 4B, 5B и 6B.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в оксалоацетат (реакция 2 фиг. 1), фермент, который превращает оксалоацетат в цитрил-КоА (реакция 3 фиг. 1), фермент, который превращает цитрил-КоА в цитрат (реакция 4 фиг. 1), фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат (реакция 6 фиг. 1), фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат (реакция 7 фиг. 1) фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. В неограничивающем примере, фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат, может представлять собой изоцитратлиазу из E. coli (SEQ ID NO: 11-12). В неограничивающем примере, фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат, может представлять собой изоцитратлиазу из E. coli (SEQ ID NO: 11-12). В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58).

Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 2, 6, 8, 9 и 10, как показано на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в малат (реакция 11 фиг. 1), фермент, который превращает малат в глиоксилат (реакция 12 фиг. 1), фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1) производит этиленгликоль. В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58). Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 8, 9 и 10, как показано на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий комплекс ферментов, который превращает 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин (реакция 24 фиг. 1), фермент, который превращает глицин в глиоксилат (реакция 20 фиг. 1), фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. В неограничивающем примере, фермент, который превращает глицин в глиоксилат, может представлять собой аланин-глиоксилат-аминотрансферазу из S. thiotaurini (SEQ ID NO: 15-16) или аминотрансферазу класса V из C. acidurici (SEQ ID NO: 19-20). В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58). Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 8, 9, 10, 20 и 24.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват (реакция 13 фиг. 1), фермент, который превращает фосфоенолпируват в оксалоацетат (реакция 25 фиг. 1), фермент, который превращает оксалоацетат в цитрил-КоА (реакция 3 фиг. 1), фермент, который превращает цитрил-КоА в цитрат (реакция 4 фиг. 1), фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат (реакции 6 фиг. 1), фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат (реакция 7 фиг. 1), фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. В неограничивающем примере, фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат, может представлять собой изоцитратлиазу из E. coli (SEQ ID NO: 11-12). В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58). Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 2, 6, 8, 9, 10 и 25, как показано на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват (реакция 13 фиг. 1), фермент, который превращает фосфоенолпируват в оксалоацетат (реакция 25 фиг. 1), фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат (реакция 5 фиг. 1), фермент, который превращает цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат (реакции 6 фиг. 1), фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат (реакция 7 фиг. 1), фермент, который превращает глиоксилат в гликолят (реакция 8 фиг. 1), фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид (реакция 9 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. В неограничивающем примере, фермент, который превращает оксалоацетат в цитрат, может представлять собой цитрат-синтазу из B. subtilis (SEQ ID NO: 1-2). В неограничивающем примере, фермент, который превращает изоцитрат в глиоксилат, может представлять собой изоцитратлиазу из E. coli (SEQ ID NO: 11-12). В неограничивающем примере, фермент, который превращает гликолят в гликоальдегид, может представлять собой гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (SEQ ID NO: 55-56) или альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens (SEQ ID NO: 57-58). Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов, катализирующих реакции 5, 6, 8, 9, 10 и 25, как показано на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает ацетил-КоА в пируват (реакция 1 фиг. 1), фермент, который превращает пируват в фосфоенолпируват (реакция 13 фиг. 1), фермент, который превращает фосфоенолпируват в 2-фосфо-D-глицерат (реакция 14 фиг. 1), фермент, который превращает 2-фосфо-D-глицерат в 3-фосфо-D-глицерат (реакция 15 фиг. 1), фермент который превращает 3-фосфо-D-глицерат в 3-фосфонооксипируват (реакция 16 фиг. 1), фермент, который превращает 3-фосфонооксипируват в 3-фосфо-L-серин (реакция 17 фиг. 1), фермент, который превращает 3-фосфо-L-серин в серин (реакция 18 фиг. 1), содержит фермент, который превращает серин в гидроксипируват (реакция 21 фиг. 1), фермент, который превращает гидроксипируват в гликоальдегид (реакция 22 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), продуцирует этиленгликоль. Может быть сверхэкспрессирован фермент, катализирующий превращение гликоальдегида в этиленгликоль.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм, содержащий фермент, который превращает D-глицерат в гидроксипируват (реакция 23 фиг. 1), фермент, который превращает гидроксипируват в гликоальдегид (реакция 22 фиг. 1), и фермент, который превращает гликоальдегид в этиленгликоль (реакция 10 фиг. 1), производит этиленгликоль. Может быть сверхэкспрессирован фермент, катализирующий превращение гликоальдегида в этиленгликоль.

Ферменты согласно данному изобретению могут быть кодон-оптимизированными для экспрессии в микроорганизме согласно данному изобретению. "Оптимизация кодонов" относится к мутации нуклеиновой кислоты, например, гена, с целью оптимизированной или улучшенной трансляции нуклеиновой кислоты в конкретном штамме или видах микроорганизмов. Оптимизация кодонов может привести к увеличенным скоростям трансляции или более высокой точности трансляции. В предпочтительном варианте осуществления, гены согласно данному изобретению являются кодон-оптимизированными для экспрессии в микроорганизме согласно данному изобретению. Хотя оптимизация кодонов относится к лежащей в основе генетической последовательности, оптимизация кодонов часто приводит к улучшению трансляции и, таким образом, к улучшению экспрессии фермента. Соответственно, ферменты согласно данному изобретению также могут быть описаны как оптимизированные по кодонам.

Могут быть сверхэкспрессированы один или большее количество ферментов согласно данному изобретению. "Сверхэкспрессируемый" относится к увеличению экспрессии нуклеиновой кислоты или белка в микроорганизме согласно данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или исходным микроорганизмом, от которого происходит микроорганизм согласно данному изобретению. Сверхэкспрессии можно достичь любыми способами, известными в данной области техники, включая изменение количества копий гена, скорости транскрипции гена, скорости трансляции гена или скорости разрушения фермента. Как описано выше, один или большее количество ферментов, катализирую-

щих реакции 2, 5, 6, 8, 9, 10, 19, 20, 24 или 25 на фиг. 1, могут быть сверхэкспрессированы.

Ферменты согласно данному изобретению могут содержать нарушающие мутации. В частности, "нарушающая мутация" относиться к мутации, которая уменьшает или подавляет (т.е., "нарушает") экспрессию или активность гена или фермента. Нарушающая мутация может частично деактивировать, полностью деактивировать, или удалить ген или фермент. Нарушающая мутация может представлять собой нокаутную (KO) мутацию. Нарушающая мутация может представлять собой любую мутацию, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, продуцируемого ферментом. Нарушающая мутация может включать в себя, например, мутацию в гене, кодирующем фермент, мутацию в генетическом регуляторном элементе, вовлеченном в экспрессию гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, который уменьшает или ингибирует активность фермента, или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК, CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Нарушающая мутация может быть внесена с использованием любого способа, известного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит нарушающую мутацию в изоцитрат-дегидрогеназе [1.1.1.41]. Изоцитрат-дегидрогеназа превращает изоцитрат в 2-оксоглутарат. Нарушение изоцитрат-дегидрогеназы, например, путем удаления изоцитрат-дегидрогеназы, приводит к повышению уровней изоцитрата.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит нарушающую мутацию в глицерат-дегидрогеназе [1.1.1.29]. Глицерат-дегидрогеназа превращает глиоксилат в гликолят. Нарушение глицерат-дегидрогеназы, например, путем удаления изоцитрат-дегидрогеназы, приводит к повышению уровней глиоксилата.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит нарушающую мутацию в гликолят-дегидрогеназе [1.1.99.14]. Гликолят-дегидрогеназа превращает глиоксилат в гликолят. Нарушение гликолят-дегидрогеназы, например, путем удаления гликолят-дегидрогеназы, приводит к повышению уровня глиоксилата.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит нарушающую мутацию в альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазе [1.2.7.5]. Альдегид-ферредоксин-оксидоредуктаза превращает гликолят в гликоальдегид. Нарушение альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазы, например, путем удаления альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазы, приводит к повышению уровня гликолята.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению содержит нарушающую мутацию в альдегид-дегидрогеназе [1.2.1.3/1.2.3.4/1.2.3.5]. Альдегид-дегидрогеназа превращает гликолят в гликоальдегид. Нарушение альдегид-дегидрогеназы, например, путем удаления альдегид-дегидрогеназы, приводит к повышению уровня гликолята.

Внесение нарушающей мутации дает в результате микроорганизм согласно данному изобретению, который продуцирует нецелевой продукт, или по существу нецелевой продукт, или уменьшенное количество целевого продукта, по сравнению с исходным микроорганизмом, из которого получают микроорганизм согласно данному изобретению. Например, микроорганизм согласно данному изобретению может продуцировать нецелевой продукт или, по меньшей мере, около на 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% меньше целевого продукта, чем исходный микроорганизм. Например, микроорганизм согласно данному изобретению может продуцировать меньше чем около 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 или 1,0 г/л целевого продукта.

Хотя в данном документе приведены иллюстративные последовательности и источники для ферментов, изобретение никоим образом не ограничивается этими последовательностями и источниками - оно также охватывает варианты. Термин "варианты" включает в себя нуклеиновые кислоты и белки, чья последовательность разниться с последовательностью исходной нуклеиновой кислоты и белка, например, последовательностью исходной нуклеиновой кислоты и белка, раскрытой в предшествующем уровне техники, или приведенной в качестве примера в данном документе. Данное изобретение может быть осуществлено на практике с использованием вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по существу ту же функцию, что и исходная нуклеиновая кислота или белок. Например, вариант белка может выполнять по существу ту же функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и исходный белок. Вариант гена может кодировать тот же или по существу тот же белок, что и исходный ген. Вариант промотора может обладать по существу такой же способностью стимулировать экспрессию одного или большего количества генов, что и исходный промотор.

Такие нуклеиновые кислоты или белки в данном документе могут называться "функционально эквивалентными вариантами". Например, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать в себя аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и т.п. 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 общедоступна на таких веб-сайтах, как Genbank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты также включают в себя нуклеиновые кислоты, последовательность которых изменяется в результате оптимизации кодонов для

конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно будет иметь по меньшей мере примерно 70%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 98% или больше идентичности последовательности нуклеиновой кислоты (процент гомологии) с исходной нуклеиновой кислотой. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно будет иметь по меньшей мере примерно 70%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 98% или больше идентичности аминокислотной последовательности (процент гомологии) с эталонным белком. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с использованием любого способа, известного в данной области техники.

Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм согласно данному изобретению с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде чистых нуклеиновых кислот, или могут быть приготовлены с одним или большим количеством агентов, например, липосомами. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК или их комбинации, по необходимости. В определенных вариантах осуществления, могут быть использованы ингибиторы ограничения. Дополнительные векторы могут включать в себя плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм согласно данному изобретению с использованием плазмиды. Например, преобразование (включая трансдукцию или трансфекцию) может быть достигнуто посредством электропорации, ультразвука, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, химической или физической компетенции, трансформации протопластов, профаговой индукции или конъюгации. В некоторых вариантах осуществления с активными системами рестрикционных ферментов, это может быть необходимо для метилирования нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

Кроме того, нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы таким образом, чтобы они содержали регуляторный элемент, например, промотор, чтобы увеличить или иным образом контролировать экспрессию конкретной нуклеиновой кислоты. Промотор может быть конститутивным промотором или индуцируемым промотором. В идеальном варианте, промотор представляет собой промотор пути Вуда-Льюнгдаля, промотор ферредоксина, промотор пируват-ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона Rnf-комплекса, промотор оперона АТФ-синтазы, или промотор оперона фосфотрансацетилазы/ацетаткиназы.

"Субстрат" относится к источнику углерода и/или энергии для микроорганизма согласно данному изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник С1-углерода, например, CO, CO_2 и/или CH_4. Предпочтительно, субстрат содержит источник С1-углерода в виде CO или CO + CO_2. Субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, например, H_2, N_2 или электроны. Однако в других вариантах осуществления субстрат может представлять собой углевод, такой как сахар, крахмал, клетчатка, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза, или их комбинацию. Например, углевод может представлять собой фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, ксилозу или некоторые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, субстрат не содержит (D)-ксилозу (Alkim, Microb Cell Fact, 14: 127, 2015). В некоторых вариантах осуществления, субстрат не содержит пентозу, такую как ксилоза (Pereira, Metab Eng, 34: 80-87, 2016). В некоторых вариантах осуществления, субстрат может содержать как газообразные, так и углеводные субстраты (миксотрофная ферментация).

В целом, газообразный 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. Газообразный субстрат может содержать CO в диапазоне, например, около 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% CO. Предпочтительно, газообразный субстрат содержит около 40-70 мол.% CO (например, газ сталелитейных заводов или доменный газ), около 20-30 мол.% CO (например, газ конвертерной печи) или около 15-45 мол.% CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах осуществления, газообразный субстрат может содержать относительно низкое количество CO, например, около 1-10 или 1-20 мол.% CO. Микроорганизм согласно данному изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть CO в газообразном субстрате в продукт. В некоторых вариантах осуществления, газообразный субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол.%) CO.

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

Газообразный субстрат может содержать некоторое количество CO_2. Например, газообразный субстрат может содержать около 1-80 или 1-30 мол.% CO_2. В некоторых вариантах осуществления, газообразный субстрат может содержать меньше чем около 20, 15, 10 или 5 мол.% CO_2. В другом варианте осуществления, газообразный субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол.%) CO_2.

Газообразный субстрат также может быть представлен в альтернативных формах. Например, газо-

образный субстрат может быть растворен в жидкости или адсорбирован на твердом носителе.

Газообразный субстрат и/или источник С1-углерода может представлять собой отработанный газ, полученный в виде побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей или от газификации биомассы. В определенных вариантах осуществления, промышленный процесс выбран из группы, состоящей из производства продукции черных металлов, например, сталелитейного производства, производства продукции из цветных металлов, переработки нефти, газификации угля, производства электроэнергии, производства чистого углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В этих вариантах осуществления, газообразный субстрат и/или источник С1-углерода может быть извлечен из промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу с применением любого удобного способа.

Газообразный субстрат и/или источник С1-углерода может представлять собой синтез-газ, например, синтез-газ, полученный при газификации угля или остатков нефтеперерабатывающей промышленности, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте осуществления, синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

Композиция газообразного субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может понизить эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от композиции субстрата может быть желательным обработать, очистить или отфильтровать субстрат для удаления любых нежелательных примесей, например, токсинов, нежелательных компонентов или частиц пыли, и/или для увеличения концентрации желаемых компонентов.

В некоторых вариантах осуществления, ферментацию проводят без углеводных субстратов, таких как сахар, крахмал, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза.

В некоторых вариантах осуществления, общая энергетика CO и H_2 для этиленгликоля (МЭГ) предпочтительнее, чем от глюкозы до этиленгликоля, как показано ниже, где более отрицательные значения свободной энергии Гиббса, ΔrG'm, для CO и H_2 указывают на большую движущую силу в направлении этиленгликоля. Расчеты общей дельта G реакции для сравнения глюкозы с CO в качестве субстрата были выполнены с использованием эквилибратора (http://equilibrator.weizmann.ac.il/), который является стандартным способом оценки общей осуществимости пути или отдельных этапов в путях в биологических системах (Flamholz, E. Noor, A. Bar-Even, R. Milo (2012) eQuilibrator - the biochemical thermodynamics calculator Nucleic Acids Res 40:D770-5; Noor, A. Bar-Even, A. Flamholz, Y. Lubling, D. Davidi, R. Milo (2012) An integrated open framework for thermodynamics of reactions that combines accuracy and coverage Bio informatics 28:2037-2044; Noor, H.S. Haraldsdóttir, R. Milo, R.M.T. Fleming (2013) Consistent Estimation of Gibbs Energy Using Component Contributions PLoS Comput Biol 9(7): e1003098; Noor, A. Bar-Even, A. Flamholz, E. Reznik, W. Liebermeister, R. Milo (2014) Pathway Thermodynamics Highlights Kinetic Obstacles in Central Metabolism PLoS Comput Biol 10(2):e1003483).

Расчеты выполняют следующим образом:

глюкоза (водн.) + 3 NADH (водн.) ⇌ 3 МЭГ (водн.) + 3 NAD^+ (водн.) ΔrG'm -104 кДж/моль,

6 CO (водн.) + 3 H_2 (водн.) + 6 NADH (водн.) ⇌ 3 МЭГ (водн.) + 6 NAD^+ (водн.) ΔrG'm -192 кДж/моль.

Физиологические условия:

глюкоза (водн.) + 3 NADH (водн.) ⇌ 3 МЭГ (водн.) + 3 NAD^+ (водн.) ΔrG'm -70 кДж/моль,

6 CO (водн.) + 3 H_2 (водн.) + 6 NADH (водн.) ⇌ 3 MEG (водн.) + 6 NAD^+ (водн.) ΔrG'm -295 кДж/моль.

В дополнение к этиленгликолю, глиоксилату и/или гликолату микроорганизм согласно изобретению может культивироваться для получения одного или большего количества сопутствующих продуктов. Так, например, микроорганизм согласно данному изобретению может продуцировать или может быть генетически сконструирован для продукции этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), бутанола (WO 2008/115080 и WO 2012/053905), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342 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), изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/036152), 1-пропанола (WO 2014/0369152), продуктов, полученных из хоризмата (WO 2016/191625), 3-гидроксибутирата (WO 2017/066498) и 1,3-бутандиола (WO 2017/0066498). В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к этиленгликолю микроорганизм согласно данному изобретению также продуцирует этанол, 2,3-бутандиол и/или сукцинат. В некоторых вариантах осуществления, саму микробную биомассу можно рассматривать как продукт.

"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. "Ненативный продукт" представ-

ляет собой продукт, продуцируемый генетически модифицированным микроорганизмом, однако, он не продуцируется генетически немодифицированным микроорганизмом, из которого получают генетически модифицированный микроорганизм. Неизвестным является то, что этиленгликоль продуцируется каким-либо природным микроорганизмом, так что он является неродным продуктом всех микроорганизмов.

"Селективность" относится к отношению получения целевого продукта к получению всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом. Микроорганизм согласно данному изобретению может быть сконструирован для продуцирования продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В одном варианте осуществления, целевой продукт, такой как этилен гликоль, составляет по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно данному изобретению. В одном варианте осуществления, этилен гликоль составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно данному изобретению, таким образом, микроорганизм согласно данному изобретению обладает селективностью по отношению к этилен гликолю, составляющей по меньшей мере 10%. В другом варианте осуществления, этилен гликоль составляет по меньшей мере 30% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно данному изобретению, таким образом, микроорганизм согласно данному изобретению обладает селективностью по отношению к этилен гликолю, составляющей по меньшей мере 30%.

Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин "биореактор" включает в себя устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или большего количества сосудов, колонн или разводок трубопроводов, например, реактор непрерывного действия с механическим перемешиванием (CSTR), реактор на основе иммобилизованных клеток (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажную колонку, газлифтный ферментёр, статический смеситель, или другой сосуд или другое устройство, подходящее для приведения в контакт газа с жидкостью. В некоторых вариантах осуществления, биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Один или оба из таких реакторов могут быть обеспечены субстратом. Как применяется в данном документе, термины "культивирование" и "ферментация" используют взаимозаменяемо. Указанные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

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

Для получения этиленгликоля культивирование/ферментацию желательно проводить в соответствующих условиях. Как правило, культивирование/ферментацию выполняют в анаэробных условиях. Условия реакции, которые следует учитывать, включают в себя давление (или парциальное давление), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при применении реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень инокулята, максимальные концентрации газового субстрата чтобы удостовериться, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, и максимальные концентрации продукта для избежания ингибирования продукта. В частности, можно регулировать скорость введения субстрата, чтобы удостовериться, что концентрация газа в жидкой фазе не стала ограничивающей.

Эксплуатация биореактора при повышенных давлениях позволяет повысить скорость массопереноса газа из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, в общем случае предпочтительно осуществлять культивирование/ферментацию при давлениях выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку заданная скорость превращения газа частично зависит от времени удерживания субстрата, при этом время удерживания диктует необходимый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для культивирования/ферментация. Это, в свою очередь, означает, что при поддержании биореакторов при повышенном давлении, а не при атмосферном давлении, можно уменьшить время удерживания, определяемое как объем жидкости в биореакторе, деленный на скорость потока нагнетаемого газа. Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного используемого микроорганизма. Однако, в общем случае предпочтительно проводить ферментацию при давлении выше атмосферного давления. Также, поскольку данная скорость преобразования газа отчасти зависит от времени удерживания субстрата, а достижение требуемого времени удерживания, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, то применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для ферментации.

В некоторых вариантах осуществления, ферментацию выполняют в отсутствие света или в присутствии некоторого количества света, недостаточного для удовлетворения энергетических потребностей фотосинтетических микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления, микроорганизм согласно данному изобретению представляет собой нефотосинтезирующий микроорганизм.

Способ согласно данному изобретению может дополнительно включать в себя отделение этиленг-

ликоля от ферментационного бульона. Этиленгликоль может быть отделен или очищен от ферментационного бульона любым способом или комбинацией способов, известных в данной области техники, включая, например, дистилляцию, процессы с псевдодвижущимся слоем, мембранную очистку, испарение, испарение через полупроницаемую мембрану, отгонку газом, разделение фаз, ионный обмен, или экстрактивную ферментацию, включая, например, жидкость-жидкостную экстракцию. В одном варианте осуществления, этиленгликоль может быть сконцентрирован из ферментационного бульона с использованием обратного осмоса и/или испарения через полупроницаемую мембрану (США 5552023). Вода может быть удалена дистилляцией, а остатки (содержащие высокую долю этиленгликоля) могут быть затем извлечены с использованием дистилляции или вакуумной дистилляции для получения фракции этиленгликоля высокой чистоты. В альтернативном варианте, с или без концентрирования путем обратного осмоса и/или испарения через полупроницаемую мембрану, этиленгликоль может быть дополнительно очищен путем реакционной дистиляции с альдегидом (Atul, Chem Eng Sci, 59: 2881-2890, 2004) или азеотропной дистиляции с использованием углеводорода (US 2218234). В другом подходе, этиленгликоль может быть захвачен на активированном угле или полимерном абсорбенте из водного раствора (с или без обратного осмоса и/или испарением через полупроницаемую мембрану) и извлечен с использованием низкокипящего органического растворителя (Chinn, Recovery of Glycols, Sugars, and Related Multiple -OH Compounds from Dilute-Aqueous Solution by Regenerable Adsorption onto Activated Carbons, University of California Berkeley, 1999). Этиленгликоль затем может быть извлечен из органического растворителя дистилляцией. В некоторых вариантах осуществления, этиленгликоль извлекают из ферментационного бульона непрерывным удалением части бульона из биореактора, отделением микробных клеток от бульона (обычно фильтрованием), и выделением этиленгликоля из бульона. Побочные продукты, такие как спирты или кислоты, также могут быть отделены или очищены от бульона. Спирты и/или ацетон можно выделять, например, дистилляцией. Кислоты могут быть выделены, например, адсорбцией на активированном древесном угле. Отделенные микробные клетки могут быть возвращены в биореактор в некоторых вариантах осуществления. Фильтрат, не содержащий клеток, остающийся после удаления целевых продуктов, также предпочтительно возвращают в биореактор, целиком или частично. В фильтрат, не содержащий клеток, можно добавлять дополнительные питательные вещества (такие как витамины B) для пополнения среды перед ее возвратом в биореактор.

Извлечение диолов из водных сред было продемонстрировано рядом способов. Технология псевдодвижущегося слоя (SMB) была использована для извлечения 2,3-бутандиола из водной смеси этанола и связанных оксигенатов (патент США № 8658,45). Также было продемонстрировано реакционное разделение для эффективного извлечения диола. В некоторых вариантах осуществления, извлечение этиленгликоля проводят взаимодействием диолсодержащей фракции с альдегидами, фракционированием и восстановлением диола, окончательным фракционированием для восстановления фракции концентрированного диола; смотрите, например, патент США № 7951980.

Изобретение предлагает композиции, содержащие этиленгликоль, продуцируемый микроорганизмами, и согласно способам, описанным в данном документе. Например, композиция, содержащая этиленгликоль может представлять собой антифриз, консервант, дегидратирующий агент, или буровой раствор.

Изобретение также предлагает полимеры, содержащие этиленгликоль, продуцируемый микроорганизмами, и согласно способам, описанным в данном документе. Такими полимерами могут быть, например, гомополимеры, такие как полиэтиленгликоль, или сополимеры, такие как полиэтилентерефталат. Способы синтеза таких полимеров хорошо известны в данной области техники; смотрите, например, Herzberger et al., Chem Rev., 116(4): 2170-2243 (2016) and Xiao et al., Ind Eng Chem Res. 54(22): 5862-5869 (2015).

Данное изобретение дополнительно предлагает композиции, содержащие полимеры, содержащие этиленгликоль, продуцируемый микроорганизмами, и согласно способам, описанным в данном документе. Например, композиция может представлять собой волокно, смолу, пленку, или пластика.

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но, разумеется, не должны рассматриваться как ограничивающие его объем каким-либо образом.

Пример 1. Конструирование гетерологичного вектора экспрессии, содержащего цитрат-синтазу B. subtilis, изоцитрат-лиазу E. coli и гликольальдегид-дегидрогеназу G. oxydans для получения этиленгликоля из CO и/или CO_2 и H_2 в C. autoethanogenum.

Гены, кодирующие цитратсинтазу из B. subtilis (citZ; SEQ ID NO: 1-2), изоцитратлиазу из E. coli (icl; SEQ ID NO: 11-12) и гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (aldA1; SEQ ID NO: 55-56) были кодон-адаптированы и синтезированы для экспрессии в C. autoethanogenum. Адаптированные гены клонировали в челночный вектор экспрессии, pIPL12, с использованием стандартного набора "Golden Gate Cloning Bsal" (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс). pIPL12 содержит точку начала репликации как для E. coli, так и для C. autoethanogenum, что позволяет ему реплицироваться и поддерживаться в обеих видах; pIPL12 также работает в большинстве Clostridia. pIPL12 дополнительно содержит 23S рРНК (аденин(2058)-N(6))-метилтрансферазу Erm (B), обеспечивающую устойчивость к эритромици-

ну/кларитромицину для положительного отбора, TraJ для конъюгативного переноса из E. coli, и промотор для экспрессии гетерологичных генов; смотрите фиг. 2A. Вектор экспрессии, созданный путем клонирования citZ, icl и aldA1 в pIPL12, упоминается в данном документе как pMEG042 (фиг. 2B).

Таблица 2

Олигонуклеотиды, использованные для конструирования вектора экспрессии pMEG042

SEQ ID NO	Название	Последовательность
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAACCATGGAGATCTCGAGGCCTG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAGACTCTTGGC
71	citZ_Bs1-F	CACACCAGGTCTCACATATGACAGCAACAAGGGGCC
72	citZ_Bs1-R	CACACCAGGTCTCAATTGTAACACCTCCTTAATTAGTTATGCTCTTTCTTCTATAGGTACAAATTTTTG
73	Icl_Ec-F	CACACCAGGTCTCACAATGAAAACAAGAACTCAACAAATAG
74	Icl_Ec-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCCTCCTATGTGTTCTTAAAATTGAGATTCTTCAGTTGAACCTG
75	aldA1_Go-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGACTGAAAAAAATAATTTATTCATAAATGGATC
76	aldA1_Go-R	CACACCAGGTCTCAGGTTATGCATTTAGATATATTGTTTTTGTCTGTACG

Конструкция pMEG042 была трансформирована в C. autoethanogenum путем конъюгации. Вектор экспрессии был впервые введен в конъюгативный донорный штамм E.coli HB101+R702 (CA434) (Williams et al. 1990) (донор) с использованием стандартной трансформации тепловым шоком. Донорные клетки восстанавливали в среде SOC при 37°C в течение 1 ч, после чего помещали на чашки со средой LB, содержащей 100 мкг/мл спектиномицина и 500 мкг/мл эритромицина, и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день 5 мл аликвот LB, содержащих 100 мкг/мл спектиномицина и 500 мкг/мл эритромицина, инокулировали несколькими донорными колониями и инкубировали при 37°C, встряхивая в течение примерно 4 ч или до тех пор, пока культура не станет заметно концентрированней, но при этом еще не вошла в стационарную фазу. 1,5 мл донорной культуры собирали центрифугированием при 4000 об/мин и 20-25°C в течение 2 мин и удаляли супернатант. Донорные клетки осторожно ресуспендировали в 500 мкл стерильного буфера ФСБ и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 2 мин, и супернатант ФБС удаляли.

Осадок вносили в анаэробную камеру и осторожно ресуспендировали в 200 мкл во время поздней экспоненциальной фазы культуры C. autoethanogenum (реципиент). C. autoethanogenum DSM10061 и DSM23693 (производное DSM10061) получали из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия). Штаммы выращивали при 37°C в среде PETC (смотрите патент США № 9738875) при pH 5,6 с использованием стандартных анаэробных методов (Hungate 1969; Wolfe 1971).

Смесь для конъюгации (смесь донорных и реципиентных клеток) наносили на чашки с PETC-MES + фруктозный агар и оставляли сушиться. Когда пятна больше не были визуально влажными, чашки помещали в камеру под давлением, повышали давление синтез-газом (50% CO, 10% N_2, 30% CO_2, 10% H_2) до 25-30 фунтов на квадратный дюйм, и инкубировали при 37°C в течение примерно 24 ч. Затем конъюгационную смесь удаляли с чашек путем осторожного соскабливания с использованием 10 мкл инокуляционной петли. Удаленную смесь суспендировали в 200-300 мкл среды PETC. Аликвоты по 100 мкл конъюгационной смеси высевали на чашки с агаризированной средой PETC с добавлением 5 мкг/мл кларитромицина для отбора трансформантов, несущих плазмиду.

Три отдельные колонии C. autoethanogenum, несущие плазмиду pMEG042, инокулировали в 2 мл среды PETC-MES с 5 мкг/мл кларитромицина, и выращивали автотрофно при 37°C с 50% CO, 10% N_2, 30% CO_2, 10% H_2 и 100 об/мин орбитальном встряхивании в течение трех дней. Культуры разбавляли до OD_{600} 0,05 в 10 мл среды PETC-MES с 5 мкг/мл кларитромицина во флаконах с сывороткой и выращивали автотрофно при 37°C с 50% CO, 10% N_2, 30% CO_2, 10% H_2 и 100 об/мин орбитальном встряхивании в течение 20 дней, ежедневно отбирая пробы для измерения биомассы и метаболитов (фиг. 3A и 3B). Продукцию этиленгликоля измеряли с помощью газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС), а другие метаболиты измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано ниже.

Концентрации этиленгликоля измеряли с помощью Thermo Scientific ISQ LT GCMS, оборудованного колонкой Agilent VF-WAXms (15 м × 0,25 мкм × 0,25 мкм) и автосамплером RSH. Образцы готовили разбавлением 200 мкл бульона 200 мкл метанола. Образцы встряхивали, затем центрифугировали в течение 3 мин при 14000 об/мин; 200 мкл супернатанта переносили в стеклянный флакон со вставкой. Образцы переносили в автосамплер для анализа, используя инъекцию 1,0 мкл, соотношение разделения 5:1, и температуру на входе 240 °C. Хроматографию выполняли с программой нагрева: 80°C с выдержкой в течение 0,5 мин до поднятия 10°C/мин до 150°C, до поднятия 25°C/мин до 220°C, с конечным выдерживанием в течение 3 мин. Скорость потока в колонке составляла 4,0 мл/мин с выдержкой 0,5 мин, затем снижалась до 1,5 мл/мин со скоростью 100 мл/мин/мин с использованием гелия в качестве газа-носителя. Источник ионов МС поддерживали при 260°C, а переходную линию устанавливали на 240°C. Количественное определение проводили с использованием линейной калибровки внешним стандартом, используя

33,0 m/z в качестве пика количественного определения и 31,0 + 62,0 m/z в качестве подтверждающих пиков.

Этанол, ацетат, 2,3-бутандиол, глиоксилат, и концентрации гликолята измеряли с помощью ВЭЖХ на Agilent 1260 Infinity LC с определением показателя преломления (RI) при 35°C. Образцы готовили путем нагревания в течение 5 мин при 80°C, за которым следовало 3 мин центрифугирование при 14000 об/мин; супернатант переносили в стеклянный флакон для анализа. Разделение проводили с помощью 10 мкл инъекции в колонку Phenomenex Rezex™ ROA-Органическая кислота H+ (8%) (300 мм × 7,8 мм × 8 мкм) при 0,7 мл/мин и 35°C в изократических условиях, с использованием подвижной фазы в виде 5 мМ серной кислоты.

Через примерно 3 дня автотрофного роста обнаруживали гликолятный прекурсор этиленгликоля, и через 10 дней обнаруживали продукцию этиленгликоля (фиг. 3B).

Пример 2. Конструирование гетерологичного вектора экспрессии, содержащего аланин-глиоксилат-аминотрансферазу S. thiotaurini и альдегид-дегидрогеназу P. fluorescens для получения этиленгликоля из CO и/или CO_2 и H_2 в C. autoethanogenum.

Гены, кодирующие аланин-глиоксилат-аминотрансферазу из S. thiotaurini (pucG; SEQ ID NO: 15-16) и альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens Q8r1-96 (aldA1; SEQ ID NO: 57-58) были кодон-адаптированы и синтезированы для экспрессии в C. autoethanogenum. Кодон-адаптированные гены клонировали в pIPL12 (фиг. 2A), и полученный вектор экспрессии, pMEG058, вводили в C. autoethanogenum, как описано в примере 1; смотрите фиг. 2C.

Таблица 3

Олигонуклеотиды, использованные для конструирования вектора экспрессии pMEG058

SEQ ID NO	Название	Последовательность
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAACCATGGAGATCTCGAGGCC TG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAGACTCTTGG C
77	PucG_Sthi1-F	CACACCAGGTCTCACATATGCAATTTAGGCCTTTTAA TCCACCA
78	PucG_Sthi1-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCCTCCTATGTGTTCTTAT GCTTGCGCAAGTGCCT
79	aldA1_Pfq8-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGTCTTCAGTGCCTG TATTCCAG
80	aldA1_Pfq8-R	CACACCAGGTCTCAGGTTAAGACTGGAGATATACTG CATGAG

Две отдельные колонии C. autoethanogenum, несущие плазмиду pMEG058, инокулировали в 2 мл среды PETC-MES с 5 мкг/мл кларитромицина и выращивали автотрофно, как описано в примере 1; смотрите фиг. 4A. Через примерно 3 дня автотрофного роста обнаруживали гликолят, а через 8 дней обнаруживали продукцию этиленгликоля (фиг. 4B).

Пример 3. Конструирование гетерологичного вектора экспрессии, содержащего аланин-глиоксилат-аминотрансферазу S. thiotaurini и гликольальдегид-дегидрогеназу G. oxydans для получения этиленгликоля из CO и/или CO_2 и H_2 в C. autoethanogenum.

Гены, кодирующие аланин-глиоксилат-аминотрансферазу из S. thiotaurini (pucG; SEQ ID NO: 15-16) и гликольальдегид-дегидрогеназу из G. oxydans (aldA1; SEQ ID NO: 55-56) были кодон-адаптированы и синтезированы для экспрессии в C. autoethanogenum. Кодон-адаптированные гены клонировали в pIPL12 (фиг. 2A), и полученный вектор экспрессии, pMEG059, вводили в C. autoethanogenum, как описано в примере 1; смотрите фиг. 2D.

Таблица 4

Олигонуклеотиды, использованные для конструирования вектора экспрессии pMEG059

SEQ ID NO	Название	Последовательность
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAACCATGGAGATCTCGAGGCC TG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAGACTCTTGG C
77	PucG_Sthi1-F	CACACCAGGTCTCACATATGCAATTTAGGCCTTTTAA TCCACCA
78	PucG_Sthi1-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCCTCCTATGTGTTCTTAT GCTTGCGCAAGTGCCT
75	aldA1_Go-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGACTGAAAAAAATA ATTTATTCATAAATGGATC
76	aldA1_Go-R	CACACCAGGTCTCAGGTTATGCATTTAGATATATTGT TTTTGTCTGTACG

Две отдельные колонии C. autoethanogenum, несущие плазмиду pMEG059, инокулировали в 2 мл среды PETC-MES с 5 мкг/мл кларитромицина и выращивали автотрофно, как описано в примере 1; смотрите фиг. 5A. Через примерно 3 дня автотрофного роста обнаруживали гликолят, а через 10 дней обнаруживали продукцию этиленгликоля (фиг. 5B).

Пример 4. Конструирование гетерологичного вектора экспрессии, содержащего аланин-глиоксилат-аминотрансферазу и альдегид-дегидрогеназу для получения этиленгликоля из CO и/или CO_2 и H_2 в C. autoethanogenum.

Гены, кодирующие аминотрансферазу класса V из C. acidurici (SgA; SEQ ID NO: 19, 20) и альдегид-дегидрогеназу из P. fluorescens Q8r1-96 (aldA1; SEQ ID NO: 57-58) были кодон-адаптированы и синтезированы для экспрессии в C. autoethanogenum. Кодон-адаптированные гены клонировали в pIPL12 (фиг. 2A), и полученный вектор экспрессии, pMEG061, вводили в C. autoethanogenum, как описано в

примере 1; смотрите фиг. 2E.

Таблица 5

Олигонуклеотиды, использованные для конструирования вектора экспрессии pMEG061

SEQ ID NO	Название	Последовательность
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAACCATGGAGATCTCGAGGCCTG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAGACTCTTGGC
81	SgaA_Caci1-F	CACACCAGGTCTCACATATGAGAACTCCATTTATTATGAC
82	SgaA_Caci1-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCCTCCTATGTGTTCCTAATCTACAAAGTGCTTG
79	aldA1_Pfq8-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGTCTTCAGTGCCTGTATTCCAG
80	aldA1_Pfq8-R	CACACCAGGTCTCAGGTTAAGACTGGAGATATACTGCATGAG

Три отдельные колонии C. autoethanogenum, несущие плазмиду pMEG061, инокулировали в 2 мл среды PETC-MES с 5 мкг/мл кларитромицина и выращивали автотрофно, как описано в примере 1; смотрите фиг. 6A. Через примерно 3 дня автотрофного роста обнаруживали гликолят, а через 16 дней обнаруживали продукцию этиленгликоля (фиг. 6B).

Пример 5. Моделирование максимальных выходов различных путей для этиленгликоля.

Для предсказания максимальных выходов различных путей для этиленгликоля использовали модель метаболизма Clostridium autoethanogenum в геномном масштабе, подобную модели, описанной в Marcellin, Green Chem, 18: 3020-3028, 2016. Для этого к структуре модели Clostridium autoethanogenum дикого типа добавили гетерологичные метаболические реакции, представляющие включение пути продукции ненативного соединения. Хотя модель, использованная для экспериментальной работы, описанной в данном документе, основана на Clostridium autoethanogenum, можно ожидать, что полученные результаты будут применимы и к другим микроорганизмам Вуда-Льюнгдаля, учитывая сходство их метаболизма.

Продуцирование этиленгликоля моделировали с использованием методов вычислительного моделирования на основе ограничений анализа баланса потоков (FBA) и линейной минимизации метаболической корректировки (LMOMA) (Maia, Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference Companion on - GECCO '17, New York, New York, ACM Press, 1661-1668, 2017) с использованием cobrapy версии 0.8.2 (Ebrahim., COBRApy: COnstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python, BMC Syst Biol, 7: 74, 2013), optlang версии 1.2.3 (Jensen, Optlang: An Algebraic Modeling Language for Mathematical Optimization," The Journal of Open Source Software, 2, doi:10.21105/joss.00139, 2017) в качестве интерфейса поиска решений и Gurobi Optimizer версии 7.0.2 в качестве средства поиска решений оптимизации.

Моделирование показало прогнозируемый выход 0,37 моль этиленгликоля/моль CO по путям, описанным в данном документе в примерах 1-4. Это более чем вдвое превышает прогнозируемый выход от гипотетических путей, описанных в Islam et al. Metab Eng, 41: 173-181, 2017, которые требуют глюконеогенеза; было установлено, что самые высокие предсказанные выходы составляют примерно 0,44 г этиленгликоля/г CO, что соответствует примерно 0,18 моль этиленгликоля/моль CO.

Все ссылки, в том числе публикации, патентные заявки и патенты, приведенные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана для включения посредством ссылки и изложена в данном документе в полном объеме. В данном описании ссылка на любой известный уровень техники не является и не должна рассматриваться как признание того, что такой известный уровень техники является частью общедоступных известных знаний в области деятельности в любой стране.

Следует считать, что применение терминов в единственном числе и аналогичных ссылок в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) охватывает как единственное, так и множественное число, если только в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "охватывающий" следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е. означающие "включая, но не ограничиваясь лишь этими"), если не указано иное. Термин "по существу состоящий из" ограничивает объем композиции, процесса или способа указанными материалами или стадиями, или тем, что не оказывает существенного влияния на основные и новые характеристики композиции, процесса или способа. Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как означающее одну, обе, или любую из вышеуказанных комбинацию альтернатив. Как применяется в данном документе, термин "около" означает ± 20% указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

Перечисление в данном документе диапазонов значений просто предназначено 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 включающий 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.

Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем поряд-

ке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров, или вводных слов (например, "такой как"), приведенных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения данного изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одно выражение, приведенное в данном описании, не следует понимать как указание на какой-либо незаявленный элемент как необходимый для практического осуществления данного изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления данного изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления станут очевидными для специалистов в данной области при прочтении представленного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие вариации при необходимости, и авторы изобретения предполагают, что данное изобретение будет осуществляться на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, данное изобретение включает в себя все модификации и эквиваленты объекта изобретения, приведенные в прилагаемой формуле изобретения, как это установлено действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных их вариациях охватывается данным изобретением до тех пор, пока в данном документе не указано иное, или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически сконструированный микроорганизм, способный продуцировать этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля из газообразного субстрата, причем генетически сконструированный микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum, трансформированный одним из следующих векторов:

(i) вектор экспрессии, содержащий гены гетерологичных цитрат-синтазы, изоцитрат-лиазы и гликольальдегид-дегидрогеназы;

(ii) вектор экспрессии, содержащий гены гетерологичных аланин-глиоксилат-аминотрансферазы и альдегид-дегидрогеназы; и

(iii) вектор экспрессии, содержащий гены гетерологичных аланин-глиоксилат-аминотрансферазы и гликольальдегид-дегидрогеназы.

2. Микроорганизм по п.1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм продуцирует этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля через одно или большее количество промежуточных соединений, выбранных из группы, состоящей из 5,10-метилентетрагидрофолата, оксалоацетата, цитрата, малата и глицина.

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

a) гетерологичного фермента, способного превращать оксалоацетат в цитрат;

b) гетерологичного фермента, способного превращать глицин в глиоксилат;

c) гетерологичного фермента, способного превращать изоцитрат в глиоксилат; и

d) гетерологичного фермента, способного превращать гликолят в гликоальдегид.

4. Микроорганизм по п.3, отличающийся тем, что:

a) гетерологичный фермент, способный превращать оксалоацетат в цитрат, представляет собой цитрат [Si]-синтазу [2.3.3.1], АТФ-цитрат-синтазу [2.3.3.8] или цитрат (Re)-синтазу [2.3.3.3];

b) гетерологичный фермент, способный превращать глицин в глиоксилат, представляет собой аланин-глиоксилат-трансаминазу [2.6.1.44], серин-глиоксилат-трансаминазу [2.6.1.45], серин-пируват-трансаминазу [2.6.1.51], глицин-оксалоацетат-трансаминазу [2.6.1.35], глицин-трансаминазу [2.6.1.4], глицин-дегидрогеназу [1.4.1.10], аланин-дегидрогеназу [1.4.1.1] или глицин-дегидрогеназу [1.4.2.1];

c) гетерологичный фермент, способный превращать изоцитрат в глиоксилат, представляет собой изоцитрат-лиазу [4.1.3.1] и/или

d) гетерологичный фермент, способный превращать гликолят в гликоальдегид, представляет собой гликольальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.21], лактальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.22], сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназу [1.2.1.24], 2,5-диоксовалерат-дегидрогеназу [1.2.1.26], альдегид-дегидрогеназу [1.2.1.3/4/5], бетаин-альдегид-дегидрогеназу [1.2.1.8] или альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазу [1.2.7.5].

5. Микроорганизм по п.3, отличающийся тем, что один или большее количество гетерологичных ферментов являются кодон-оптимизированными для экспрессии в микроорганизме.

6. Микроорганизм по п.3, отличающийся тем, что указанный микроорганизм дополнительно содержит один или большее количество из фермента, способного превращать ацетил-КоА в пируват; фермента, способного превращать пируват в оксалоацетат; фермента, способного превращать пируват в малат; фермента, способного превращать пируват в фосфенолпируват; фермента, способного превращать оксалоацетат в цитрил-КоА; фермента, способного превращать цитрил-КоА в цитрат; фермента, способного превращать цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат; фермента, способного превращать фосфоенолпируват в оксалоацетат; фермента, способного превращать фосфоенолпируват в 2-фосфо-D-глицерат; фер-

мента, способного превращать 2-фосфо-D-глицерат в 3-фосфо-D-глицерат; фермента, способного превращать 3-фосфо-D-глицерат в 3-фосфонооксипируват; фермента, способного превращать 3-фосфонооксипируват в 3-фосфо-L-серин; фермента, способного превращать 3-фосфо-L-серин в серин; фермента, способного превращать серин в глицин; фермента, способного превращать 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин; фермента, способного превращать серин в гидроксипируват; фермента, способного превращать D-глицерат в гидроксипируват; фермента, способного превращать малат в глиоксилат; фермента, способного превращать глиоксилат в гликолят; фермента, способного превращать гидроксипируват в гликоальдегид; и фермента, способного превращать гликоальдегид в этиленгликоль.

7. Микроорганизм по п.3, отличающийся тем, что указанный микроорганизм сверхэкспрессирует:

a) гетерологичный фермент, способный превращать оксалоацетат в цитрат;

b) гетерологичный фермент, способный превращать глицин в глиоксилат; и/или

c) гетерологичный фермент, способный превращать гликолят в гликоальдегид.

8. Микроорганизм по п.6, отличающийся тем, что указанный микроорганизм сверхэкспрессирует:

a) фермент, способный превращать пируват в оксалоацетат;

b) фермент, способный превращать цитрат в аконитат и аконитат в изоцитрат;

c) фермент, способный превращать фосфоенолпируват в оксалоацетат;

d) фермент, способный превращать серин в глицин;

e) фермент, способный превращать 5,10-метилентетрагидрофолат в глицин;

f) фермент, способный превращать глиоксилат в гликолят; и/или

g) фермент, способный превращать гликоальдегид в этиленгликоль.

9. Микроорганизм по п.1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм содержит нарушающую мутацию в одном или большем количестве из изоцитрат-дегидрогеназы, глицерат-дегидрогеназы, гликолят-дегидрогеназы, альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазы и альдегид-дегидрогеназы.

10. Микроорганизм по п.1, отличающийся тем, что прекурсор этиленгликоля представляет собой глиоксилат или гликолят.

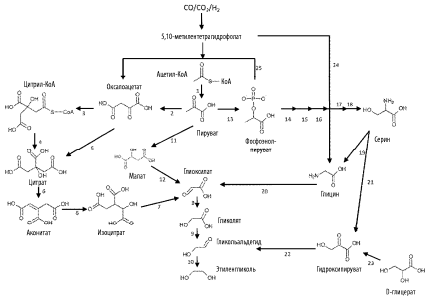
11. Способ получения этиленгликоля или прекурсора этиленгликоля, включающий в себя культивирование микроорганизма по п.1 в питательной среде, в присутствии газообразного субстрата, в результате чего микроорганизм продуцирует этиленгликоль или прекурсор этиленгликоля.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит один или более из CO и CO_2, а также H_2.

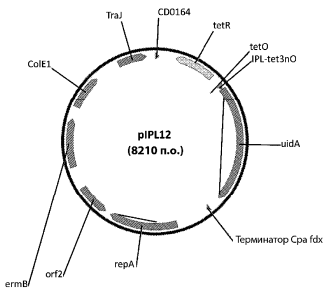
13. Способ по п.11, отличающийся тем, что прекурсор этиленгликоля представляет собой глиоксилат или гликолят.

14. Способ по п.11, дополнительно включающий в себя отделение этиленгликоля или прекурсора этиленгликоля от питательной среды.

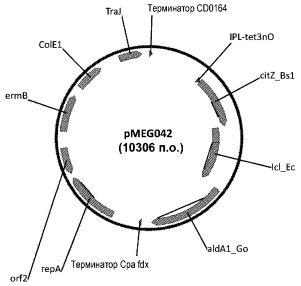
15. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный микроорганизм дополнительно продуцирует одно или большее количество из этанола, 2,3-бутандиола и сукцината.



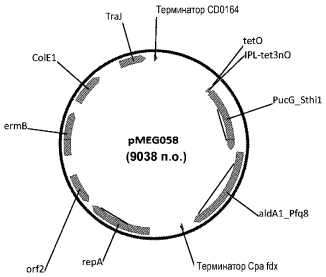
Фиг. 1



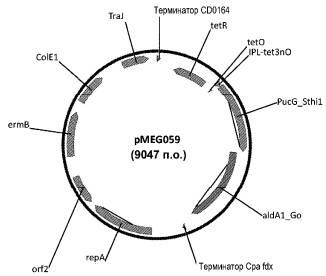
Фиг. 2A



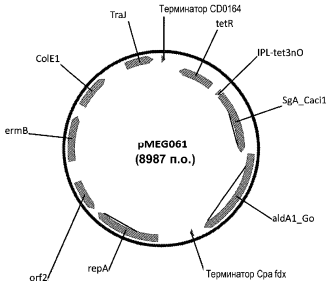
Фиг. 2B



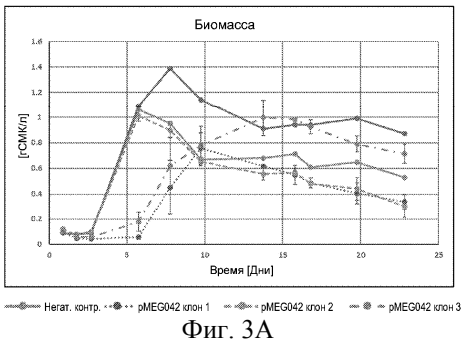
Фиг. 2C



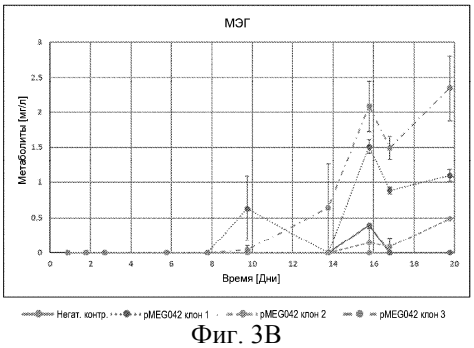
Фиг. 2D



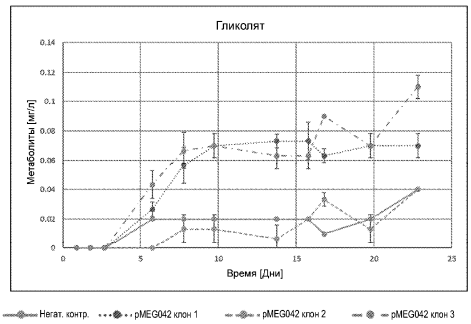
Фиг. 2E



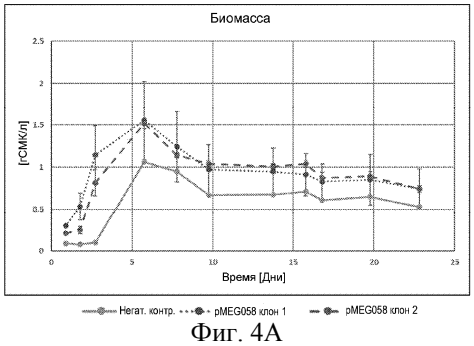
Фиг. 3A



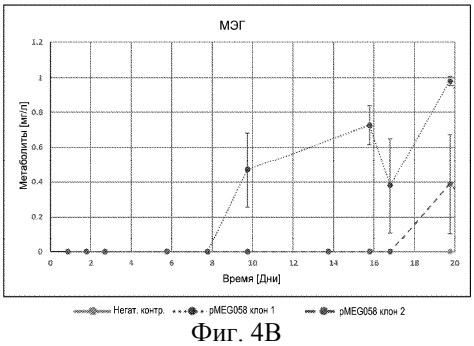
Фиг. 3B



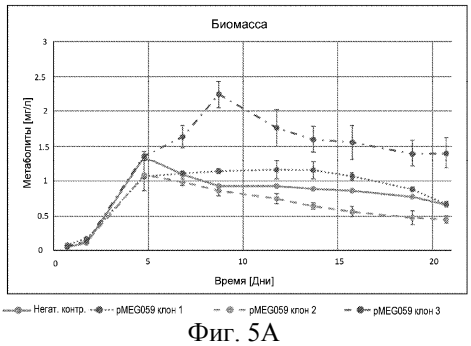
Фиг. 3C



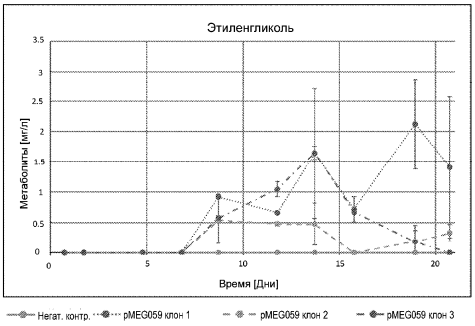
Фиг. 4A



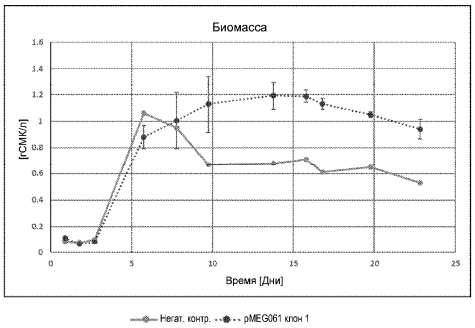
Фиг. 4B



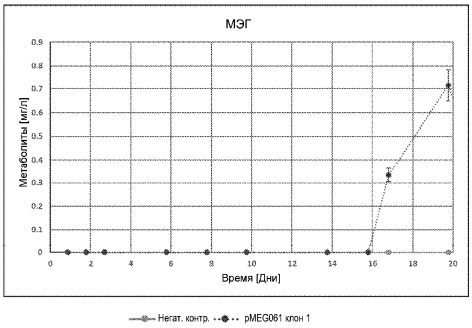
Фиг. 5A



Фиг. 5B



Фиг. 6A



Фиг. 6B