

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292688 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.04(51) Int. Cl. C12N 1/21 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.03.19

(54) СИСТЕМЫ БИОПРОИЗВОДСТВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(31) 62/992,689; 63/052,664

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.20; 2020.07.16

Карими Тахерех, Нгуен Труонг Хуу,

(33) US

Ханифзадех Мохаммад Матин, Кук

(86) PCT/US2021/023332

Олбрайт Саманта, Куэва Мигель

(87) WO 2021/189003 2021.09.23

Эухенио (US)

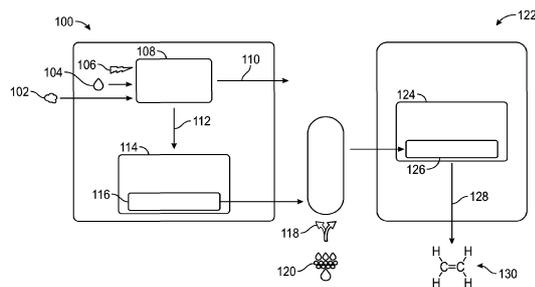
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

СЕМВИТА ФЭКТОРИ, ИНК. (US)

Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к системам биопроизводства для получения органического продукта. Изобретение относится к рекомбинантным микроорганизмам, имеющим улучшенную способность к продукции органического субстрата, и к рекомбинантным микроорганизмам, имеющим улучшенную способность к продукции органического продукта. Преимущество систем и рекомбинантных микроорганизмов, раскрытых в данном документе, может включать способность отдельно продуцировать органический продукт и органический субстрат, который генерирует культуральную примесь во время его продукции. Изобретение относится к способам продуцирования органического продукта с использованием систем биопроизводства и рекомбинантных микроорганизмов, раскрытых в данном документе.



A1

202292688

202292688

A1

СИСТЕМЫ БИОПРОИЗВОДСТВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

[0001] Настоящее раскрытие относится к системам биопроизводства для получения органического продукта. Настоящее раскрытие относится к рекомбинантным микроорганизмам, имеющим улучшенную способность к продукции органического субстрата, и к рекомбинантным микроорганизмам, имеющим улучшенную способность к продукции органического продукта. Преимущество данных систем и рекомбинантных микроорганизмов, раскрытых в данном документе, может включать способность отдельно и безопасно продуцировать органический продукт и органический субстрат, который генерирует культуральную примесь во время его продукции. Настоящее раскрытие относится к способам продуцирования органического продукта с использованием систем биопроизводства и рекомбинантных микроорганизмов, раскрытых в данном документе. Преимущество способов, раскрытых в данном документе, может включать увеличенную продукцию одного или более чем одного органического продукта из микробных культур. Преимуществом способов данного документа может быть способность продуцировать органический продукт, содержащий пониженное количество побочных продуктов или примесей культуры. Дополнительным преимуществом может быть применение диоксида углерода для производства биоэтилена, полезного в качестве сырья для производства пластмасс, тканей и химических веществ, и для применения в других приложениях. Другим преимуществом является применение диоксида углерода для производства алкенов, алканов, полиенов и спиртов. Другое преимущество данного способа включает избежание совместной продукции кислорода и летучих органических соединений.

[0002] Другое преимущество способов и систем, раскрытых в данном документе, может включать уменьшение избытка диоксида углерода в окружающей среде.

30

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Повышенный спрос на энергию во всем мире привел к избытку диоксида углерода из-за сжигания ископаемого топлива, такого как нефть и газ, значительно

способствуя тому, что многие называют кризисом глобального потепления. Промышленность так сильно желает предотвратить поступление диоксида углерода в атмосферу, что она обратилась к улавливанию диоксида углерода из выхлопных газов и атмосферы. Она затем хранит диоксид углерода в подземной среде. Однако все
5 современные известные способы просто удаляют диоксид углерода из атмосферы посредством хранения его под землей. Они фактически не превращают диоксид углерода обратно в какое-либо другое полезное вещество.

[0004] Ограниченное предложение углеводородного сырья и его вредное влияние на среду побудило разработки в области возобновляемых источников топлива и
10 химических реактивов. Технологии, которые превращают биомассу и захватывают диоксид углерода в новые продукты, такие как биотопливо, могут помочь снизить импорт нефти и выбросы диоксида углерода. Имеется растущий интерес к производству топлива и других полезных органических продуктов с повышенной добавленной стоимостью из органических отходов с использованием биологических способов. Среди данных
15 органических продуктов этилен является шире всего производимым органическим соединением в мире, полезным в широком спектре производств, включая производство пластмасс, растворителей и тканей. Этилен в настоящее время производится посредством парового крекинга ископаемого топлива или дегидрогенизацией этана. С миллионами метрических тонн этилена, производимого каждый год, однако, такими
20 способами производится более, чем достаточно диоксида углерода, значительно способствуя глобальному углеродному следу. Соответственно, производство этилена посредством возобновляемых способов помогло бы удовлетворить огромный спрос со стороны энергетической и химической промышленности, в то же самое время помогая защищать окружающую среду.

[0005] Поскольку этилен потенциально представляет собой возобновляемое сырье, имеется значительный интерес в разработке технологий для производства этилена из возобновляемых источников, таких как диоксид углерода и биомасса. Биоэтилен в настоящее время производится с использованием этанола, полученного из кукурузы или сахарного тростника. Целый ряд микробов, включая бактерии и грибы,
30 продуцируют в природе этилен в небольших количествах. В нескольких видах микробов продемонстрировали гетерологичную экспрессию этилен-продуцирующего фермента, где хозяева могли использовать широкий спектр источников углерода, включая лигноцеллюлозу и диоксид углерода.

[0006] На основе современной истории, справедливости ради, стоит отметить то, что избыток диоксида углерода в атмосфере, а также других органических отходов не будет снижен, пока не станет выгодно их снижение. Остается потребность в улучшениях систем и способов микробного биопроизводства для того, чтобы производить полезные органические продукты, такие как этилен, в коммерческом масштабе. Остается потребность в производстве углеводов посредством более эффективных возобновимых технологий. Остается потребность в удалении избытка диоксида углерода из атмосферы. Остается потребность в улучшенных способах для безопасного производства этилена из возобновляемого сырья для промышленных и коммерческих применений.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Воплощения данного документа направлены на системы биопроизводства для получения органического продукта. В разных воплощениях данная система включает по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора. В разных воплощениях данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата, где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм. В разных воплощениях данный первый рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического субстрата, экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, способен использовать источник углерода для продукции органического субстрата и продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество. В разных воплощениях данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта, где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм. В разных воплощениях данный второй рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического продукта, экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по

меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, и способен использовать органический субстрат для продукции по меньшей мере одного органического продукта.

[0008] В некоторых воплощениях данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора включает первый культуральный сосуд биореактора, включающий выпускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник энергии; и второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока среды, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического продукта. В таких воплощениях первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта. В некоторых воплощениях первый культуральный сосуд биореактора или второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает порт для сбора биомассы. В некоторых воплощениях источник энергии включает солнечный свет, источник солнечной энергии, источник электрической энергии или их комбинацию. В некоторых воплощениях данная система дополнительно включает блок карбонизации, аминовый десорбер, установку аминокислотной очистки, каталитический конвертер, холодильник, компрессор, башню щелочения, сушилку или их комбинацию. В некоторых воплощениях второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает выпускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа, источник энергии или их комбинацию.

[0009] В некоторых воплощениях источник углерода включает диоксид углерода, монооксид углерода, *n*-алкан, этанол, растительное масло, глицерин, глюкозу, сахарозу, моносахарид, дисахарид, полисахарид или их комбинацию. В некоторых воплощениях летучий газ включает кислород, метан или их комбинацию. В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический субстрат включает альфа-кетоглутарат, сахарозу, глюкозу, глицерин, моносахарид, дисахарид, полисахарид или их комбинацию. В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический продукт включает этилен, спирт, метанол, этанол, пропанол, бутанол, этандиол, органическую кислоту, пропионовую кислоту, уксусную кислоту, альдегид, формальдегид, длинноцепочечную жирную кислоту, *n*-алкан, углеводород или их комбинацию.

[0010] В некоторых воплощениях источник углерода включает диоксид углерода, монооксид углерода, глицерин, глюкозу, фруктозу, сахарозу, моносахарид, дисахарид,

полисахарид, гликоген, уксусную кислоту, жирную кислоту или их комбинацию. В некоторых воплощениях источник энергии включает солнечный свет, источник солнечной энергии, источник электрической энергии или их комбинацию. В некоторых воплощениях летучий газ включает кислород, метан или их комбинацию. В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический субстрат включает альфа-кетоглутарат, сахарозу, глюкозу, фруктозу, ксилозу, арабинозу, галактозу, глицерин, моносахарид, дисахарид, полисахарид, гликоген, жирную кислоту или их комбинацию. В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический продукт включает спирт, метанол, этанол, пропанол, бутанол, этандиол, органическую кислоту, пропионовую кислоту, уксусную кислоту, альдегид, формальдегид, длинноцепочечную жирную кислоту, *n*-алкан, углеводород, этан, пропен, бутен, этан, пропан, бутан или их комбинацию. В некоторых воплощениях второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа, источник энергии или их комбинацию.

[0011] В некоторых воплощениях культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединяют в одном культуральном сосуде биореактора. В других воплощениях культуральный раствор органического субстрата и культуру органического продукта разделяют фильтром. В некоторых воплощениях данный фильтр включает размер пор от примерно 0,2 мкм до примерно 10 мкм или более.

[0012] В некоторых воплощениях системы в данном документе по меньшей мере один органический субстрат включает альфа-кетоглутарат (AKG), где количество по меньшей мере одного фермента, образующего AKG, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцированное относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий AKG. В таких воплощениях по меньшей мере один органический продукт включает этилен, где количество по меньшей мере одного фермента, образующего этилен (EFE), продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцированное относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок

альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP) посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности, образующей AKGP.

[0013] В некоторых воплощениях по меньшей мере один фермент, образующий AKG, включает белок изоцитрат дегидрогеназы (ICD), белок глутаматдегидрогеназу (GDH) или их комбинацию. В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок ICD, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка ICD, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, или первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка GDH, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6, или их комбинацию. В некоторых воплощениях второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок EFE, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 7, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка EFE, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 8.

[0014] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из фотосинтезирующих бактерий, *Cyanobacteria*, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas* и *Chlamydomonas reinhardtii*. В некоторых воплощениях второй рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Geobacteria*, *Arthrobacter paraffineus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas Putida*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Serratia marcescens*, *Bacillus metatherium*, *Candida paludigena*, *Pichia inositovora*, *Torulopsis glabrata*, *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cereviciae*, вид рода *Aspergillus*, *Bacillus subtilis* и вид рода *Lactobacillus*.

[0015] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм включает дельта-glgс мутантный микроорганизм, не имеющий экспрессии белка глюкозо-1-фосфатаденилилтрансферазы. В некоторых воплощениях первый рекомбинантный

микроорганизм экспрессирует белок сахарозосинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка сахарозосинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозофосфатсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 11, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности сахарозофосфатсинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 12.

[0016] В некоторых воплощениях количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 20 граммов до примерно 100 граммов на литр или более культурального раствора органического продукта.

[0017] В некоторых воплощениях второй рекомбинантный микроорганизм включает *E. coli*, и количество белка EFE, продуцируемого данным вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 30% до примерно 80% или более от общего клеточного количества белка второго рекомбинантного микроорганизма. В некоторых воплощениях скорость продукции этилена, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 100 миллионов фунтов/год (45,4 миллиона кг/год) до примерно 1 миллиарда фунтов/год (454 миллиона кг/год) или больше. В некоторых воплощениях концентрация популяции клеток второго рекомбинантного микроорганизма находится в диапазоне от примерно 10^7 до примерно 10^{13} клеток на миллилитр, или сухая масса клеток на литр культурального раствора органического

продукта – от примерно 100 граммов до примерно 300 граммов сухой массы клеток на литр.

[0018] В некоторых воплощениях ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую фермент, образующий АКГ, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где данный микробный экспрессионный вектор включает плазмиду бактериального вектора, нуклеотид-проводник гомологичной рекомбинантной системы, устойчивую к антибиотикам систему и вспомогательную систему для очистки и выявления белка, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет число копий в микробном экспрессионном векторе от примерно 2 до примерно 500 или более. В некоторых воплощениях данный микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии. В некоторых воплощениях по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор *Lac*, промотор T7, промотор *CspA*, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор *psbA* или их комбинацию.

[0019] Воплощения данного документа направлены на способы получения органического продукта. В одном воплощении данный способ включает предложение системы биопроизводства, включающей следующее: по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора; где данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата; где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм; где данный первый рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического субстрата, экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, способен использовать источник углерода для продукции органического субстрата и продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; где данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта; где данный культуральный раствор

органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм; где данный второй рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического продукта, экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, и способен использовать органический субстрат с продукцией по меньшей мере одного органического продукта; где по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора включает первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник энергии; и данная система включает второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического продукта; где данный первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и данный второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта. В таких воплощениях данный способ включает следующее: культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном сосуде биореактора; и культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде биореактора.

[0020] В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает удаление некоторого количества по меньшей мере одного летучего газа из культурального раствора органического субстрата через выпускное отверстие для летучего газа. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает удаление некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта из культурального раствора органического продукта через выпускное отверстие для органического продукта. В некоторых воплощениях, при условии, что источник углерода включает диоксид углерода, данный способ дополнительно включает подпитку некоторого количества диоксида углерода из источника диоксида углерода в культуральный раствор органического субстрата через впускное отверстие для источника

углерода. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание уровня рН культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 5,0 до примерно 8,5. В некоторых воплощениях данный способ включает поддержание культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта при температуре от примерно 25 градусов Цельсия до примерно 70 градусов Цельсия или больше.

[0021] В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или меньше, в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора.

[0022] В некоторых воплощениях, при условии, что первый культуральный сосуд биореактора или второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает порт для сбора биомассы, данный способ дополнительно включает осуществление сбора некоторого количества биомассы, продуцированной первым рекомбинантным микроорганизмом или вторым рекомбинантным микроорганизмом, через порт для сбора биомассы.

[0023] В некоторых воплощениях способов данного документа ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую органический продукт, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где по меньшей мере один микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает осуществление контроля количества по меньшей мере одного органического субстрата или количества по меньшей мере одного органического продукта, продуцированного добавлением по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата или культуральный раствор органического продукта. В некоторых воплощениях по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор Lac, промотор T7, промотор CspA, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор psbA или их комбинацию; и по меньшей мере один индуктор промотора

включает лактозу, ксилозу, IPTG (изопропилтиогалактозид), холодовой шок, тепловой шок или их комбинацию.

[0024] В некоторых воплощениях способов в данном документе по меньшей мере один органический субстрат включает АКГ. В таких воплощениях по меньшей мере один органический продукт включает этилен. В некоторых воплощениях, при условии, что по меньшей мере одна культуральная примесь органического субстрата включает по меньшей мере один летучий газ, данный способ дополнительно включает удаление по меньшей мере одного летучего газа через выпускное отверстие для летучего газа. В некоторых воплощениях данный способ включает выделение некоторого количества этилена, продуцируемого со скоростью от примерно 100 миллионов фунтов/год (45,4 миллионов кг/год) до примерно 1 миллиарда фунтов/год (454 миллиона кг/год) или больше. В некоторых воплощениях данное количество продуцированного этилена содержит количество летучего газа примерно 1 мольный процент или меньше.

[0025] Воплощения в данном документе направлены на способы получения органического продукта, где данный способ включает предложение системы биопроизводства, включающей следующее: по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора; где по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата; где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный организм; где данный первый рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического субстрата, экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, способен использовать источник углерода для продуцирования органического субстрата и продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; и где по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта; где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм; где данный второй рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического продукта, экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента,

образующего органический продукт, и способен использовать органический субстрат для продукции по меньшей мере одного органического продукта. В таких воплощениях культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединяют в одном культуральном сосуде биореактора, где ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, вставлена в первый микробный экспрессионный вектор, где данная ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая фермент, образующий органический продукт, вставлена во второй микробный экспрессионный вектор, и где каждый из первого и второго микробного экспрессионного вектора включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии. В таких воплощениях данный способ включает предоставление источника углерода, соединенного с впускным отверстием для источника углерода; культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном сосуде биореактора; продуцирование определенного количества по меньшей мере одного органического субстрата добавлением по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата в первый момент времени; культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде биореактора; и продуцирование определенного количества по меньшей мере одного органического продукта добавлением по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического продукта во второй момент времени. В некоторых воплощениях данный способ включает снижение количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или меньше в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора перед вторым моментом времени.

[0026] Воплощения в данном документе направлены на способы производства этилена. В некоторых воплощениях данный способ включает предложение системы биопроизводства, включающей следующее: первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник энергии; и второй культуральный сосуд биореактора,

включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического продукта; где первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта; где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического субстрата, где данный органический субстрат включает АКГ, где данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, где данный фермент, образующий органический субстрат, включает фермент, образующий АКГ, где данный первый рекомбинантный микроорганизм способен использовать источник углерода для продукции некоторого количества АКГ, где данный первый рекомбинантный микроорганизм продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; где данный летучий газ включает кислород, где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического продукта, где данный органический продукт включает этилен, где данный второй рекомбинантный организм экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, где данный фермент, образующий органический продукт, включает EFE, и где данный второй рекомбинантный организм способен использовать АКГ для продукции некоторого количества этилена. В некоторых воплощениях данный способ включает культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества АКГ в первом культуральном сосуде биореактора; культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества EFE во втором культуральном сосуде биореактора; удаление некоторого количества кислорода из культурального раствора органического

субстрата через выпускное отверстие для летучего газа; и удаление некоторого количества EFE из культурального раствора органического продукта через выпускное отверстие для органического продукта.

5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0027] Вышеизложенное краткое описание сущности изобретения, а также следующее подробное описание воплощений будет лучше понятно при прочтении в сочетании с приложенными графическими материалами. С целью иллюстрации в графических материалах показаны некоторые воплощения, которые могут быть предпочтительными. Следует понимать, что показанные воплощения не ограничиваются точными показанными подробностями. Если не отмечено иное, данные графические материалы приводятся не в масштабе.

[0028] Фиг. 1 представляет собой иллюстрацию, показывающую продукцию органического субстрата и органического продукта микроорганизмами согласно воплощениям в данном документе.

[0029] Фиг. 2 представляет собой иллюстрацию системы биопроизводства согласно воплощениям в данном документе.

[0030] Фиг. 3А представляет собой график, демонстрирующий продукцию этилена в культурах *E. coli*, экспрессирующих маленькое, среднее или большое число копий гена EFE, и культивируемых в разных ростовых средах согласно воплощениям в данном документе.

[0031] Фиг. 3В представляет собой график, демонстрирующий продукцию этилена в культурах *E. coli*, выращенных без добавки или с разными ростовыми добавками, согласно воплощениям в данном документе.

[0032] Фиг. 4 представляет собой блок-схему, показывающую воплощение способа продуцирования органического продукта в данном документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0033] Если не отмечено иное, все измерения приводятся в стандартных метрических единицах.

[0034] Если не отмечено иное, все случаи слова в единственном числе могут относиться к одному или более чем одному слову, которое они модифицируют.

[0035] Если не отмечено иное, фраза «по меньшей мере один из» означает один или более чем один объект. Например, «по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора» означает один культуральный сосуд биореактора, более чем один культуральный сосуд биореактора или их любую комбинацию.

[0036] Если не отмечено иное, термин «примерно» относится к плюс/минус 10% непроцентного числа, которое описывается, с округлением до ближайшего целого числа. Например, примерно 20 граммов включали бы от 18 до 22 граммов. Если не отмечено иное, термин «примерно» относится к плюс/минус 5% процентного числа. Например, примерно 50% включали бы от 45 до 55%. Когда термин «примерно» обсуждается в показателях интервала, тогда данный термин относится к подходящему количеству, меньшему, чем нижняя граница, и большему, чем верхняя граница. Например, от примерно 100 до примерно 300 граммов сухой массы клеток на литр включали бы от 90 до 330 граммов сухой массы клеток на литр.

[0037] Если не отмечено иное, свойства (высота, ширина, длина, отношение и т.д.), как описано в данном документе, следует понимать как усредненные измерения.

[0038] Если не отмечено иное, термины «предоставлять», «предоставленный» или «предоставляя» относятся к поставке, продукции, приобретению, изготовлению, сборке, образованию, выбору, конфигурации, превращанию, введению, добавлению или включению любого элемента, количества, компонента, реактива, количества, измерения или анализа любого способа или системы любого воплощения в данном документе.

[0039] Идентичность последовательности в данном документе определяется как связь между двумя или более чем двумя аминокислотными (полипептида или белка) последовательностями, или между двумя или более чем двумя последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотида) при определении посредством сравнения данных последовательностей. Обычно идентичности или сходства последовательностей сравниваются по всей длине сравниваемых последовательностей. В данной области термин «идентичность» также означает степень родства последовательностей между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот, в зависимости от обстоятельств, при определении по соответствию между отрезками таких последовательностей. «Сходство» между двумя аминокислотными последовательностями определяется посредством сравнения аминокислотной

последовательности и ее консервативных аминокислотных замен одного полипептида с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» можно легко рассчитывать разными способами, известными специалистам в данной области. В одном воплощении идентичность последовательности определяется сравнением всей длины последовательностей, как идентифицировано в данном документе.

[0040] Разрабатываются типичные способы для определения идентичности, чтобы дать наибольшее соответствие между анализируемыми последовательностями. Способы для определения идентичности и сходства закодированы в общедоступных компьютерных программах. Типичные способы на основе компьютерных программ для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, например, BestFit, BLASTP (базовое средство поиска локального выравнивания белка), BLASTN (базовое средство поиска локального выравнивания нуклеотидов) и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), общедоступные в NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) и других источниках (BLAST.RTM. Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894). Самым типичным используемым алгоритмом является EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite). Типичные параметры для сравнения аминокислотных последовательностей с использованием EMBOSS представляют собой 10,0 за открытие пробела, 0,5 за расширение пробела, матрицу Blosum. Типичные параметры для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот с использованием EMBOSS представляют собой 10,0 за открытие пробела, 0,5 за расширение пробела, полную матрицу ДНК (матрицу идентичности ДНК). В некоторых воплощениях возможно сравнивать последовательности ДНК/белка среди разных видов для определения гомологии последовательностей с использованием данных онлайн, таких как Gen bank, KEG, BLAST и Ensemble.

[0041] Возможно, при определении степени сходства аминокислот специалист также может принимать во внимание так называемые «консервативные» аминокислотные замены, как будет очевидно специалисту. Термин «консервативные аминокислотные замены» относится к взаимозаменяемости остатков, имеющих аналогичные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи с гидроксилом, представляет собой серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амидсодержащие боковые цепи, представляет

собой аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Раскрытые в данном документе варианты аминокислотной последовательности с заменами представляют собой варианты, в которых по меньшей мере один остаток в раскрытых последовательностях был удален, и другой остаток был вставлен на его место. Предпочтительно замена аминокислоты является консервативной. Предпочтительные консервативные замены для каждой из встречающихся в природе аминокислот являются следующими: Ala на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или His; Asp на Glu; Cys на Ser или Ala; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Pro; His на Asn или Gln; Ile на Leu или Val; Leu на Ile или Val; Lys на Arg; Gln на Glu; Met на Leu или Ile; Phe на Met, Leu или Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или Phe; и Val на Ile или Leu.

[0042] Если не утверждается иное, термин «адаптированный» или «с адаптированными кодонами» относится к «оптимизации кодонов» полинуклеотидов, как раскрыто в данном документе, последовательности которых могут быть природными или ненативными, или могут быть адаптированными для экспрессии в других микроорганизмах. Оптимизация кодонов адаптирует применение кодонов для кодируемого полипептида в направлении отклонения кодонов организма, в котором подлежит экспрессии данный полипептид. Оптимизация кодонов обычно помогает увеличивать уровень продукции кодируемого полипептида в клетке-хозяине.

Выбросы диоксида углерода, возникающие из-за применения ископаемого топлива, продолжают увеличиваться в глобальном масштабе. Уменьшение уровней атмосферного диоксида углерода является ключом к смягчению или обращению изменения климата. Захват и хранение углерода (CCS) представляет собой значимую технологию для удаления промышленного диоксида углерода из атмосферы; оценивали, что свыше 20 триллионов тон диоксида углерода, захваченных из переработки нефти и других промышленных процессов, можно транспортировать и хранить в разных типах подземных сред или емкостей для хранения. Хотя CCS и является рентабельным и финансово доступным способом уменьшения выбросов диоксида углерода по сравнению с другими доступными в настоящее время способами, сохраняется проблема в том, что

диоксид углерода просто хранится под землей, пока он не улутучится. Следовательно, способы CCS не обеспечивают природосберегающее решение для уменьшения избытка диоксида углерода в атмосфере. Также для промышленности имеется мало финансовых стимулов для закачивания диоксида углерода в подземные среды, если она не
5 принуждается нормами охраны окружающей среды, или ей не платят за осуществления этого в качестве части ее бизнес-модели. Пожалуй, глобальное потепление является кризисом, так как оно сулит большую продукцию диоксида углерода, чем удаление диоксида углерода.

[0044] Сохраняется потребность в удалении избытка диоксида углерода из
10 атмосферы более эффективными и природосберегающими способами. Сохраняется потребность в технологиях, которые могут обуздать избыточное количество диоксида углерода для производства полезных продуктов и для других применений, которые являются полезными для промышленности и окружающей среды.

[0045] Вызовы ограниченного предложения углеводородного сырья и вредного
15 влияния операций с углеводородным сырьем на среду побуждали растущее внимание к максимизации результата на основе существующих ресурсов и к разработке возобновляемых источников топлива и химических реактивов, которые могут минимизировать влияние на окружающую среду. Технологии, которые превращают биомассу и фиксируют диоксид углерода в новых продуктах, таких как биотопливо, могут
20 помочь снизить импорт нефти и выбросы диоксида углерода. Имеется растущий интерес к производству топлива с повышенной добавленной стоимостью и других полезных органических продуктов из органических отходов с использованием биологических способов.

[0046] Среди таких ценных органических продуктов этилен представляет собой
25 наиболее производимое органическое соединение в мире, полезное в широком спектре промышленных производств, включая производство пластмасс, растворителей и тканей. Поскольку этилен представляет собой потенциально возобновляемое сырье, имелся значительный интерес к разработке технологий для производства этилена из возобновляемых источников, таких как диоксид углерода и биомасса. Этилен в
30 настоящее время производится посредством парового крекинга ископаемого топлива или дегидрогенизацией этана. С миллионами метрических тонн этилена, производимого каждый год, однако, такими способами производится более, чем достаточно диоксида углерода, значительно способствуя глобальному углеродному следу. Соответственно,

производство этилена посредством возобновляемых способов помогло бы удовлетворить огромный спрос со стороны энергетической и химической промышленности, в то же самое время также помогая защищать окружающую среду.

[0047] Разработали традиционные способы производства биоэтилена с использованием этанола, полученного из кукурузы или сахарного тростника. Однако производство биоэтилена из биомассы (например, кукурузы и сахарного тростника) представляет собой времязатратный и нерентабельный способ, требующий наличия земли, транспортировки и расщепления биомассы. Например, существуют массовые неэффективности, ассоциированные с выращиванием и транспортировкой кукурузы и сахарного тростника, которые сами по себе вызывают выбросы CO₂. Целый ряд 5 микробов, включая бактерии и грибы, продуцируют в природе этилен в малых количествах. Такие микробы используют этиленобразующий фермент (EFE). В одном типе пути этилена, таком как обнаруженный у *Pseudomonas syringae* и *Penicillium digitatum*, используется альфа-кетоглутарат (AKG) и аргинин в качестве субстратов в реакции, катализируемой этиленобразующим ферментом. Этиленобразующие ферменты 15 предоставляют многообещающую мишень, так как для продукции этилена может быть достаточной экспрессия одного гена. В нескольких видах микробов продемонстрировали методики с применением гетерологичной экспрессии EFE, где микробные хозяева могли использовать целый ряд источников углерода в цикле Кальвина, включая 20 лигноцеллюлозу и диоксид углерода. К тому же, недавние разработки дешевых высокопроизводительных методик генетического секвенирования привели к увеличивающемуся пониманию экспрессии микробных генов. Однако доступные в настоящее время технологии не продуцируют промышленно релевантных количеств этилена посредством микробной активности. В результате, число и объем биореакторов, 25 требующихся для производства достаточных количеств этилена, могут быть неприемлемо высокими.

[0048] Другой вызов, который может возникать в микробных способах получения органического продукта заключается в том, что могут продуцироваться побочные продукты микробного метаболизма в качестве примесей в биореакторной культуре, 30 наряду с органическим продуктом. Смесь органического продукта и примесей побочного продукта может прибавлять дополнительные сложности в последующем способе очистки и дополнительные затраты. Культуральные примеси могут включать летучие газы, такие как кислород, который может совместно продуцироваться с летучими органическими

продуктами. Например, кислород типично продуцируется фотосинтезирующими микроорганизмами. Концентрация кислорода в отходящем газе биореактора возможно может быть достаточно высокой для представления риска для безопасности или может превышать максимальные количества, допустимые нормативами. Еще одним другим
5 вызовом является то, как обращаться с переработкой другого побочного продукта: биомассы, которая продуцируется в результате роста микробных культур.

[0049] Сохраняется потребность в улучшениях микробной продукции, которая может продуцировать органические продукты, включая этилен, в коммерческом масштабе с большей эффективностью и меньшими затратами. Сохраняется потребность в
10 улучшениях микробной продукции, которые могут уменьшать или устранять совместную продукцию органических продуктов и культуральных примесей, включая летучие газы, безопасно при одновременном соответствии с правительственными нормативами. Сохраняется потребность в улучшениях при производстве и обращении с биомассой при микробной продукции органического продукта. Сохраняется потребность в способах
15 применения сырья диоксида углерода для производства органических продуктов, таких как биоэтилен, которые являются полезными для промышленных и других применений.

[0050] Воплощения настоящего раскрытия могут давать преимущество удаления диоксида углерода из среды, наряду с преимуществом производства ценных органических продуктов, подходящих для коммерческой реализации. Воплощения
20 настоящего раскрытия, таким образом, могут предложить возобновляемую альтернативу традиционному хранению диоксида углерода посредством применения рекомбинантной микробной технологии для превращения диоксида углерода в одно или более чем одно полезное органическое соединение. Одним преимуществом воплощений настоящего раскрытия является то, что данные системы и способы могут сделать экономически
25 прибыльным удаление диоксида углерода из среды для нефтяной или газовой компании. Нефтяная компания или ее подрядчик, вместо закачивания диоксида углерода в подземную среду или оставления изолированного диоксида углерода под землей, могли бы применять диоксид углерода в качестве источника углерода для культивирования рекомбинантных микроорганизмов для превращения диоксида углерода в полезные
30 органические продукты рентабельным способом. Также можно избежать значительного количества диоксида углерода, генерированного посредством транспортировки, так как данные способы можно практиковать на месте, или ожидалось бы, что они потребляют больше диоксида углерода, чем продуцируют.

[0051] Самыми эффективными способами защиты среды являются те способы, которые фактически применяют люди. Чем более прибыльными являются данные способы, тем с большей вероятностью люди применяют их. Одним из преимуществ способов, раскрытых в данном документе, является рентабельность применения системы биореактора. Воплощения настоящего раскрытия могут давать преимущество конструирования фотосинтезирующего микроорганизма, продуцирующего органический субстрат, посредством осуществления адаптации релевантных метаболических путей сигнализации с продукцией данного органического субстрата в промышленном масштабе. Воплощения настоящего раскрытия могут давать преимущество конструирования микроорганизма, продуцирующего органический продукт, который может использовать органический субстрат, продуцируемый фотосинтезирующим микроорганизмом, с продукцией органического продукта, посредством осуществления адаптации релевантных метаболических путей сигнализации с продукцией данного органического продукта в промышленном масштабе. Такие воплощения могут давать преимущества повышенной эффективности получения органического продукта и меньших затрат. Такие воплощения могут делать прибыльным удаление диоксида углерода из атмосферы и пассивную генерацию ценных органических соединений, в то время как микробы делают работу, в ранее невообразимом масштабе.

[0052] Воплощения настоящего раскрытия также могут давать преимущество отделения продукции одной или более чем одной культуральной примеси от продукции органических продуктов, таким образом, уменьшая или устраняя совместную продукцию органических продуктов и культуральных примесей. Такие воплощения могут давать преимущества более безопасного получения органического продукта, а также уменьшения трудностей и затрат на последующую очистку. Воплощения в данном документе также могут давать преимущества минимизации продукции биомассы при одновременном облегчении применения биомассы, которая продуцируется, для полезных приложений.

[0053] Что случилось бы с кризисом глобального потепления, если бы стало более прибыльным или просто таким же прибыльным превращение диоксида углерода в ценные органические соединения, как стала прибыльной изначальная генерация диоксида углерода? Раскрытые в данном случае способы могли бы превратить производителей энергии из компаний глобального потепления в компании глобального похолодания.

[0054] Настоящее раскрытие относится к системам биопроизводства для получения органического продукта. В некоторых воплощениях такая система включает культуральный раствор органического субстрата, содержащий первый рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции субстрата, и культуральный раствор органического продукта, содержащий второй рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического продукта. В качестве общего обзора продукции органического субстрата и продукции органического продукта посредством культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта, соответственно, со ссылкой на ФИГ. 1, культуральный раствор 100 органического субстрата фиксирует диоксид углерода 102, наряду с водой 104 и светом 106 в фотосинтетических световых реакциях 108, продуцируя культуральную примесь 110 в виде кислорода и энергетические субстраты 112; ферментативные пути 114 используют энергетические субстраты 112 с продукцией органического субстрата альфа-кетоглутарата 116. Органический субстрат альфа-кетоглутарат 116 поступает в культуральный раствор 122 органического продукта посредством продукции посредством контроля индуктором промотора в моменты времени 118, или посредством фильтрации или отделения направления потока 120. В ферментативных путях 124 используется альфа-кетоглутарат 126 культурального раствора органического продукта и фермент 128, образующий этилен, для продукции органического продукта 130 – этилена.

[0055] В качестве общего обзора системы биопроизводства, раскрытой в данном документе, со ссылкой на ФИГ. 2, система 200 включает следующее: первый культуральный сосуд 202 биореактора, содержащий культуральный раствор 204 органического субстрата, впускное отверстие 206 источника углерода, выпускное отверстие 208 летучего газа, источник 210 энергии и/или света, компрессор/холодильник 212, включающий выпускное отверстие 214 воды, соединенное с первым культуральным сосудом 202 биореактора и выпускным отверстием 216 воды; второй культуральный сосуд 218 биореактора, содержащий культуральный раствор 220 органического продукта и включающий путь 222 потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом 202 биореактора и вторым культуральным сосудом 218 биореактора, и выпускное отверстие 224 органического продукта; десорбер 226 амина, включающий выпускное отверстие 228 обогащенного амина и впускное отверстие 230 десорбированного амина, соединенное с установкой 232 аминокислотной очистки; выпускное

отверстие 234 диоксида углерода, соединенное с и находящееся между установкой 232 аминокислоты и первым культуральным сосудом 202 биореактора; компрессор/холодильник 236, включающий выпускное отверстие 238 воды; каталитический преобразователь 240; башня щелочения 242; сушилка 244, включающая 5 выпускное отверстие 246 регенерирующего газа и выпускное отверстие 248 воды; компрессор/насос 250 и выпускное отверстие 252 органического продукта.

[0056] Настоящее раскрытие относилось к способам получения органического продукта. В качестве общего обзора способа, раскрытого в данном документе, со ссылкой на ФИГ. 4, данный способ включает предоставление системы 102 биопроизводства 10 согласно воплощениям в данном документе; культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора, содержащем культуральный раствор органического субстрата, в условиях, достаточных для продукции 15 некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном сосуде 104 биореактора; культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора, содержащем культуральный раствор органического продукта, в условиях, достаточных для продукции 20 некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде 106 биореактора; удаление некоторого количества по меньшей мере одного летучего газа из культуры 108 органического субстрата; удаление некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта из культурального раствора 110 органического продукта; подпитку некоторым количеством диоксида углерода из источника диоксида углерода культурального раствора 112 органического субстрата; поддержание 114 уровня pH культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 5,0 до примерно 8,5; отбор 25 некоторого количества биомассы, продуцированной первым рекомбинантным микроорганизмом, из первого культурального сосуда 116 биореактора, отбор некоторого количества биомассы, продуцированной вторым рекомбинантным микроорганизмом, из второго культурального сосуда 118 биореактора; и поддержание некоторого количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему 30 до примерно 1% по объему или меньше, в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда 120 биореактора.

Воплощения систем биопроизводства

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

[0057] Воплощения в данном документе направлены на системы биопроизводства для получения органического продукта. В разных воплощениях данная система включает по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора. В разных воплощениях данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата, где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм. В разных воплощениях данный первый рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического субстрата, экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, способен использовать источник углерода для продукции данного органического субстрата и продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердый побочный продукт или другой нежелательный продукт. Примером примеси мог бы быть кислород или метан или их комбинация в газообразном или жидком состоянии. В разных воплощениях данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта, где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм. В разных воплощениях данный второй рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического продукта, экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, и способен использовать органический субстрат для продукции по меньшей мере одного органического продукта. В разных воплощениях данный по меньшей мере один органический продукт может включать алкен, алкан, полиен, спирт, летучее органическое соединение или их комбинацию.

[0058] В некоторых воплощениях данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора включает первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник энергии; и второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для

органического продукта. В таких воплощениях первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта. Такие воплощения могут давать преимущество отделения продукции по меньшей мере одной культуральной примеси органического субстрата первым рекомбинантным микроорганизмом от продукции по меньшей мере одного органического продукта вторым рекомбинантным микроорганизмом. В таких воплощениях данный органический субстрат и другие питательные вещества могут быть предоставлены второму рекомбинантному микроорганизму через путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, с обеспечением роста второго рекомбинантного микроорганизма и продукции органического продукта. В таких воплощениях при условии, что по меньшей мере одна культуральная примесь органического субстрата включает летучий газ, данный летучий газ может быть удален из культурального раствора органического субстрата через выпускное отверстие для летучего газа. В некоторых воплощениях данный летучий газ включает кислород, метан или их комбинацию. Такие воплощения могут давать преимущества улучшенного контроля скоростей роста первого и второго рекомбинантного микроорганизмов, улучшенные скорости фиксации углерода и улучшенный выход органического продукта.

[0059] В таких воплощениях источник углерода может быть предоставлен через выпускное отверстие для источника углерода в качестве питательного вещества для поддержки роста первого рекомбинантного микроорганизма и продукции по меньшей мере одного органического субстрата. В некоторых воплощениях данный источник углерода включает диоксид углерода, монооксид углерода, растительное масло, глицерин, глюкозу, сахарозу, моносахарид, дисахарид, полисахарид или их комбинацию. Такие воплощения могут давать преимущество использования промышленного диоксида углерода в направлении получения органического продукта. В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический субстрат, продуцированный первым рекомбинантным микроорганизмом, включает альфа-кетоглутарат (AKG), сахарозу, глюкозу, глицерин, моносахарид, дисахарид, полисахарид или их комбинацию. Такие воплощения могут давать преимущество предоставления нелетучего органического субстрата, продуцированного в первом культуральном сосуде биореактора, который может использоваться для продукции органического продукта во втором культуральном сосуде

биореактора. В некоторых воплощениях данный второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа, источник энергии или их комбинацию.

5 [0060] В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический продукт, продуцированный вторым рекомбинантным микроорганизмом, включает этилен, спирт, метанол, этанол, пропанол, бутанол, этандиол, органическую кислоту, пропионовую кислоту, уксусную кислоту, альдегид, формальдегид, длинноцепочечную жирную кислоту, *n*-алкан, углеводород или их комбинацию. В некоторых воплощениях по меньшей мере один органический субстрат включает АКГ, а по меньшей мере один органический
10 продукт включает этилен.

[0061] В некоторых воплощениях первый культуральный сосуд биореактора или второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает порт для сбора биомассы. В таких воплощениях порт для сбора биомассы может давать преимущество обеспечения сбора биомассы из первой культуры биореактора, второй культуры
15 биореактора или их комбинации для утилизации или переработки данной биомассы для применения в удобрении, сырье, биотопливе или других приложениях.

[0062] В некоторых воплощениях источник энергии включает солнечный свет, источник солнечной энергии, источник электрической энергии или их комбинацию. В некоторых воплощениях данная система дополнительно включает блок карбонизации, аминовый десорбер, установку аминокислотной очистки, каталитической преобразователь,
20 холодильник, компрессор, башню щелочения, сушилку или их комбинацию.

[0063] В некоторых воплощениях культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединяют в одном культуральном сосуде биореактора. В некоторых воплощениях культуральный раствор органического
25 субстрата и культуру органического продукта разделяют фильтром. В таких воплощениях данный фильтр может включать размер пор от примерно 0,2 мкм до примерно 10 мкм или более. В некоторых воплощениях данный фильтр включает размер пор от примерно 1 мкм до примерно 8 мкм или более. В некоторых воплощениях данный фильтр включает размер пор от примерно 3 мкм до примерно 5 мкм или более. Такие воплощения могут
30 давать преимущество отделения продукции по меньшей мере одной культуральной примеси органического субстрата первым рекомбинантным микроорганизмом от продукции по меньшей мере одного органического продукта вторым рекомбинантным микроорганизмом посредством обеспечения тока по меньшей мере одного органического

субстрата и других питательных веществ из культурального раствора органического субстрата в культуральный раствор органического продукта через фильтр, одновременно не допуская или снижая ток по меньшей мере одной культуральной примеси органического субстрата через данный фильтр. В некоторых воплощениях культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта содержит суспендированные органические частицы, которые отделяются фильтром. В некоторых воплощениях данные суспендированные органические частицы могут быть отделены от культурального раствора органического субстрата или культурального раствора органического продукта с применением центрифуги.

10 [0064] В других воплощениях, где культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединяют в одном культуральном сосуде биореактора, по меньшей мере одну ненативную нуклеотидную последовательность фермента, образующего органический субстрат, экспрессируемую первым рекомбинантным микроорганизмом, и по меньшей мере одну ненативную нуклеотидную последовательность фермента, образующего органический продукт, экспрессируемую вторым рекомбинантным микроорганизмом, вводят в первый микробный экспрессионный вектор и второй микробный экспрессионный вектор соответственно. Каждый из первого и второго микробного экспрессионного вектора включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии. Такие воплощения могут давать преимущество отделения продукции данной по меньшей мере одной культуральной примеси органического субстрата первым рекомбинантным микроорганизмом от продукции данного по меньшей мере одного органического продукта вторым рекомбинантным микроорганизмом посредством продуцирования данного по меньшей мере одного органического субстрата и данного по меньшей мере одного органического продукта в разные моменты времени посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата или в культуральный раствор органического продукта в разные моменты времени.

Воплощения рекомбинантных микроорганизмов

30 [0065] В некоторых воплощениях системы в данном документе данный органический субстрат включает альфа-кетоглутарат (AKG), где количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного

микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ. В таких воплощениях данный по меньшей мере один органический продукт включает этилен, где количество данного по меньшей мере одного фермента, образующего этилен (EFE), продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP) посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности, образующей АКGP. Такие воплощения могут давать преимущество повышенного выхода органического субстрата и по меньшей мере одного органического продукта, таким образом, уменьшая число и объем биореакторов, требующихся для продукции этилена в коммерческом масштабе.

[0066] В некоторых воплощениях данный по меньшей мере один фермент, образующий АКГ, включает белок изоцитратдегидрогеназу (ICD), белок глутаматдегидрогеназу (GDH) или их комбинацию. В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок ICD, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка ICD, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении аминокислотная последовательность ICD имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В одном воплощении аминокислотная последовательность ICD имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В одном воплощении нуклеотидная последовательность ICD имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2. В одном воплощении нуклеотидная последовательность ICD имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок ICD, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка ICD, имеющей нуклеотидную последовательность, по

меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4. В одном воплощении аминокислотная последовательность ICD имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 3. В одном воплощении аминокислотная последовательность ICD имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 3. В одном воплощении нуклеотидная последовательность ICD имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 4. В одном воплощении нуклеотидная последовательность ICD имеет нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 4.

10 [0067] В некоторых воплощениях данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка GDH, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6. В одном
15 воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 5. В одном
20 воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует нуклеотидную последовательность GDH, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 6. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует нуклеотидную последовательность GDH, имеющую нуклеотидную последовательность,
25 по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 6.

[0068] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок ICD, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка ICD, имеющей
30 нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, и белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, посредством осуществления экспрессии

ненативной нуклеотидной последовательности белка GDH, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6.

[0069] В некоторых воплощениях данный второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок EFE, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 7, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка EFE, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 8. В одном воплощении второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок EFE, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7. В одном воплощении второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок EFE, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 7. В одном воплощении второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует ненативную нуклеотидную последовательность белка EFE, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8. В одном воплощении второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует ненативную нуклеотидную последовательность белка EFE, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 8.

[0070] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из фотосинтезирующих бактерий, *Cyanobacteria*, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*. В некоторых воплощениях второй рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Geobacteria*, *Arthrobacter paraffineus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas Putida*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Serratia marcescens*, *Bacillus metatherium*, *Candida paludigena*, *Pichia inositovora*, *Torulopsis glabrata*, *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cereviciae*, вида рода *Aspergillus*, *Bacillus subtilis*, вида рода *Lactobacillus*.

[0071] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм включает дельта-glgc (Δ glgc) мутантный микроорганизм, не имеющий экспрессии белка глюкозо-1-фосфатаденилпиримидинтрансферазы. В таких воплощениях данный первый рекомбинантный микроорганизм будет переводить его метаболический путь с продукции

гликогена в пользу продукции большего количества кетокислот, включая AKG. В некоторых воплощениях данный первый рекомбинантный микроорганизм, включающий мутацию $\Delta glgC$, будет продуцировать и выделять возрастающие уровни AKG. Такие воплощения могут давать преимущество увеличения продукции этилена вторым рекомбинантным микроорганизмом посредством увеличения количества органического субстрата.

[0072] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозосинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка сахарозосинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 10. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозосинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозосинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 9. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует ненативную нуклеотидную последовательность белка сахарозосинтазы, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 10. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует ненативную нуклеотидную последовательность белка сахарозосинтазы, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 10. Такие воплощения могут давать преимущество повышенной продукции сахарозы в качестве источника углерода для роста первого рекомбинантного микроорганизма, а также источника углерода для роста второго рекомбинантного микроорганизма.

[0073] В некоторых воплощениях первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозофосфатсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 11, посредством осуществления экспрессии нуклеотидной последовательности сахарозофосфатсинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 12. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозофосфатсинтазу, имеющий аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 11. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозофосфатсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 11. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует нуклеотидную последовательность белка сахарозофосфатсинтазы, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12. В одном воплощении данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует нуклеотидную последовательность белка сахарозофосфатсинтазы, имеющую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 12. Такие воплощения могут давать преимущество продукции сахарозы в качестве дополнительного источника углерода для роста первого рекомбинантного микроорганизма, а также дополнительного источника углерода для роста второго рекомбинантного микроорганизма.

15 [0074] В разных воплощениях количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ. В некоторых воплощениях количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемое первым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ. В некоторых воплощениях количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемое данным первым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 50% до примерно 150% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ. В некоторых воплощениях количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемое первым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 75% до примерно 100% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ.

[0075] В разных воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 50% до примерно 150% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 75% до примерно 100% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

[0076] В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 20 граммов до примерно 100 граммов на литр культурального раствора органического продукта или более. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 35 граммов до примерно 85 граммов на литр культурального раствора органического продукта или более. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 50 граммов до примерно 70 граммов на литр культурального раствора органического продукта или более.

[0077] В некоторых воплощениях второй рекомбинантный микроорганизм включает *E. coli*. Такие воплощения могут давать преимущества быстрого роста второго рекомбинантного микроорганизма, и обширные средства, доступные для генетических модификаций, которые могут увеличивать выход органического продукта. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 30% до примерно 80% или более от общего клеточного количества белка второго рекомбинантного микроорганизма. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным

микроорганизмом, составляет от примерно 40% до примерно 70% или более от общего клеточного количества белка второго рекомбинантного микроорганизма. В некоторых воплощениях количество белка EFE, продуцируемое вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 50% до примерно 60% или более от общего клеточного количества белка второго рекомбинантного микроорганизма.

[0078] В некоторых воплощениях скорость продукции этилена, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 100 миллионов фунтов/год (45,36 миллионов килограммов/год) до примерно 1 миллиарда фунтов/год (453,6 миллионов килограммов/год) или больше. В некоторых воплощениях скорость продукции этилена, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 200 миллионов фунтов/год (90,8 миллионов килограммов/год) до примерно 800 миллионов фунтов/год (363,2 миллионов килограммов/год) или больше. В некоторых воплощениях скорость продукции этилена, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 400 миллионов фунтов/год (181,6 миллионов килограммов/год) до примерно 600 миллионов фунтов/год (272,4 миллионов килограммов/год) или больше. В некоторых воплощениях скорость продукции этилена, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 0,13 до примерно 8,3 фунтов на галлон культуры биореактора в месяц (от примерно 0,016 до примерно 0,994 килограммов на литр культуры биореактора в месяц). В требуемом масштабе продуктивность 0,13 фунта на галлон биореактора в месяц (0,016 килограммов/литр биореактора/месяц) может быть переведена на промышленное предприятие с вплоть до 642 биореакторами коммерческого масштаба (1000000 галлонов (3780000 литров)) для ежегодного производства вплоть до примерно 1 миллиарда фунтов (453600000 килограммов) или более этилена. При увеличении продуктивности до примерно 8,3 фунтов на галлон в месяц (0,994 килограммов/литр биореактора/месяц) 10 биореакторов коммерческого масштаба (1000000 галлонов (3780000 литров)) было бы достаточно для промышленного предприятия для производства этилена примерно 1 миллиарда фунтов/год (453600000 килограммов/год) или более.

[0079] В некоторых воплощениях концентрация популяции клеток второго рекомбинантного микроорганизма находится в диапазоне от примерно 10^7 до примерно 10^{13} клеток на миллилитр. В некоторых воплощениях концентрация второго рекомбинантного микроорганизма находится в диапазоне от примерно 10^8 до примерно 10^{12} клеток на миллилитр. В некоторых воплощениях концентрация второго

рекомбинантного микроорганизма находится в диапазоне от примерно 10^9 до примерно 10^{11} клеток на миллилитр. В некоторых воплощениях концентрация второго рекомбинантного микроорганизма в сухой массе клеток на литр культурального раствора органического продукта находится в диапазоне от примерно 100 граммов до примерно 300 граммов сухой массы клеток на литр или от примерно 0,2 граммов до примерно 100 граммов сухой массы клеток на литр. В некоторых воплощениях концентрация второго рекомбинантного микроорганизма в сухой массе клеток на литр культурального раствора органического продукта находится в диапазоне от примерно 125 граммов до примерно 275 граммов сухой массы клеток на литр. В некоторых воплощениях концентрация второго рекомбинантного микроорганизма в сухой массе клеток на литр культурального раствора органического продукта находится в диапазоне от примерно 150 граммов до примерно 250 граммов сухой массы клеток на литр.

[0080] В некоторых воплощениях ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую фермент, образующий АКГ, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую EFE, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где данный микробный экспрессионный вектор включает плазмиду бактериального вектора, нуклеотид-проводник системы гомологичной рекомбинации, устойчивую к антибиотикам систему и вспомогательную систему для очистки и выявления белка, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет число копий в микробном экспрессионном векторе от примерно 2 до примерно 500 или более. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет число копий в микробном экспрессионном векторе от примерно 10 до примерно 300. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет число копий в микробном экспрессионном векторе от примерно 50 до примерно 100. Такие воплощения могут давать преимущество повышенного выхода этилена, таким образом, уменьшая объем и стоимость производства этилена в коммерческом масштабе.

[0081] В некоторых воплощениях микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии. В некоторых воплощениях данный по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор,

промотор *Lac*, промотор T7, промотор CspA, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор *psbA* или их комбинацию.

Воплощения способов получения органического продукта

- 5 [0082] Воплощения в данном документе направлены на способы получения органического продукта. В одном воплощении данный способ включает предоставление системы биопроизводства, включающей следующее: по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора; где данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата; где
- 10 данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм; где данный первый рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического субстрата, экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной
- 15 нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, способен использовать источник углерода для продукции органического субстрата и продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; где данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит
- 20 культуральный раствор органического продукта; где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм; где данный второй рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического продукта, экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной
- 25 ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, и способен использовать органический субстрат с продукцией по меньшей мере одного органического продукта; где по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора включает первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник
- 30 энергии; и данная система включает второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического продукта; где данный первый культуральный

сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и данный второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта.

[0083] В таких воплощениях данный способ включает следующее:

5 культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном сосуде биореактора; и культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого

10 количества по меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде биореактора. Такие воплощения могут давать преимущество продуцирования по меньшей мере одной культуральной примеси органического субстрата первым рекомбинантным микроорганизмом отдельно от продуцирования по меньшей мере одного органического продукта вторым рекомбинантным организмом. В таких воплощениях

15 данный органический субстрат и другие питательные вещества могут быть предоставлены для второго рекомбинантного микроорганизма через путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, с обеспечением роста второго рекомбинантного микроорганизма и продукции органического продукта.

20 [0084] В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает удаление некоторого количества по меньшей мере одного летучего газа из культурального раствора органического субстрата через выпускное отверстие для летучего газа. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает удаление некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта из

25 культурального раствора органического продукта через выпускное отверстие для органического продукта. В некоторых воплощениях, при условии, что источник углерода включает диоксид углерода, данный способ дополнительно включает подпитку некоторого количества диоксида углерода из источника диоксида углерода в культуральный раствор органического субстрата через впускное отверстие для источника

30 углерода. Такие воплощения могут давать преимущества улучшенного контроля скоростей роста первого и второго рекомбинантных микроорганизмов, улучшенных скоростей фиксации углерода и улучшенного выхода органического продукта.

[0085] В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание уровня pH культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 5,0 до примерно 8,5. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание уровня pH культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 5,5 до примерно 8,0. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание уровня pH культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 6,0 до примерно 7,0.

10 [0086] В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта при температуре от примерно 25 градусов Цельсия до примерно 70 градусов Цельсия. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта при температуре от примерно 35
15 градусов Цельсия до примерно 60 градусов Цельсия. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта при температуре от примерно 40 градусов Цельсия до примерно 50 градусов Цельсия. В некоторых
20 воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или менее в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание количества летучего газа во втором
25 культуральном сосуде биореактора от примерно 5% по объему до примерно 0,5% по объему или менее в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает поддержание количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 1% по объему до примерно 0,1% или менее в расчете на общий внутренний
30 объем второго культурального сосуда биореактора. Такие воплощения могут давать преимущество производства по меньшей мере одного органического продукта, содержащего безопасные уровни летучего газа. Такие воплощения могут давать

преимущество производства по меньшей мере одного органического продукта, содержащего уровни летучего газа в пределах нормативных ограничений.

[0087] В некоторых воплощениях, при условии, что первый культуральный сосуд биореактора или второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает порт для сбора биомассы, данный способ дополнительно включает осуществление сбора некоторого количества биомассы, продуцированной первым рекомбинантным микроорганизмом или вторым рекомбинантным микроорганизмом через порт для сбора биомассы. Такие воплощения могут давать преимущество сбора биомассы для утилизации или переработки биомассы для применения в удобрении, сырье, биотопливе или других приложениях.

[0088] В некоторых воплощениях способов в данном документе ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую органический продукт, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где данный по меньшей мере один микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии. В некоторых воплощениях данный способ дополнительно включает осуществление контроля количества продуцированных по меньшей мере одного органического субстрата или количества по меньшей мере одного органического продукта посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата или в культуральный раствор органического продукта. В некоторых воплощениях по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор Lac, промотор T7, промотор CspA, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор psbA или их комбинацию. В некоторых воплощениях по меньшей мере один индуктор промотора включает лактозу, ксилозу, IPTG, холодовой шок, тепловой шок или их комбинацию.

[0089] В некоторых воплощениях способов в данном документе по меньшей мере один органический субстрат включает АКГ. В таких воплощениях по меньшей мере один органический продукт включает этилен. В некоторых воплощениях, при условии, что по меньшей мере одна культуральная примесь органического субстрата включает по меньшей мере один летучий газ, данный способ дополнительно включает удаление по меньшей мере одного летучего газа через выпускное отверстие для летучего газа.

[0090] В некоторых воплощениях данный способ включает выделение некоторого количества этилена, продуцированного со скоростью от примерно 100 миллионов фунтов/год (45,36 миллионов килограммов/год) до примерно 1 миллиарда фунтов/год (453,6 миллионов килограммов/год) или более. В некоторых воплощениях данный способ

5 включает выделение некоторого количества этилена, продуцированного со скоростью от примерно 200 миллионов фунтов/год (90,72 миллионов килограммов/год) до примерно 800 миллионов фунтов/год (362,9 миллионов килограммов/год) или более. В некоторых воплощениях данный способ включает выделение некоторого количества этилена, продуцированного со скоростью от примерно 400 миллионов фунтов/год (181,44

10 миллионов килограммов/год) до примерно 600 миллионов фунтов/год (272,16 миллионов килограммов/год) или более. В некоторых воплощениях данный способ включает выделение некоторого количества этилена, продуцированного со скоростью от примерно 0,13 до примерно 8,3 фунтов на галлон культуры биореактора в месяц (от примерно 0,016 до примерно 0,994 килограммов на литр культуры биореактора в месяц). В требуемом

15 масштабе продуктивность 0,13 фунта на галлон биореактора в месяц (0,016 килограммов/литр биореактора/месяц) может быть переведена на промышленное предприятие с вплоть до 642 биореакторами коммерческого масштаба (1000000 галлонов (3780000 литров)) для ежегодного производства примерно 1 миллиарда фунтов (453600000 килограммов) или более этилена. При увеличении продуктивности до

20 примерно 8,3 фунтов на галлон биореактора в месяц (0,994 килограммов/литр биореактора/месяц) 10 биореакторов коммерческого масштаба (1000000 галлонов (3780000 литров)) было бы достаточно для промышленного предприятия для производства этилена 1 миллиард фунтов/год (453600000 килограммов/год) или более. В некоторых воплощениях количество продуцированного этилена содержит количество

25 летучего газа примерно 1 мольный процент или менее. В некоторых воплощениях количество продуцированного этилена содержит количество летучего газа примерно 0,5 мольных процентов или менее. В некоторых воплощениях количество продуцированного этилена содержит количество летучего газа примерно 0,25 мольных процентов или менее.

30 [0091] Воплощения в данном документе направлены на способы получения органического продукта, где данный способ включает предложение системы биоремедиации, включающей следующее: по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора; где данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора

содержит культуральный раствор органического субстрата; где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм; где данный первый рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к

5 продукции органического субстрата, экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, способен использовать источник углерода для продукции органического субстрата и продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по

10 меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; и где данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта; где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм; где данный второй рекомбинантный микроорганизм имеет улучшенную способность к продукции органического продукта,

15 экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, и способен использовать органический субстрат с продукцией по меньшей мере одного органического продукта. В таких воплощениях культуральный раствор органического

20 субстрата и культуральный раствор органического продукта объединены в одном культуральном сосуде биореактора, где ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, вставляют в первый микробный экспрессионный вектор, где ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую фермент, образующий органический продукт,

25 вставляют во второй микробный экспрессионный вектор, и где каждый из первого и второго микробного экспрессионного вектора включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии.

[0092] В таких воплощениях данный способ включает предоставление источника углерода, соединенного с впускным отверстием для источника углерода;

30 культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном сосуде биореактора; продуцирование определенного количества по меньшей мере одного

органического субстрата посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата в первый момент времени; культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по
5 меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде биореактора; и продуцирование определенного количества по меньшей мере одного органического продукта посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического продукта во второй момент времени. Такие воплощения могут давать преимущество отделения продукции по меньшей мере
10 одной культуральной примеси органического субстрата первым рекомбинантным микроорганизмом от продукции по меньшей мере одного органического продукта вторым рекомбинантным микроорганизмом посредством продуцирования по меньшей мере одного органического субстрата и по меньшей мере одного органического продукта в
15 разные моменты времени посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата или в культуральный раствор органического продукта в разные моменты времени.

[0093] В некоторых воплощениях данный способ включает снижение количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или менее в расчете на общий внутренний объем второго
20 культурального сосуда биореактора перед вторым моментом времени. В некоторых воплощениях данный способ включает снижение количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 5% по объему до примерно 0,5% по объему или менее в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора перед вторым моментом времени. В некоторых воплощениях данный способ
25 включает снижение количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 1% по объему до примерно 0,1% по объему или менее в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора перед вторым моментом времени. Такие воплощения могут давать преимущество производства по меньшей мере одного органического продукта, содержащего безопасные уровни
30 летучего газа. Такие воплощения могут давать преимущество производства по меньшей мере одного органического продукта, содержащего уровни летучего газа в пределах нормативных ограничений.

[0094] Воплощения в данном документе направлены на способы производства этилена. В некоторых воплощениях данный способ включает представление системы биопроизводства, включающей следующее: первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник энергии; и второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического продукта; где первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта; где данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического субстрата, где данный органический субстрат включает АКГ, где данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат, где данный фермент, образующий органический субстрат, включает фермент, образующий АКГ, где данный первый рекомбинантный микроорганизм способен использовать источник углерода для продукции некоторого количества АКГ, где данный первый рекомбинантный микроорганизм продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; где данный летучий газ включает кислород, где данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического продукта, где данный органический продукт включает этилен, где данный второй рекомбинантный организм экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт, где данный фермент, образующий органический продукт, включает EFE, и где данный второй рекомбинантный организм способен использовать АКГ для продукции некоторого количества этилена. В некоторых воплощениях данный способ включает культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в

условиях, достаточных для продукции некоторого количества АКГ в первом культуральном сосуде биореактора; культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества EFE во втором культуральном сосуде биореактора;

5 удаление некоторого количества кислорода из культурального раствора органического субстрата через выпускное отверстие для летучего газа; и удаление некоторого количества EFE из культурального раствора органического продукта через выпускное отверстие для органического продукта. Такие воплощения могут давать преимущество продуцирования кислорода и этилена в отдельных культуральных сосудах биореактора; в

10 таких воплощениях совместная продукция кислорода и летучего продукта, такого как этилен, может быть снижена или устранена. Такие воплощения также могут давать преимущество продуцирования нелетучего органического субстрата, такого как АКГ, который можно использовать для продукции этилена во втором культуральном сосуде биореактора.

15

Дополнительные воплощения:

[0095] Воплощение 1. Система биопроизводства для получения органического продукта, содержащая следующее:

по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора;

20 в которой данный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата,

в которой данный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического субстрата,

25 в которой данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат,

30 в которой данный первый рекомбинантный микроорганизм способен использовать источник углерода для продукции данного органического субстрата,

в которой данный первый рекомбинантный микроорганизм продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую по меньшей мере один летучий газ, жидкость и твердое вещество; и

в которой по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта,

5 в которой данный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического продукта,

в которой данный второй рекомбинантный организм экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт,

10 в которой данный второй рекомбинантный организм способен использовать данный органический субстрат для продукции данного по меньшей мере одного органического продукта.

[0096] Воплощение 2. Система по воплощению 1 или любому предыдущему воплощению, в которой по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора
15 включает первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа и источник энергии; и второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического
20 продукта;

в которой данный первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и данный второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта; или в которой
25 данный первый культуральный сосуд биореактора или данный второй культуральный сосуд биореактора дополнительно содержит порт для сбора биомассы.

[0097] Воплощение 3. Система по воплощению 2 или любому предыдущему воплощению,

30 в которой источник углерода включает диоксид углерода, монооксид углерода, *n*-алкан, этанол, растительное масло, глицерин, глюкозу, сахарозу, моносахарид, дисахарид, полисахарид или их комбинацию; или

в которой источник энергии включает солнечный свет, источник солнечной энергии, источник электрической энергии или их комбинацию; или

в которой летучий газ включает кислород, метан или их комбинацию; или

в которой по меньшей мере один органический субстрат включает альфа-кетоглутарат, сахарозу, глюкозу, глицерин, моносахарид, дисахарид, полисахарид или их комбинацию; или

5 в которой по меньшей мере один органический продукт включает спирт, метанол, этанол, пропанол, бутанол, этандиол, органическую кислоту, пропионовую кислоту, уксусную кислоту, альдегид, формальдегид, длинноцепочечную жирную кислоту, *n*-алкан, углеводород или их комбинацию; или

10 в которой данный второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа, источник энергии или их комбинацию.

[0098] Воплощение 4. Система по воплощению 1 или любому предыдущему воплощению, в которой культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединены в одном культуральном сосуде биореактора; или

15 культуральный раствор органического субстрата и культура органического продукта разделены фильтром, где данный фильтр включает размер пор от примерно 0,2 мкм до примерно 10 мкм или более; или

20 где данная система дополнительно содержит блок карбонизации, аминовый десорбер, установку аминокислотки, каталитический конвертер, холодильник, компрессор, башню щелочения, сушилку или их комбинации.

[0099] Воплощение 5. Система по воплощению 1 или любому предыдущему воплощению, в которой органический субстрат включает альфа-кетоглутарат (AKG), в которой количество по меньшей мере одного фермента, образующего AKG, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий AKG; или

25 в которой по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, включает фермент, образующий этилен (EFE), и количество EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

30 [0100] Пример 6. Система по воплощению 5 или любому предыдущему воплощению, в которой первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по

меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP) посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности, образующей AKGP.

5 [0101] Воплощение 7. Система по воплощению 5 или любому предыдущему воплощению, в которой по меньшей мере один фермент, образующий AKG, включает белок изоцитратдегидрогеназу (ICD), белок глутаматдегидрогеназу (GDH) или их комбинацию.

10 [0102] Воплощение 8. Система по воплощению 7 или любому предыдущему воплощению, в которой первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок ICD, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка ICD, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2; или

15 первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка GDH, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6, или

20 или их комбинацию; или в которой второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок EFE, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 7, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка EFE, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 8.

25 [0103] Воплощение 9. Система по воплощению 1 или любому предыдущему воплощению, в которой первый рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из фотосинтезирующих бактерий, *Cyanobacteria*, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Geobacteria*,
30 *Arthrobacter paraffineus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus metatherium*, *Candida paludigena*, *Pichia inositovora*, *Torulopsis glabrata*, *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cereviciae*, вида рода *Anabaena*, вида рода *Aspergillus*, *Bacillus subtilis*, вида рода *Chlorella*, вида рода *Lactobacillus*, водорослей,

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ

В ответ на Уведомление от 22.12.2022

микроводорослей, электросинтетических бактерий, фотосинтетического микроорганизма, дрожжей, нитчатых грибов и растительной клетки; или в которой второй рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Geobacteria*, *Arthrobacter paraffineus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus metatherium*, *Candida paludigena*, *Pichia inositovora*, *Torulopsis glabrata*, *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cereviciae*, вида рода *Anabaena*, вида рода *Aspergillus*, *Bacillus subtilis*, вида рода *Chlorella*, вида рода *Lactobacillus*, анаэробных бактерий и *Bacillus subtilis*.

[0104] Воплощение 10. Система по воплощению 1 или любому предыдущему воплощению, в которой первый рекомбинантный микроорганизм включает дельта-glgc мутантный микроорганизм, не имеющий экспрессии белка глюкозо-1-фосфатаденилилтрансферазы; или в которой данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозосинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка сахарозосинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 10; или в которой данный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозофосфатсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 11, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности сахарозофосфатсинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 12.

[0105] Воплощение 11. Система по воплощению 5 или любому предыдущему воплощению, в которой количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ; или

в которой количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE; или

в которой количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 20 граммов до примерно 100 граммов на литр культурального раствора органического продукта или более.

5 [0106] Воплощение 12. Система по воплощению 5 или любому предыдущему воплощению, где второй рекомбинантный микроорганизм включает *E. coli*, и количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 30% до примерно 80% или более от общего клеточного количества белка второго рекомбинантного микроорганизма; или

10 скорость продукции по меньшей мере одного органического продукта, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 100 миллионов фунтов/год (45,36 миллионов килограммов/год) до примерно 1 миллиарда фунтов/год (453,6 миллионов килограммов/год) или более; или в которой концентрация популяции клеток второго рекомбинантного микроорганизма находится в диапазоне от примерно 10^7 до примерно 10^{13} клеток на миллилитр, или, в сухой массе клеток на литр
15 культурального раствора органического продукта, от примерно 100 граммов до примерно 300 граммов сухой массы клеток на литр.

[0107] Воплощение 13. Система по воплощению 5 или любому предыдущему воплощению, в которой ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую фермент, образующий АКГ, или ненативную нуклеотидную
20 последовательность, экспрессирующую EFE, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где данный микробный экспрессионный вектор включает плазмиду бактериального вектора, нуклеотид-проводник гомологичной рекомбинантной системы, устойчивую к антибиотикам систему и вспомогательную систему для очистки и выявления белка, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию.

25 [0108] Воплощение 14. Система по воплощению 5 или любому предыдущему воплощению, в которой нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет число копий в микробном экспрессионном векторе от примерно 2 до примерно 500; или в которой данный микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии.

30 [0109] Воплощение 15. Система по воплощению 14 или любому предыдущему воплощению, где по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор Lac, промотор T7, промотор CspA,

промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор psbA или их комбинацию.

[0110] Воплощение 16. Способ получения органического продукта, включающий следующее:

5 предоставление системы биопроизводства, как в воплощении 2 или любом предыдущем воплощении;

культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном

10 сосуде биореактора; и

культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде биореактора.

15 [0111] Воплощение 17. Способ по воплощению 16 или любому предыдущему воплощению, дополнительно включающий следующее:

удаление некоторого количества по меньшей мере одного летучего газа из культурального раствора органического субстрата через выпускное отверстие для летучего газа;

20 удаление некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта из культурального раствора органического продукта через выпускное отверстие для органического продукта;

при условии, что источник углерода включает диоксид углерода, подача некоторого количества диоксида углерода из источника диоксида углерода в

25 культуральный раствор органического субстрата через впускное отверстие для источника углерода;

поддержание уровня pH культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 5,0 до примерно 8,5;

30 поддержание культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта при температуре от примерно 25 градусов Цельсия до примерно 70 градусов Цельсия;

при условии, что первый культуральный сосуд биореактора или второй культуральный сосуд биореактора включает порт для сбора биомассы, осуществление

сбора некоторого количества биомассы, продуцированной первым рекомбинантным микроорганизмом или вторым рекомбинантным микроорганизмом, через порт для сбора биомассы; или

5 поддержание количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или менее, в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора.

[0112] Воплощение 18. Способ по воплощению 16 или любому предыдущему воплощению, в котором ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, или
10 ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую органический продукт, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где данный по меньшей мере один микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии, дополнительно включающий следующее:

15 осуществление контроля количества продуцируемых по меньшей мере одного органического субстрата или количества по меньшей мере одного органического продукта посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата или культуральный раствор органического продукта.

[0113] Воплощение 19. Способ по воплощению 18 или любому предыдущему воплощению, в котором по меньшей мере один микробный промотор экспрессии
20 включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор Lac, промотор T7, промотор CspA, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор psbA или их комбинацию; и по меньшей мере один индуктор промотора включает лактозу, ксилозу, IPTG, холодовой шок, тепловой шок или их комбинацию.

25 [0114] Воплощение 20. Способ по воплощению 16 или любому предыдущему воплощению, дополнительно включающий следующее:

при условии, что по меньшей мере одна культуральная примесь органического субстрата включает по меньшей мере один летучий газ, удаление данного по меньшей мере одного летучего газа через выпускное отверстие для летучего газа; или выделение
30 некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта, продуцируемого со скоростью от примерно 100 миллионов фунтов/год (45,36 миллионов килограммов/год) до примерно 1 миллиарда фунтов/год (453,6 миллионов килограммов/год) или больше; или

где количество по меньшей мере одного продуцируемого органического продукта содержит количество летучего газа примерно 1 мольный процент или меньше.

[0115] Воплощение 21. Способ получения органического продукта, включающий следующее:

5 предоставление системы биоремедиации, как в воплощении 1 или любом предыдущем воплощении, в которой культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединены в одном культуральном сосуде биореактора, при этом ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат,
10 вставлена в первый микробный экспрессионный вектор, при этом ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая фермент, образующий органический продукт, вставлена во второй микробный экспрессионный вектор, где каждый из первого и второго микробного экспрессионного вектора включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии,

15 при условии, что источник углерода соединен с выпускным отверстием для источника углерода;

культивирование первого рекомбинантного микроорганизма в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в данном первом культуральном сосуде биореактора;

20 продуцирование определенного количества по меньшей мере одного органического субстрата посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата в первый момент времени;

культивирование второго рекомбинантного микроорганизма во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта в данном втором культуральном сосуде биореактора; и

30 продуцирование определенного количества по меньшей мере одного органического продукта посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического продукта во второй момент времени.

[0116] Воплощение 22. Способ по воплощению 21 или любому предыдущему воплощению, дополнительно включающий снижение количества летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по

объему или менее, в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора, перед вторым моментом времени.

ПРИМЕРЫ

5

Пример 1. Клонирование ферментов синтеза альфа-кетоглутарата в *Cyanobacteria*

[0117] Альфа-кетоглутарат (αKG) продуцируется окислительным декарбоксилированием изоцитрата посредством изоцитратдегидрогеназы (ICD) или окислительным дезаминированием глутамата посредством глутаматдегидрогеназы (GDH). Ключевые ферменты для клонирования и продукции αKG у цианобактерий включают фермент ICD: 1.1.1.42, кодирующую последовательность ICD *P. Fluorescens* (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2), фермент ICD: 1.1.1.42, кодирующую последовательность *Synechococcus elongatus* PCC794 (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4) и фермент GDH: 1.4.1.2, кодирующую последовательность *P. Fluorescens* (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6).

[0118] Гены ICD и GDH синтезируются в виде gBlocks, клонированных в конструкцию плазмиды pSyn6 (pSyn6_ICD и pSyn6_GDH). Для клонирования в плазмиду pSyn6 кодирующая последовательность ICD *S. elongatus* фланкируется N-концевым *HindIII* и C-концевым *BamHI* сайтами распознавания (SEQ ID NO: 4). С использованием данных конструкций плазмиды гены ICD и GDH клонируются в немодифицированный *S. elongatus* или мутантный штамм *S. elongatus* ΔgIgc (см. Пример 2). Будут трансформированы 1-3 копии целевых генов. Клонирование генов ICD и GDH подтверждается ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенированием. Синтез и количественное измерение αKG осуществляются SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия), вестерн-блоттингом и анализом продукции этилена.

[0119] Скорость роста культуры и культуральные условия оцениваются в соответствии с увеличением масштаба продукции αKG.

Пример 2. Инженерия цианобактерий для секреции альфа-кетоглутарата

[0120] Создание мутантных по гликогену штаммов цианобактерий изменяет метаболический путь бактерий с продукцией более высоких концентраций кетокислот, таких как αKG.

[0121] Мутантные по гликогену цианобактерии получают созданием дефицитных по гликогену штаммов посредством мутаций гена (Δ glgC). Ген устойчивости к ампициллину (AmpR) синтезируют в виде gBlocks и включают в конструкцию плазмиды. Данную конструкцию плазмиды трансформируют в цианобактерии дикого типа (*Synechocystis*,
5 *Synechococcus elongatus* 2973, *Synechococcus elongatus* 2434). Часть гена glgC дикого типа заменяется геном AmpR с созданием мутантных штаммов. Мутантные штаммы Δ glgC подтверждаются посредством роста на средах, содержащих Amp, с последующим ПЦР и секвенированием.

10 **Пример 3. Продукция сахарозы из диоксида углерода**

[0122] *Cyanobacteria* (*Synechococcus elongatus*, *Synechocystis*) генетически модифицируют для продукции сахарозы в качестве субстрата для выращивания микроорганизмов, далее продуцирующих этилен (*E. coli*).

15 Генетическая модификация *Synechococcus elongatus* PCC 7942 включает активацию одного гена (cscB) и делецию одного гена (GlgC). Выход сахарозы, генерированной в генетически модифицированной бактерии, составляет от 15 до 31,5 фунтов/галлон биореактора/месяц (от 1,80 до 2,58 кг/л биореактора/месяц).

20 Крупномасштабная продукция сахарозы осуществляется с использованием фотобиореактора 1-га (640000 литров), поставки 2% диоксида углерода, сезона выращивания 300 суток, освещения 8 часов в сутки ($65 \text{ мкэрг м}^2 \text{ с}^{-1}$) и с выходом вплоть до 55 метрических тонн сахарозы/год.

Пример 4. Клонирование фермента, образующего этилен, в *E. coli*

25 [0123] *E. coli* выбрана для продукции этилена из-за ее быстрого роста и доступности обширных средств для генетических модификаций. Современная плаزمида обеспечивает продукцию фермента, образующего этилен, с очень высоким выходом.

30 [0124] Кодировующую последовательность полинуклеотида EFE, которая исходно адаптирована на основе белка EFE *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola*, отбирают и генетически адаптируют для экспрессии в *E. coli* (GenBank: KPB44727.1, SEQ ID NO:6). Синтезируют синтетическую ДНК-конструкцию, кодирующую фермент EFE, и клонируют в векторную плазмиду pET-30a(+). Соответствующие нуклеотидные последовательности оптимизированы по кодонам для экспрессии в *E. coli* (SEQ ID NO: 5) и содержат возможную His метку на С-конце, с последующим терминирующим кодоном и сайтом

HindIII. Сайт NdeI используется для клонирования на 5'-конце, где данный сайт NdeI содержит иницирующий кодон ATG. Компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформируют данной рекомбинантной плазмидой.

5 [0125] Кассета устойчивости к ампициллину активируется промотором, индуцируемым IPTG (pTrc), в присутствии гена LacI; данный ген LacI регулируется промотором LacIq (SEQ ID NO: 13).

[0126] Штамм *E. coli* BL21(DE3): время удвоения (20 мин), клетки тонут на дно биореактора, если не перемешиваются.

10 • Теоретическая максимальная плотность клеток: 50 г сухой массы клеток/л или 1×10^{13} жизнеспособных бактерий/л, в нормальных условиях: 1×10^{10} жизнеспособных бактерий/л. Применение обогащенной среды может стимулировать более высокую плотность клеток.

• pH культуры: 7,5-8,5

• Плазида: малое (2-4), среднее (15-60) и высокое (50-500) число копий

15 • Промотор/индуктор для продукции белка

• Промотор *Lac*/лактоза: присутствие глюкозы будет конкурировать с лактозой и отрицательно влиять на

продукцию белка

• Промотор T7/IPTG: целевой белок представляет 50% общего клеточного белка

20 • Промотор *CspA*/холодовой шок: экспрессия белка по мере снижения температуры от 37°C до 15°C

• Промотор λ pL- λ cl/тепловой шок: экспрессия белка по мере увеличения температуры от 37°C до 42°C

• Промотор *psbA*: не требуется индуктор

25 • Текущий выход продукции этилена от *E. coli*: 188 нмоль этилена/ОП600 (оптическая плотность при 600 нм)/мл

30 [0127] Пилотную экспрессию EFE (примерно 44,5 кДа)_BL21(DE3) проводили либо без EFE, либо с конструкцией с малым числом копий (pRK290-PpsbA-efe-Flag), либо с конструкцией со средним числом копий (pBBR1-PpsbA-efe-Flag), либо с конструкцией с большим числом копий (pUC-PpsbA-efe-Flag). SDS-PAGE и вестерн-блоттинг использовали для отслеживания экспрессии белка EFE в конструкциях с разным числом копий (GenScript USA, Inc., Piscataway, NJ) в культурах, выращенных в среде Лурия, среде

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ

В ответ на Уведомление от 22.12.2022

M9 с 0,2% глюкозы или среде MOPS с 0,2% глюкозы. Для блотов экспрессию альфа-GroEL измеряли в качестве позитивного контроля. Уровни белка EFE, продуцированные конструкциями контроля, с малым числом копий, со средним числом копий и с большим числом копий в культурах, выращенных в разных культуральных средах, показаны на

5 ФИГ. 3А.

[0128] Выход этилена от конструкции pUC-PpsbA-efe-Flag MB1655 оценивали при росте в культуральной среде либо без добавок, либо с разными ростовыми добавками, добавленными в культуральную среду (ФИГ. 3В).

10 **Пример 5: синтетическая продукция сопряженных алкенов, полиенов и алканов в рекомбинантных микроорганизмах**

[0129] Сопряженные алкены (включая диены и полиены) и алканы представляют собой важные сырьевые товары с несколькими применениями в промышленности полимеров и биотехнологии. Возобновляемая продукция сопряженных алкенов и алканов

15 посредством синтетической биологии может быть альтернативным подходом к производству химических реактивов на основе углеводородного сырья. Короткие алканы и алкены представляют собой летучие газы. Примеры данных летучих газов включают этен, этилен, пропен, бутен, метан, этан, пропан, бутан или их комбинацию.

Природные процессы продукции алкенов и алканов являются крайне медленными.

20 Здесь авторы данного изобретения применили подход генетической модификации для продукции сопряженных алкенов и алканов. С этой целью осуществляли сверхэкспрессию критических ферментативных путей, участвующих в биосинтезе алкенов и алканов. Определили пять ферментативных путей для биосинтеза алкенов и алканов посредством биоинформационных исследований. В качестве сырья для данных реакций можно

25 использовать свободные жирные кислоты или углеводы (сахара). Четыре ферментативных пути, которые превращают свободные кислоты или их производные до алканов или алкенов включают следующие:

1 – декарбоксилирование жирных альдегидов, 2 - декарбоксилирование жирных кислот, 3 – биосинтез углеводов от головки к головке, 4 – путь поликетидсинтазы

30 (PKS).

Среди данных путей декарбоксилирование жирных альдегидов имеет наивысшую эффективность. Альдегиддекарбоксилазы (AD) играют критически важную роль в данном пути. Альдегиддекарбоксилазы превращают жирные альдегиды до алканов и/или

алкенов. Другие критически важные ферменты включают редуктазу (AAR) белка-носителя жирного акрила (ACP) или редуктазу жирных кислот (FAR).

Декарбоксилирование жирных кислот (для продукции алкенов/алканов) регулируется тремя критически важными ферментами, включающими Ole T, UndA и UndB.

5 Ген ABCD Ole является критически важным для биосинтеза углеводородов голова к голове.

Критически важные ферменты поликетидного (PKS) пути включают 3-В-кето-ацилсинтазы (KS), ацил-трансферазу (AT), белок-носитель ацила (ACP), В-кеторедуктазу (KR), дегидратазу (DH), енилредуктазу (ER).

10 [0131] Для того чтобы продуцировать алканы и алкены, были смоделированы вышеупомянутые генетические пути. *E. coli* использовали в качестве микроорганизма-хозяина. Генетические конструкции создавали с использованием рUC19 (большое число копий) в качестве экспрессионного вектора и под контролем промотора, индуцируемого IPTG. Экспрессию каждого гена подтверждали посредством выращивания колоний на
15 агаризованных средах, дополненных ампициллином, IPTG и X-gal, ПЦР и гель-электрофорезом. Газовую хроматографию (ГХ) и ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) использовали для выявления продуктов в газовой и жидкой фазе соответственно. Промотор *psbA* представляет собой промотор непрерывной экспрессии. В качестве хозяина используют линии клеток *E. coli* BL21 (DE3), DH5альфа или MG1655.

20 [0132] Адаптации культивирования клеток осуществляли посредством культивирования *E. coli* в разных средах, включая LB и MOPS. Состав среды MOPS определяется в виде списка ниже.

Среда	MOPS
Глюкоза	4 г/л
25 IPTG	0,5 мМ
Аргинин	3 мМ
AKG	2 мМ
Индукция	Индуцируется в начале

30 [0133] Пожалуйста, см. ниже список генов, которые участвуют в продукции алканов и алкенов и их номера вырезания.

[0134] Альдегиддекарбоксилазы (AD), редуктаза (AAR) белка-носителя жирного акрила (ACP) или редуктаза жирных кислот (FAR), субъединица FAS1 тетрафункциональной синтазы жирных кислот *Saccharomyces cerevisiae* S288C (FAS1),

референсная последовательность NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) частичной мПНК: NM_001179748.1 (SEQ ID NO. 14).

[0135] Ole T, UndA и UndB.

[0136] Ген ABCD Ole

5 [0137] 3-В-кето-ацилсинтазы (KS), ацил-трансфераза (AT), белок семейства ацил-трансфераз HXXXD-типа *Arabidopsis thaliana* (CER2), референсная последовательность NCBI мПНК: NM_118584.3 (SEQ ID NO. 15).

[0138] Белок-носитель ацила (ACP), предположительный митохондриальный белок-носитель ацила *Leptomonas pyrrocoris*, референсная последовательность NCBI предположительной мПНК (ACP): XM_015809471.1 (SEQ ID NO. 16).

[0139] В-кеторедуктаза (KR), дегидратаза (DH), енилредуктаза (ER).

[0140] дегидратаза/изомераза белка-носителя бета-гидроксиацил-ацила [подштамм MG1655 штамма K-12 *Escherichia coli*], референсная последовательность NCBI: NP_415474.1 (SEQ ID NO. 17).

15

Пример 6. Экспериментальные методики в лабораторном масштабе

[0141] 1. Будут получены специально разработанные ДНК-конструкции, которые кодируют критически важные промежуточные соединения рекомбинантного пути биосинтеза алкена, полиена, алкана, полиола, спирта и органической кислоты. 2. Затем
20 будут размножены тщательно отобранные фотосинтезирующие первые рекомбинантные микроорганизмы для клонирования и экспрессии генов органических субстратов, включающих альфа-кетоглутарат, сахарозу, глюкозу, фруктозу, ксилозу, галактозу, глицерин, жирные кислоты и т.д. 3. Затем будут размножены тщательно отобранные вторые рекомбинантные микроорганизмы для клонирования и экспрессии генов
25 ферментов, образующих органический продукт. 4. Затем будет осуществляться генетическая и метаболическая инженерия микроорганизмов для непрерывной продукции органических продуктов. 5. Затем будут отобраны биоинженерные микроорганизмы и размножены в системе фотобиореактора и биореактора. 6. Будут адаптированы культуральные условия биореактора (включая концентрацию CO₂, время воздействия и
30 длину волны света, температуру и pH). 7. Образцы будут отобраны и проанализированы ВЭЖХ для измерения синтеза органического продукта. 8. Будет адаптирована продукция органического продукта в генетически модифицированных микроорганизмах. 9. Способы продукции органических продуктов будут масштабированы от масштаба пробирки до 1-

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ

В ответ на Уведомление от 22.12.2022

литровых, 10-литровых и 100-литровых биореакторов. Увеличения масштаба будут осуществляться с отношением от 1 до 10 на каждой стадии.

ПРИЛОЖЕНИЕ

5

SEQI NO:1-

MGYKKIQVPA VGDKITVNADHSLNVPDNPIIPFIEGDGIGVDVSPVMIKVVDAAVEKAY
GGKRKISWMEVYAGEKATQVYDQDTWLPQETLDAVKDYVVSIGPLTTPVGGGIRSLN
VALRQQLDLYVCLRPVWVFEGVPSVKKPGDVMVIFRENSEDIYAGIEWKAGSPEAT
KVIKFLKEEMGVTKIRFDQDCGIGIKPVSKEGTKRLVRKALQYVVDNDRKSLTIVHKGNI
10 MKFTEGAFKDWGYEVAKEEFGAELLDGGPMMKFKNPKTGREVVVKDAIADAMLQQIL
LRPAEYDVIATLNLNGDYLSDALAAEVGGIGIAPGANLSDTVAMFEATHGTAPKYAGK
DQVNPGSVILSAEMMLRHLGWTEAADLIKGTNGAIKAKTVTYDFERLMEGATLVSSSG
FGEALIKHM

15

SEQID NO:2-

ATGGGITACAAGAAGATTCAGGTTCCAGCCGTCGGCGACAAAATCACCGTCAACGC
AGACCATTCTCTCAATGTCCCTGATAACCCGATCAITCCCTTCATCGAAGGTGACGG
CATTGGCGTCGACGTCAGCCCTGTGATGATCAAAGTGGTTGATGCTGCCGTAGAGAA
AGCCTACGGGGGTAAGCGCAAGAITTCCTGGATGGAGGITTATGCTGGCGAAAAAG
20 CAACTCAGGTCTATGACCAGGACACCTGGCTGCCCCAGGAAACCCTGGACGCGGTC
AAGGATTACGTGGTCTCCATCAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTCCGTGGCGGCATC
CGTTCCCTCAACGTCGCCCTGCGCCAACAGCTCGATCTCTATGTCTGCCTTCGCCCTG
TGGTGTGGTTTGAAGGTGTGCCGAGCCCGGTGAAAAAGCCTGGCGACGTGACATG
GTGATCTTCCGCGAGAACTCCGAAGACATTTATGCCGGTATCGAATGGAAAGCCGG
25 CTCCCCTGAGGCCACCAAGGTCATCAAITCCTGAAAGAAGAAATGGGCGTCACCA
AGATCCGTTTCGACCAGGATTGCGGCATCGGCATCAAGCCGGTITCAAAGAAGGC
ACCAAGCGTCTGGTGCGCAAGGCGCTGCAATACGTGGTGGACAACGACCCGCAAGTC
GCTGACCATCGTGACAAGGGCAACATCATGAAATTCACCGAAGGTGCCTTCAAGG
ACTGGGGCTACGAGGTGGCGAAGGAAGAATTCGGCGCCGAGCTGCTCGATGGCGGC
30 CCATGGATGAAATTCAGAACCAGGAAACCCGCGCGAAGTTCGTCGTCAAGGACGC
CATCGCCGACGCCATGCTCCAGCAGATCCTGCTGCGTCCGGCCGAATACGATGTGAT
CGCCACCCTCAACCTCAACGGTGACTIONTCCGACGCCCTGGCGGCGGAAGTGG
GCGGTATCGGTATCGCGCCGGGTGCCAACCTGTCCGACACCGTAGCCATGITCGAGG

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ

В ответ на Уведомление от 22.12.2022

CGACCCACGGTACTGCGCCGAAATATGCCGGCAAGGACCAGGTCAACCCGGGITCG
 GTGATITTTGTCGGCGGAAATGATGCTGCGCCACCTGGGCTGGACCGAGGCGGCCGA
 CCTGATCATCAAGGGCACCAATGGCGCCATCAAGGCCAAGACCGTGACCTACGACT
 TCGAACGTCTGATGGAAGGCGCCACACTGGTGTCTTCTCGGGCTTCGGTGAAGCGC
 5 TGATCAAGCACATGTAA

SEQID NO:3-

MYEKIQPPSEGSKIRFEAGKPIVDPNPIIPFIRGDGTGVDIWPATERVLDAAVAKAYGGQ
 R KITWFKVYAGDEACDLYGTYQYLPEDTLTAIREYGVAIKGPLTTPIGGGIRSLNVALRQI
 10 FDLYACVRPCRYTGTSPHRTPEQLDWWVYRENTEDIYLGIEWKQGDPTGDRLIKLLN
 EDFIPNSPSLGKKQIRLDSGIGIKPISKTGSQRLIRRAIEHALRLEGRKRHVTLVHKGNIMK
 FTEGAFRDWGYELATTEFRTDCVTERESWILANQESKPDLSLEDNARLIEPGYDAMTPE
 KQAAVVAEVKAVLDSIGATHGNGQWWSKVLVDDRIADSIFQQIQTRPGEYSVLATMNL
 NGDYISDAAA VVGGLGMAPGANIGDEAAIFEATHGTAPKHAGLDRINPGSVILSGVM
 15 MLEYLGWQEAADLITKGISQAIANREVTYDLARLMPEAVDQPLKCSEFAEIVKHFDD

SEQ ID NO: 4-

AGGGCAAGCTTATGTACGAGAAGATTCAACCCCCTAGCGAAGGCAGCAAATICGC
 TITGAAGCCGGCAAGCCGATCGTTCCCGACAACCCGATCATTCCCTTCATICGTGGT
 20 GACGGCACTGGCGTTGATATCTGGCCCGCAACTGAGCGCGTICTCGATGCCGCTGTC
 GCTAAAGCCTATGGCGGTCAGCGCAAATCACTTGGTTCAAAGTCTACGCGGGTGAT
 GAAGCCTGCGACCTCTACGGCACCTACCAATATCTGCCTGAAGATACGCTGACAGCG
 ATCCGCGAGTACGGCGTGGCAATCAAAGGCCCGCTGACGACGCCGATCGGTGGTGG
 CATTGATCGCTGAACGTGGCGCTACGGCAAATCTTCGATCTCTATGCCTGCGTCCG
 25 CCCCTGTCGCTACTACCCGGCACACCCTCGCCCCACCGCACGCCCGAACAACCTCGA
 TGTGGTGGTCTACCGCGAAAACACCGAGGATATCTACCTCGGCATCGAATGGAAGC
 AAGGTGATCCCACCGGCGATCGCCTGATCAAGCTGCTGAACGAGGACTICATTCCCA
 ACAGCCCCAGCTTGGGTAAAAAGCAAATCCGTTTGGATTCCGGCATTGGTATTAAGC
 CGATCAGTAAACGGGTAGCCAGCGTCTGATTCGTGCGTGCATCGAGCATGCCCTAC
 30 GCCTCGAAGGCCGCAAGCGACATGTCACCCTTGCCACAAGGGCAACATCATGAAG
 TICACGGAAGGTGCTTICCGGGACTGGGGCTATGAACTGGCCACGACTGAGTTCCGA
 ACCGACTGTGTGACTGAACGGGAGAGCTGGATTCTIGCCAACCAAGAAAGCAAGCC
 GGATCTCAGCTTGAAGACAATGCGCGGCTCATCGAACCTGGCTACGACGCGATGA

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
 В ответ на Уведомление от 22.12.2022

CGCCCGAAAAGCAGGCAGCAGTGGTGGCTGAAAGTGAAAGCTGTGCTCGACAGCATC
 GCGGCCACCCACGGCAACGGTCAGTGGAAGTCTAAGGTGCTGGTIGACGATCGCAT
 TGCTGACAGCATCTTCCAGCAGATTCAAACCCGCCCGGGTGAATACTCGGTGCTGGC
 GACGATGAACCTCAATGGCGACTACATCTCTGATGCAGCGGCGGCGGTGGTTCGGTG
 5 GCCTGGGCATGGCCCCCGGTGCCAACATTGGCGACGAAGCGGCGATCTTIGAAGCG
 ACCCACGGCACAGCGCCCAAGCACGCTGGCCTCGATCGCATTAAACCCCGGCTCGGTC
 ATCCTCTCCGGCGTGATGATGCTGGAGTACCTAGGCTGGCAAGAGGCTGCTGACTIG
 ATCACCAAGGGCATCAGCCAAGCGATCGCTAACCGTGAGGTCACCTACGATCTGGC
 TCGGTIGATGGAACCGGCGGTTGATCAACCACTCAAGTGCTCGGAATTTGCCGAAGC
 10 CATCGTCAAGCATITCGACGATIAGGGATCCAGCGC

SEQ ID NO. 5-

MAFFTAASKADFFQHQLQAALAHISEQALPQVALFAEQFFGIISLDELTAQRRLSDLAGCT
 LSAWRLLERFDHAQPQVRVYNPDYERHGWQSTHTAVEVLHHDLPFLVDSVRTELNRR
 15 GYSIHTLQTIVLSVRRGSKGELLEILPKGTTGEGVLHESLMYLEIDRCANAAELNVSKE
 LEQVLGEVRV AVSDFEPMKAKVQEILTKLDNSAFAVDADEKNEIKSFLEWLVGHNHFTFL
 GYEEFTVVDQADGGHIEYDQNSFLGLTKMLRTGL1NEDRHIEDYAVKYLREPTLLSFAK
 AAHPSRVHRPA YPDYVSIREIDADGKVIKEHRFMGLYTSSVYGESVRVIPFIRRKVEEIER
 RSGFQAKAHLGKELAQVLEVLPRDDLQTPVDELFTVMSIVQIQERNKIRVFLRKDPYG
 20 RFCYCLAYVPRDIYSTEVRQKIQQVLMERLKASDCEFWTFFSESVLARVQLILRVDPKNR
 IDIDPLQLENEVIQACRSWQDDYAALTVETFGANGTNVLADFPKGFPAgyRERFAAHS
 AVVDMQHLLNLSEKKPLAMSFYQPLASGPRELHCKLYHADTPLALSDVLPILNGLLRV
 LGEFPYRLRH1NGREFWIHDFAAEGLDLDIQQLNDTLQDAFVHIVRGDAENDAFNR
 LVLTAGLPWRDVALLRAYARYLKQIRLGFDLGYIASTLNNHTDIARELTRLFKTRFYLA
 25 RKLGSDELDDKQQRLEQAILTALDDVQVLNEDRILRRYLDLIKATLRNfyQTDANGQN
 KSYFSFKFNPHLPELPPKVPKFEIFVYSPRVEGVHLRFGNVARGGLRWSDREEDFRTEVL
 GLVKAQQVKNSVIVPVGAKGGFLPRRLPLGSRDEIAAEGIACYRIFISGLLDITDNLKDG
 KLVPPANVVRHDDDDPYLVVAADKGTATFSDIANGIAIDYGFWLGDFAFASGGSAGYDH
 KKMGITAKGA WVGVRHFRERGINVQEDSITVVGVDMAGDVFGNGLLMSDKLQLVA
 30 AFNHLHIFIDPNPNPATSFAERQRMFDLPRSA WSDYDTSIMSEGGGIFRSASIAISPQM
 KERFDIQADKLTPTTELLNALLKAPVDLLWNGGIGTYVKASTESHADVGDKANDALRVN
 GNELRCKVVGEGGNLGMTQLGRVEFGLNGGGSNTDFIDNAGGVDCSDHEVNIKILLNE
 VVQAGDMTDKQRNQLLASMTDEVGGLVLGNNYKQTQALSAAARRAYARIAEYKRLM

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
 В ответ на Уведомление от 22.12.2022

SDLEGRGKLDRAIEFLPTEEQLAERVAEGHGLTRPELSVLISYSKIDLKEQLLGSVLPDDDDYLTR
 DMETAFPPTLVSKFSEAMRRHRLKREIVSTQIANDLVNHMGITFVQRLKESTGMT
 PANVAGAYVIVRDIFHLPWFQRQIEALDYQVSADVQLELMDELMRLGRRATRWFRLRAR
 RNEQNAARDVAHFPHLKEGLKLDDELLSGEIRENWQERYQAYVAAGVPELLARMVA
 5 GTTHLYTLLPIIEAADVTGQDPAEVAKA YFAVGSALDITWYISQISALPVENNWQALARE
 AFRDDVDWQQRRAITIAVLQAGGGSDVETRLALWMMKQNDAMIERWRAMLVEIRAASG
 TDYAMYAVANRELNDVALSGQAVVPAATAELELA

SEQID NO.6-

10 ATGGCGTTCTTCACCGCAGCCAGCAAAGCCGACTTCCAGCACCAACTGCAAGCGG
 C ACTGGCGCAGCACATCAGTGAACAGGCACTGCCACAAGTGGCGCTGTTGCGCTGAAC
 AATTCTTCGGCATCATTTCCCTGGACGAGCTGACCCAACGTCGCCTCTCCGACCTCG
 CTGGCTGTACTCTCTGCGTGGCGCCTGCTTGAGCGCTTCGATCACGCGCAACCGC
 AAGTGCGCGTCTACAACCCCGATTACGAACGTCACGGCTGGCAGTCGACCCACACC
 15 GCGGTGCAAGTGCTGCACCACGACTTGCCGTTCTGGTGGACTCGGTGCGTACCGAG
 CTGAACCGTCGCGGCTACAGCATCCACACCCTGCAGACCACCGTGCTGAGCGTGCGT
 CGTGGCAGCAAGGGCGAATTGCTGGAAATCCTGCCAAAAGGCACCACCGGCGAAGG
 CGTTCTGCACGAGTCGCTGATGTACCTGGAAATCGACCGCTGCGCCAATGCGGCCGA
 ATTGAATGTGCTGTCCAAGGAACTGGAGCAGGTCTGGGTGAAGTCCGCGTCGCGG
 20 TCTCCGATTTTCGAGCCGATGAAGGCCAAGGTGCAGGAAATCCTCACCAAGCTCGAT
 AACAGCGCATTCGCCGTCGATGCCGACGAAAAGAATGAAATCAAGAGCTTCTGGA
 ATGGCTGGTGGGCAACCACTTCACCTTCTCGGCTACGAAGAGTTCACCGTTGTGCA
 TCAGGCCGATGGCGGCCACATCGAATACGACCAGAACTCCTTCTCGGCCTGACCAA
 GATGCTGCGCACCGGTCTGACCAACGAAGACCGCCACATCGAAGACTATGCCGTGA
 25 AGTACCTGCGCGAACCGACACTGCTGTCGTTCCGAAGGCGGCGCATCCGAGCCGC
 GTGCACCGTCCGGCCTACCCGGACTACGTGTGATCCGCGAAATCGATGCCGACGGC
 AAAGTGATCAAGGAACACCGCTTCATGGGCCTGTACACCTCGTCGGTGTATGGCGA
 AAGCGTGCGTGTATCCCGTTTCATCCGCCGCAAGGTGCAGGAAATCGAGCGTCGCTC
 CGGCTTCCAGGCCAAGGCTCACCTGGGCAAGGAACTGGCTCAGGTTCTGGAAGTGC
 30 TGCCGCGTGACGATCTGTTCCAGACCCCGGTGCAGCAACTGTTTCAGCACCGTGATGT
 CGATCGTGACGATCCAGGAACGCAACAAGATCCGCGTGTTCTGCGTAAAGACCCG
 TACGGTCGTTTCTGCTACTGCCTGGCCTACGTGCCGCGTGACATCTACTCCACCGAA
 GTTCGCCAGAAGATCCAGCAAGTGCTGATGGAGCGCCTGAAAGCCTCCGACTGCCA

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
 В ответ на Уведомление от 22.12.2022

ATTCTGGACGTTCTTCTCCGAGTCCGTGCTGGCCCGCGTGCAACTGATCTTGCGCGTC
GACCCGAAAAACCGCATCGACATCGACCCGCTGCAACTGGAAAACGAAGTGATCCA
GGCCTGCCGCAGCTGGCAGGACGACTACGCTGCCCTGACCGTTGAAACCTTCGGCG
AAGCCAACGGCACCAACGTGTTGGCCGACTTCCCGAAAGGCTTCCCGGCCGGCTAC
5 CGCGAGCGTTTCGCAGCGCATTTCGGCCGTGGTTCGACATGCAGCACTTGCTCAATCTG
AGCGAGAAAAAGCCGCTGGCCATGAGCTTTTACCAGCCGCTGGCCTCCGGCCACG
CGAGCTGCACTGCAAGCTGTATCACGCCGATACCCCGCTGGCCCTGTCCGACGTGCT
GCCGATCCTGGAAAACCTCGGCCTGCGCGTGCTGGGTGAGTTCCCGTACCGCCTGCG
TCATACCAACGGCCGCGAGTTCTGGATCCACGACTTCGCGTTACCGCTGCCGAAGG
10 CCTGGACCTGGACATCCAGCAACTCAACGACACCCTGCAGGACGCGTTTCGTCCACAT
CGTCCGTGGCGATGCCGAAAACGATGCGTTCAACCGTCTGGTGCTGACCGCCGGCCT
GCCATGGCGCGACGTGGCGCTGCTGCGTGCCTACGCCCGCTACCTGAAGCAGATCCG
CCTGGGCTTCGACCTCGGCTACATCGCCAGCACCCCTGAACAACCACCGACATCGC
TCGCGAACTGACCCGGTTGTTCAAGACCCGTTTCTACCTGGCCCGCAAGCTGGGCAG
15 CGAGGATCTGGACGACAAGCAACAGCGTCTGGAACAGGCCATCCTGACCGCGCTGG
ACGACGTTCAAGTCTCAACGAAGACCGCATCCTGCGTTCGTTACCTGGACCTGATCA
AAGCAACCCTGCGCACCAACTTCTACCAGACCGACGCCAACGGCCAGAACAAGTCG
TACTTCAGCTTCAAGTTCAACCCGCACTTGATTCTGAACTGCCGAAACCGGTGCCG
AAGTTCGAAATCTTCGTTTACTCGCCACGCGTCGAAGGCGTGACCTGCGCTTCGGC

20

AACGTTGCTCGTGGTGGTCTGCGCTGGTCCGACCGTGAAGAAGACTTCCGTACCG
AA GTCCTCGGCCTGGTAAAAGCCCAGCAAGTGAAGAAGTTCGGTTCATCGTGCCGGTGGG
GGCGAAGGGCGGCTTCCTGCCGCGTCGCCCTGCCACTGGGCGGCAGCCGTGACGAGA
TCGCGGCCGAGGGCATCGCCTGCTACCGCATCTTCATTTCCGGGCCTGTTGGACATCA
25 CCGACAACCTGAAAGACGGCAAACCTGGTACCGCCGGCCAACGTCGTGCGGCATGAC
GACGATGACCCGTACCTGGTGGTTCGCGGGCGGACAAGGGCACTGCAACCTTCTCCGA
CATCGCCAACGGCATCGCCATCGACTACGGCTTCTGGCTGGGTGACGCGTTTCGCGTC
CGGTGGTTCCGGCCGGTTACGACCACAAGAAAATGGGCATCACCGCCAAGGGCGCGT
GGGTCGGCGTACAGCGCCACTTCCGCGAGCGCGGCATCAATGTCCAGGAAGACAGC
30 ATCACGGTGGTTCGGCGTGGGCGACATGGCCGGTGACGTGTTCCGGTAACGGCCTGTTG
ATGTCTGACAAGCTGCAACTGGTTGCTGCGTTCAACCACCTGCACATCTTCATCGAC
CCGAACCCGAACCCGGCCACCAGCTTCGCCGAGCGTCAGCGCATGTTTCGATCTGCCG
CGCTCGGCCTGGTCCGACTACGACACCAGCATCATGTCCGAAGGCGGCGGCATCTTC

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

TCGCGCAGCGCGAAGAGCATCGCCATCTCGCCACAGATGAAAGAGCGCTTCGACAT
CCAGGCCGACAAGCTGACCCCGACCGAACTGCTGAACGCCTTGCTCAAGGCGCCGG
TGGATCTGCTGTGGAACGGCGGTATCGGTACCTACGTCAAAGCCAGCACCGAAAGT
CACGCCGATGTGCGCGACAAGGCCAACGATGCGCTGCGCGTGAACGGCAACGAACT
5 GCGCTGCAAAGTGGTGGGCGAGGGCGGTAACCTCGGCATGACCCAATTGGGTCTGTG
TGGAGTTCGGTCTCAATGGCGGCGGTTCCAACACCGACTTCATCGACAACGCCGGTG
GCGTGGACTGCTCCGACCACGAAGTGAACATCAAGATCCTGCTGAACGAAGTGGTT
CAGGCCGGCGACATGACCGACAAGCAACGCAACCGAGTTGCTGGCGAGCATGACCGA
CGAAGTCGGTGGTCTGGTCTGGGCAACAACACTACAAGCAGACTCAGGCCCTGTCCCT
10 GGCGGCCCGCCGTGCTTATGCGCGGATCGCCGAGTACAAGCGTCTGATGAGCGACC
TGGAGGGCCGTGGCAAGCTGGATCGCGCCATCGAGTTCCTGCCGACCGAAGAGCAA
CTGGCCGAACGCGTTGCCGAAGGCCATGGCCTGACCCGTCCTGAGCTGTCCGGTCTG
ATCTCGTACAGCAAGATCGACCTCAAGGAGCAGCTGCTGGGCTCCCTGGTGCCGGA
CGACGACTACCTGACCCGCGACATGGAAACGGCGTTCCCGCCGACCCTGGTCAGCA
15 AGTTCTCCGAAGCTATGCGTCGTACCCGCCTCAAGCGCGAGATCGTCAGCACCCAGA
TCGCCAACGATCTGGTCAACCACATGGGCATCACCTTCGTTTCAGCGACTCAAAGAGT
CCACGGGCATGACCCCGGCGAATGTTGCCGGTTCGTATGTGATTGTTCCGGATATCT
TCCACCTCCCGCACTGGTTCCGTGAGATCGAAGCGCTGGACTACCAGGTTTCCGCTG
ACGTGCAGCTGGAGCTGATGGACGAGCTGATGCGTCTGGGCCGTGCGGCTACGCGC
20 TGGTTCCTGCGTGCCCGTCGCAACGAGCAGAACGCTGCCCGTGACGTGCGGCATTTTC
GGTCCGCACCTCAAAGAGCTGGGCCTGAAGCTGGACGAGCTGCTGAGCGGCGAAAT
CCGCGAAAACCTGGCAAGAGCGTTATCAGGCGTACGTGCGCCGCCGGTGTTCGGGAAC
TGCTGGCGCGTATGGTGGCGGGGACGACCCACCTCTACACGCTGCTGCCGATCATCG
AAGCGGCCGACGTGACCCGGCCAGGATCCAGCCGAAGTGGCCAAGGCGTACTTCGCC
25 GTGGGCAGCGCGCTGGACATCACCTGGTACATCTCGCAGATCAGCGCCTTGCCGGTT
GAAAACAACCTGGCAGGCCCTGGCCCGTGAAGCGTTCCGCGACGACGTGACTGGCA
GCAACGCGCGATTACCATCGCCGTTCTGCAAGCGGGTGGCGGTGATTCGGACGTGG
AAACCCGTCTGGCACTGTGGATGAAGCAGAACGACGCCATGATCGAACGCTGGCGC
GCCATGCTGGTGGAAATCCGTGCCGCCAGCGGCACCGACTACGCCATGTACGCGGT
30 GGCCAACCGCGAGCTGAACGACGTGGCGCTGAGCGGTGAGGCAGTTGTGCCTGCTG
CGGCGACTGCGGAGCTTGAGCTTGCTTGA

SEQ ID NO. 7-

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

MIHAPSRWGVFPSLGLCSPDVVWNEHPSLYMDKEETSMTNLQTFELPTEVTGCAADISL
 GRALiQAWQKDGIFQIKTDSEQDRKTQEAMAASKQFCKEPLTFKSSCVSDLTYSGYVAS
 GEEVTAGKPDFPEIFTVCKDLSVGDQRVKAGWPCHGPVWPVNNTYQKSMKTFMEELGL
 5 AGERLLKLTALGFELPINTFTDLTRDGWHHMRVLRFPQTSTLSRGIGAHTDYGLLVIAA
 QDDVGGLYIRPPVEGEKRNRNWLPGESSAGMFEHDEPWTFVTPTPGVWTVFPGDILQFMTG
 GQLLSTPHKVKLNTRERFACAYFHEPNFEASAYPLFEPSANERIHYGEHFTNMFMR
 CYPDRITTQRINKENRLAHLLEDLKKYSDTRATGS

10 SEQ ID. NO.8-

ATGATACACGCTCCAAGTAGATGGGGAGTATTTCCCTCACTAGGGTTATGCAGCCC
 G GACGTTGTGTGGAATGAGCATCCGAGCCTGTACATGGACAAAGAGGAAACCAGCAT
 GACCAACCTGCAGACCTTTGAACTGCCGACCGAAGTGACCGTTGCGCGGCGGACA
 TCAGCCTGGGTCTGCGCTGATTCAGGCGTGGCAAAGGATGGTATCTTCCAGATTA
 15 AAACCGACAGCGAGCAGGATCGTAAGACCCAAGAAGCGATGGCGGCGAGCAAGCA
 ATTTTGCAAAGAGCCGCTGACCTTCAAAGCAGCTGCGTTAGCGACCTGACCTACAG
 CGGTTATGTGGCGAGCGGCGAGGAAGTTACCGCGGGCAAGCCGATTTCCCGGAAA
 TTTTACCGTGTGCAAGGACCTGAGCGTGGGCGATCAGCGTGTTAAAGCGGGTTGGC
 CGTGCCATGGTCCGGTTCGTGGCCGAACAACACCTATCAAAGAGCATGAAAACC
 20 TTTATGGAGGAACTGGGTCTGGCGGGCGAGCGTCTGCTGAAACTGACCGCGCTGGG
 TTTTGAAGTCCGATCAACACCTTCACCGACCTGACCCGTGATGGCTGGCACCACAT
 GCGTGTGCTGCGTTTCCCGCCGCAGACCAGCACCTGAGCCGTGGTATTGGTGCAGCA
 CACCGACTACGGTCTGCTGGTGATTGCGGGCGCAAGACGATGTTGGTGGCCTGTATAT
 CCGTCCGCCGGTGGAGGGCGAAAAGCGTAACCGTAACTGGCTGCCGGGCGAGAGCA
 25 GCGCGGGCATGTTTGGAGCACGACGAACCGTGGACCTTCGTTACCCCGACCCCGGGTG
 TGTGGACCGTTTTTCCGGGCGATATTCTGCAGTTCATGACCGGTGGCCAACTGCTGA
 GCACCCCGCACAAAGGTAAACTGAACACCCGTGAACGTTTCGCGTGCGCGTACTTTC
 ACGAGCCGAACCTCGAAGCGAGCGCGTATCCGCTGTTTCGAGCCGAGCGCGAACGAA
 CGTATCCACTACGGCGAGCACTTCACCAACATGTTTATGCGTTGCTATCCGGATCGT
 30 ATCACCACCCAACGTATTAACAAAGAAAACCGTCTGGCGCACCTGGAAGACCTGAA
 GAAATACAGCGACACCCGTGCGACCGGCAGC

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
 В ответ на Уведомление от 22.12.2022

SEQID NO.9-

MYKLVQTIVNSDEKNVLGDFILELGKDHKRYFLRNEILQAFADYCHQFPKPAYFYHSSS
 LGTFIQYTHEIILDGENTWVVRPKIASQEVWLLSADLTKFELMTPKALLDVSDRLVKRY
 QPHILEIDLHPFYSAAPRIDDSRNIGQGLTVLNHYFCNQALTDPEYWIDALFQSLKRLEYN
 5 GIKLLISNHIHSGLQLTKQIKLALEFVSHLSPQTPYIKFKFHLQELGLEPGWGNNAARVRE
 TLELLERLMDNPEPAILETFVSRICAVFRVVLISIHGWV AQEDVLGRDET LGQVIYVLEQ
 ARSLENKMRAEIKLAGLDTLGIKPHIILTRLIPNCEGTFCNLPLEKVDGTENAWILRVPFA
 ESRPEITNNWISKFEIWPYLEKFALDAEAELLKQFQGKPNLIIGNYSDGNLVAFILSRKMK
 VTQCNIAHSLEKPKYLFSNLYWQDLEAQYHFSAQFTADLISMNAADFIITSSYQEIVGTP
 10 DTMGQYESYKCFTMPNLYHVIDGIDLFSFKFNVVLPGVSENIFFPYNQTTNRESHRRQHI
 QDLIFHQEHPEILGKLDHPHKKPIFSVSPITSIKNLTGLVEFCGKSEELQKHSNLILLTSLKH
 PDLGTNSEEIQEIAKIHAIIDQYHLHHKIRWLGMLRPLRDIAETYRVIADFQGIYIHFALYE
 SFSRSILEAMISGLPTFTTQFGGSLEIENHDQGFLNPTDLAGTAKTIINFLEKCENYPEH
 WLENSQWMIERIRHKYNWNSHTNQLLLLTKMFSFWNFIYPEDNEARDRYMESLFLHLLY
 15 KPIADHILSEHLSKIRNHN

SEQID

NO.10:

ATGTATAAATTAGTGCAAACCTATTGTTAACAGTGATGAAAAAATGTTTTAGGTGAC
 TTTATCTTAGAATTAGGCAAGGATCATAAACGTTACTTTTTAAGAAATGAGATTTTA
 20 CAAGCTTTTGCAGATTATTGTCACCAATTCCCAAACCCGCTTATTTTTATCACTCTT
 CCTCTTTAGGGACATTCATTCAATACACCCATGAAATAATTTTAGATGGTGAAAATA
 CTTGGTTTGTAGTTAGACCAAAGATTGCGAGTCAAGAAGTATGGTTATTAAGCGCGGACTT
 GACTAAGITTGAGTTAATGACACCGAAAGCATTAITAGATGTGAGCGATCGCT
 TAGTAAAGCGTTATCAACCGCACATTTTAGAAATTGATCTCCATCCCTITTAITCAGC
 25 AGCACCAAGAATTGATGAITCCAGAAATATTGGCCAAGGTITAACCGTTCTTAATCA
 ITAITTITGTAATCAAGCATTGACAGATCCTGAATAITGGATTGACGCATTATTTCAA
 TCAITAAAAAGAITAGAATATAACGGCATCAAATTATTAATTAGTAATCATATTCAT
 TCAGGITTGCAACTAACAAAGCAAATCAAAGTAGCGITAGAAITGTGAGTCATITA
 TCCCCCAGACACCATATATAAAATITAAATITCATCTTCAAGAACTCGGTTTAGAA
 30 CCAGGITGGGGTAATAATGCAGCCAGAGTCAGAGAAACCTTAGAACTGCTGGAAAG
 ACTCATGGATAATCCCGAACCTGCAATITTAGAAACCITTTCTCGCATITGTGCA
 GITITCCGCGTCTGCITATTTCCATCCATGGITGGGITGCACAAGAAGATGITITAG
 GCAGAGATGAAACAITAGGACAAGTTAITTATGTITTAGAACAAGCCCGCAGTTTAG

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ

В ответ на Уведомление от 22.12.2022

AAAATAAAATGCGGGCAGAAATTAACCTTGCAGGTTTAGATACAITAGGAATTA
 CCCCATATCAITATATTAACCTCGACTGATTCCCAATTGTGAAGGCACATTTTGTAACT
 TACCAITAGAAAAAGTTGATGGTACAGAAAATGCTTGGATITTCGCGITCCITITG
 CAGAATCTCGACCGGAAAITACCAACAACCTGGATITCTAAATTTGAAATTTGGCCTT
 5 AITTAGAAAAATITGCTCITGATGCCGAAGCAGAACTITTAACAATTCCAAGGAA
 AGCCCAATCTAATTATTGGTAACTACAGTGACGGGAACTTAGTTGCTIITTATTCTCTC
 CCGAAAAATGAAAGTTACCCAATGTAATAITGCCATTCCCTCGAAAAACCTAAATA
 TCTAITTAGTAACITATATTGGCAAGATITAGAAGCACAATATCACTTTTCTGCCAA
 ITTACCGCTGATTTAATCAGTATGAATGCCGCAGATTTTATTATCACATCATCCTATC
 10 AAGAAATTGTAGGTACACCAGATACAATGGGACAATATGAATCITATAAATGTTTCA
 CCATGCCCAACTTATATCATGTAATTGATGGCAITGATTTATITAGCCCTAAATTCAA
 TGTGGTATTACCAGGAGTCAGTGAAAATATATTTTTTCCCTACAACCAAACAACAAA
 TAGAGAATCCCACCGTTCGTCACATATCCAAGACCTAATTTTCCATCAAGAACACCC
 AGAAATTCTCGGTAAAITAGATCATCCTCATAAAAAACCGATCITITCCGITAGTCC
 15 CATTACCTCAATTAACCTCACAGGTTTAGTTGAATGTITCGGTAAAAGTGAAGA
 AITACAAAAACATAGTAACCTAATTITATTAACCAGTAACTTCATCCAGACTTAGG
 AACAACTCCGAAGAAATTCAAGAAATAGCAAAAAITCATGCGAITATTGATCAAT
 ATCATCTTACCATAAAATCCGCTGGITGGGAATGCGTCITCCTCTCCGCGATATTGC
 TGAAACCTATCGTGTAATTGCCGATITTCAGGGATTTATATTCACTTTGCCCTITAT
 20 GAATCCTTTAGCAGAAGTATTTTAGAAGCAATGATTTCTGGATTACCAACITTTACA
 ACTCAIITGGTGGITCATTAGAAATTATTGAAAACCATGATCAAGGAIITTAACCTC
 AACCCACAGACITAGCAGGAACAGCCAAAACAATTATCAACTTCTTAGAAAAATG
 TGAANAATATCCAGAACATTGGCTAGAAAATCTCAATGGATGAIITGAACGCATTCCG
 CCATAAATATAACTGGAAITCCCACACAAATCAACTCCTGTTATTAACGAAAATGTT
 25 TAGCTTTTGGAAICATCTATCCCGAAGATAACGAAGCCAGAGATCGTTACATGGA
 AAGTITATITCATCTTCTTTATAAACCTATAGCTGACCATATTITATCAGAACATCTA
 AGCAAAATCAGAAATCATAAITAA

SEQ ID NO. 11:-

30 MAAQNLYILHIQTHGLLRGQNLELGRDADTGGQTKYVLELAQAQAKSPQVQQVDiITR
 QITDPRVSVGYSQAIEPFAPKGRIVRLPFGPKRYLRKELLWPHLYTFADAILQYLAQQKR
 TPTWIQAHYADAGQVGSLLSRWLNPLIFTGHSLGRIKLLKLEQDWPLEEIEAQFNIQQ
 RIDAEEMTLTHADWIVASTQQEVEEQYRVYDRYNPERKLVIPPGVDTRFRFQPLGDRG

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
 В ответ на Уведомление от 22.12.2022

VVLQQELSRFLRDPEKPQILCLCRPAPRKNVPALVRAFGEHPWLRKKNLVLVLGSRQD
 INQMDRGRSRQVFQEIFHLVDYDLYGSVAYPKQHQADDVPEFYRLAAHSGGVFVNPAL
 TEPFGLTILEAGSCGVPVATHDGGPQEILKHCDFTLVDSR PANIA TALATLLSDRDL
 WQCYHRNGIEKVP AHYSWDQHVNTL FERMETVALPRRRAVSFVRSRKR LIDAKRLVVS
 5 DIDNTLLGDRQGLENLMTYLDQYRDHF AFGIATGRRLDSAQEV LKEWGVPSPNFWWTS
 VGSEIHYGTDAEPDISWEKHINRNWNPQRIRAVMAQLPFLELQPEEDQTPFKVSFFVRDRHET
 VLREVRQHLLRRHRLRLKSIYSHQEFDLPLAASKGDAIRHLSLRWRIPLENILVAGD
 SGNDEEMLKGHN LGVVGNYSPELEPLRSYERVYFAEGHYANGILEALKHYRFFEAIA

10	SEQ	ID	NO.12:	-
	GTGGCAGCTCAAATCTCTACATICTGCACATICAGACCCATGGTCTGCTGCGAGGG			
	CAGAACTTGAACTGGGGCGAGATGCCGACACCGGCGGGCAGACCAAGTACGTCTI			
	AGAACTGGCTCAAGCCCAAGCTAAATCCCCACAAGTCCAACAAGTCGACATCATCA			
	CCCGCCAAATCACCGACCCCGCGTCAGTGTTGGTTACAGTCAGGCGATCGAACCT			
15	TIGCGCCCAAAGGTCGGATTGTCCGTTTGCCTTITGGCCCAAACGCTACCTCCGTA			
	AAGAGCTGCTTTGGCCCATCTCTACACCTITGCGGATGCAATTCTCCAATATCTGGC			
	TCAGCAAAAGCGCACCCCGACTTGGATTCAGGCCCACTATGCTGATGCTGGCCAAGT			
	GGGATCACTGCTGAGTCGCTGGTTGAATGTACCGCTAATITICAGGGCATICCTCT			
	GGGGCGGATCAAGCTAAAAAAGCTGTTGGAGCAAGACTGGCCGCTTGAGGAAATIG			
20	AAGCGCAATICAATATTCAACAGCGAATTGATGCGGAGGAGATGACGCTCACTCAT			
	GCTGACTGGATIGTCGCCAGCACTCAGCAGGAAGTGGAGGAGCAATACCGCGTTTA			
	CGATCGCTACAACCCAGAGCGCAAGCTIGTCATTCCACCGGGTGTGATAACCGATCG			
	CTTCAGTTICAGCCCTIGGGCGATCGCGGTGTTGTTCTCCAACAGGAACTGAGCCG			
	CTTTCTGCGCGACCCAGAAAAACCTCAAATICTCTGCCTCTGTCGCCCCGCACCTCG			
25	CAAAAATGTACCGGCGCTGGTGCAGCCTTIGGCGAACATCCTTGGCTGCGCAAAA			
	AAGCCAACCTTGTCTIAGTACTGGGCAGCCGCCAAGACATCAACCAGATGGATCGC			
	GGCAGTCGGCAGGTGTTCCAAGAGATITTCATCTGGTTCGATCGCTACGACCTCTAC			
	GGCAGCGTCGCCTATCCCAAACAGCATCAGGCTGATGATGTGCCGGAGTICTATCGC			
	CTAGCGGCTCATTCCGGCGGGGTATTCGTCAATCCGGCGCTGACCGAACCTTTIGGT			
30	TIGACAATTTIGGAGGCAGGAAGCTGCGGCGTGCCGGTGGTGGCAACCCATGATGG			
	CGGCCCCCAGGAAATICTCAAACACTGTGATTTCCGGCACTTTAGTTGATGTCAGCCG			
	ACCCGCTAATATCGCGACTGCACTCGCCACCCTGCTGAGCGATCGCGATCTTTGGCA			
	GTGCTATCACCGCAATGGCATTGAAAAAGTTCCCGCCCATTACAGCTGGGATCAACA			

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
 В ответ на Уведомление от 22.12.2022

TGTC AATACCCTGTITGAGCGCATGGAAACGGTGGCTTTGCCTCGTCGTCGTGCTGT
 CAGTTTCGTACGGAGTCGCAAACGCTTGATTGATGCCAAACGCCTTGTCGTIAGTGA
 CATCGACAACACACTGTIGGGCGATCGTCAAGGACTCGAGAATTTAATGACCTATCT
 CGATCAGTATCGCGATCATTITGCCTTTGGAATIGCCACGGGGCGTCGCCTAGACTC
 5 TGCCCAAGAAGTCTTGAAAGAGTGGGGCGTTCCTTCGCCAAACTTCTGGGTGACTTC
 CGTCGGCAGCGAGATTCACTATGGCACCGATGCTGAACCGGATATCAGCTGGGAAA
 AGCATATCAATCGCAACTGGAATCCTCAGCGAATICGGGCAGTAATGGCACAATA
 CCCTTICTTGAAGTGCAGCCGGAAGAGGATCAAACACCCTICAAAGTCAGCTTCTTT
 GTCCGCGATCGCCACGAGACTGTGCTGCGAGAAGTACGGCAACATCTICGCCGCCAT
 10 CGCCTGCGGCTGAAGTCAATCTATTCCCATCAGGAGTTICTTGACATTCTGCCGCTA
 GCTGCCTCGAAAGGGGATGCGATTCGCCACCTCTCACTCCGCTGGCGGATICCTCT
 GAGAACATTITGGTGGCAGGCGATICTGGTAACGATGAGGAAATGCTCAAGGGCCA
 TAATCTCGGCGTTGTAGTTGGCAATIACTCACCGGAATTGGAGCCACTGCGCAGCTA
 CGAGCGCGTCTATITIGCTGAGGGCCACTATGCTAATGGCATTCTGGAAGCCTIAAA
 15 AACTATCGCTITTTITGAGGCGATCGCTIAA

SEQID NO. 13:-

CAATTGCCCTAAGACAGTTGTCGTCTTTTGAAGTCTAGTTAACATIAGGGGCGATTC
 TITGTTTCCACTGAGTGGAAAGCAAACGGTATCAAGGTTGCAGGCAGACTCAAGGTCT
 20 AGATTGCTTCACAGCTTGTGTGGCTATATTTATIACTTTCATTATTGATGGTAGTTGT
 GGGTGGATTTAAGATGGAAAAGTAACAGATAAATGTCGTCTTIAAGGGCGATCTAG
 ATCGTATCGTTTTIAATICCTAGGTGCGCATTIATTAATCAACCTCGATAACAATTT
 TITIGTAAAACTTCTAGATAAATGACTCAAGTCTCATTGAAAGTCTGGGGTGTTCCTCCCC
 AGTCAATICAAGATTACCAAGGCCTCGCATCGCCTCTICTATTITGTITGAA
 25 GGGGACCTAACGTGTTGCGCCAAGCTAGTICTCGACAGAGCATCTCAAGAGCGCGTI
 GCTCGCGGGGGGCAAACAGTIGGAGATCAGCCAGCTCTTGCAAGACTTGTGGGTG
 AGGTGGCTGGCAAAGCTACCGGCATAGCGCAGTAAGAGACTGTAGTAGCGAAATIG
 CGGTTGGCCGTIGCAATCGCGGTGAAAGGCAGCAATTTCTGCTTCGCTGAGGCAGTA
 GACAGGGGTATTGACCGGCACGATCGCGCGAGGAATGCCCTGTTGCGCGTAGCGAT
 30 CGCCGCCCTCTGTITCCGCTAAGCTGCCGATCAAACCGTGGAGAGCAGCGTGCGGG
 TTICATTGATTAATCAGGCGTGAATAGTGGGTGCGGCCCACTTGAAAGACGCGGCC
 CGTTGTTGAGAAAGAGGGGATTAACAACACTGCGAGTTGTAGACCACTCCGATCGCC
 CAATGGCGATCGCCTICCAAACGAACAAAGCTGCCAAATCCATAGCTCTCGGCGGCT

GGTGGATIGGAGACATCCATGTCGTCATCCACTTGGACAACGTAGTCACAGTGCGAG
TTGGATTIGACAACTTIGCCGAGGCGCATGGTGCTGCCAGTGTIACAACCAATTAAC
CAATTCTGACATATGGACACCATCGAATGGTGCAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGA
TAGCGCCC GGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTIATA
5 CGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTIATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCA
GGCCAGCCACGTITCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAG
CTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACA ACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTG
ATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCG
ATTAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACG
10 AAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCA
GTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTG
CCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAG
TATIATTITCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGCATT
GGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTIAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCT
15 GCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGA
ACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTICAACAAACCATGCAAATGCTGA
ATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCG
CAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGC GGATATCTCGGTAGTGG
GATACGACGATAACGAAGACAGCTCATGTIATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAAC
20 AGGATTITCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG
GCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTITCACTGGTGAAAAGAAAAACC
ACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTIGGCCGATTCATTAATG
CAGCTGGCACGACAGGTITCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCTTTGTTGACAATT
AATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAGAAGGAGATGA
25 GTATICAACATTICCGTGTGCGCCCTIATICCCTTTTTTTCGCGCATTITGCCTTCCTGTI
TTIGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTIGGGTGC
ACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCG
CCCCGAAGAACGTITICCAATGATGAGCACTITTAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGT
ATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCA
30 GAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTIACGGATGGCATGA
CAGTAAGAGAATIATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA CACTGCGGCCAAC
TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTITIGCACAACATG
GGGGATCATGTA ACTCGCCTIGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
TATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATIAATAGACTGGATGG
AGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTICTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTIA
TTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATIGCAGCACTGG
5 GGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTIATCTACACGACGGGGAGTCAGGCA
ACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATIAAGCA
TTGGTAATTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTITICTITGTGAGTCC
AGGTACCAATCAATCTCCCCAAGTCAAGCGGCGCTGAGACCCAGTGTCTGCCGGTG
AGTCAGTCTIGGCAAGCAAAGTGTGCCTTTGCGATITCTTACCCTACGCAGCTCCGGGATCG
10 ATCGGAGGTAACCAAGGCTACGGACAATGGCGCGGGCACCAGCTGTTGGTA
AACTGAGGAGCGATCGCCGCTTCAAGTCCAAAGGCTATGACGCAAAAATCCGTTGTT
ATTGCTCCGTCATTCTGTCAGCGGATTTCAAGCCGCTTGGGCGACGATGTCCGCGCT
GTTGACCAGGCTGGCGCTGACTGGATTCACGTGATGTGATGGATGGTCGCTTCGTC
CCTAACATCACCATTGGACCGCTGATCGTTGAAGCGCTGCGCCCGGTGACCCAAAAG
15 CCGTTGGACGTCCACTTGATGATCGTCGAGCCGAAAAATATGTGCCGGATTTTCGCG
AAAGCAGGGGCTGACATCATCTCGGTCCAAGCAGAAGCTTGCCCCACCTGCACCG
CAACTTGGCTCAGATCAAAGACCTCGGCAAGCAAGCAGGCGTCGTCCTCAACCCCTC
TACCCAGTCGAAACCCTGGAATACGTGCTGGAGTTGTGCGACCTGATTTTATCAT
GAGCGTCAACCCTGGCTTCGGTGGTCAGAGTTTCAATCCAGCTGTCCTGCCGAAAAT
20 CCGTAAGCTGCGCGCCATGTGCGATGAGCGTGGCCTTGATCCTTGGATTGAAGTCGA
TGGCGGCTTGAAAGCCAATAACACTTGGCAGGTGCTGGAAGCCGGTGCTAACGCAA
TTGTGGCGGGCTCGGCAGTCTTCAACGCGCCGACTATGCTGAAGCGATCGCGGGC
ATTCGCAACAGCAAGCGTCCTGAACTTGTCACTGCTTAGGCTTCTCGCTCAACGCTC
AGTGGAGCAATCTGAATCTTGCAGCCCTTCAAGTGGATCAGTCTGCTGAGGGGTTTTG
25 CTTTAGGATGGGCGATCGCGAGTAGGGACACGGATCGCTGGTA

SEQ ID NO. 14: -

ATGGACGCTTACTCTACCCGTCGCTGACCCTGTCTCACGGTTCTCTGGAACACGTTTC
30 TGCTGGTTCCGACCGCTTCTTTCTTTCATCGCTTCTCAGCTGCAGGAACAGTTCAACAA
AATCCTGCCGGAACCGACCGAAGGTTTCGCTGCTGACGACGAACCGACCCCGG
CTGAACTGGTTGGTAAATTCCTGGGTACGTTTCTTCTGTTGAACCGTCTAAAGT
TGGTCAGTTCGACCAGGTTCTGAACCTGTGCCTGACCGAATTCGAAAAGTCTACCT

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

GGAAGGTAACGACATCCACGCTCTGGCTGCTAAACTGCTGCAGGAAAACGACACCA
CCCTGGTTAAAACCAAAGAACTGATCAAAAACCTACATCACCGCTCGTATCATGGCTA
AACGTCCGTTGACAAAAAATCTAACTCTGCTCTGTTCCGTGCTGTTGGTGAAGGTA
ACGCTCAGCTGGTTGCTATCTTCGGTGGTCAGGGTAACACCGACGACTACTTCGAAG
5 AACTGCGTGACCTGTACCAGACCTACCACGTTCTGGTTGGTGACCTGATCAAATTCT
CTGCTGAAACCCTGTCTGAACTGATCCGTACCACCTGGACGCTGAAAAAGTTTTCA
CCCAGGGTCTGAACATCCTGGAATGGCTGGAAAACCCGTCTAACACCCCGGACAAA
GACTACCTGCTGTCTATCCCGATCTCTTGCCCGCTGATCGGTGTTATCCAGCTGGCTC
ACTACGTTGTTACCGCTAAACTGCTGGGTTTCACCCCGGGTGAAGTGGTTCTTACCT
10 GAAAGGTGCTACCGGTCACCTCTCAGGGTCTGGTTACCGCTGTTGCTATCGCTGAAAC
CGACTCTTGGGAATCTTTCTTCGTTTCTGTTTCGTAAGCTATCACCGTTCTGTTCTTCA
TCGGTGTTCGTTGCTACGAAGCTTACCCGAACACCTCTCTGCCGCCGTCTATCCTGGA
AGACTCTCTGGAAAACAACGAAGGTGTTCCGTCTCCGATGCTGTCTATCTCTAACCT
GACCCAGGAACAGGTTCCAGGACTACGTTAACAAAACCAACTCTCACCTGCCGGCTG
15 GTAAACAGGTTGAAATCTCTCTGGTTAACGGTGCTAAAAACCTGGTTGTTTCTGGTC
CGCCGCAGTCTCTGTACGGTCTGAACCTGACCCTGCGTAAAGCTAAAGCTCCGTCTG
GTCTGGACCAGTCTCGTATCCCGTTCTCTGAACGTAAACTGAAATTCTCTAACCGTTT
CCTGCCGGTTGCTTCTCCGTTCCACTCTCACCTGCTGGTTCCGGCTTCTGACCTGATC
AACAAAGACCTGGTTAAAAACAACGTTTCTTTCAACGCTAAAGACATCCAGATCCCG
20 GTTTACGACACCTTCGACGGTTCTGACCTGCGTGTTCTGTCTGGTTCTATCTCTGAAC
GTATCGTTGACTGCATCATCCGTCTGCCGGTTAAATGGGAAACCACCACCCAGTTCA
AAGCTACCCACATCCTGGACTTCGGTCCGGGTGGTGCTTCTGGTCTGGGTGTTCTGA
CCCACCGTAACAAAGACGGTACCGGTGTTTCGTGTTATCGTTGCTGGTACCCTGGACA
TCAACCCGGACGACGACTACGTTTTCAAACAGGAAATCTTCGACGTTACCTCTAACG
25 GTCTGAAAAAAAACCCGAACTGGCTGGAAGAATACCACCCGAAACTGATCAAAAAC
AAATCTGGTAAAATCTTCGTTGAAACCAAATTCTCTAAACTGATCGGTCGTCCGCCG
CTGCTGGTTCCGGGTATGACCCCGTGACCGTTTTCTCCGGACTTCGTTGCTGCTACCA
CCAACGCTGGTTACCCATCGAACTGGCTGGTGGTGGTACTTCTCTGCTGCTGGTATGA
CCGCTGCTATCGACTCTGTTGTTTCTCAGATCGAAAAAGGTTCTACCTTCGGTAT
30 CAACCTGATCTACGTTAACCCGTTTCATGCTGCAGTGGGGTATCCCGCTGATCAAAGA
ACTGCGTTCTAAAGGTTACCCGATCCAGTTCCTGACCATCGGTGCTGGTGTTCGTCT
CTGGAAGTTGCTTCTGAATACATCGAAACCCTGGGTCTGAAATACCTGGGTCTGAAA
CCGGGTCTATCGACGCTATCTCTCAGGTTATCAACATCGCTAAAGCTCACCCGAAC

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

TTCCCGATCGCTCTGCAGTGGACCGGTGGTTCGTGGTGGTGGTCACCACTCTTTCGAA
GACGCTCACACCCCGATGCTGCAGATGTA CTCTAAAATCCGTCGTCACCCGAACATC
ATGCTGATCTTCGGTTCTGGTTTCGGTTCTGCTGACGACACCTACCCGTACCTGACCG
GTGAATGGTCTACCAAATTCGACTACCCGCCGATGCCGTTTCGACGGTTTCCTGTTCC
5 GTTCTCGTGTTATGATCGCTAAAGAAGTTAAAACCTCTCCGGACGCTAAAAAATGCA
TCGCTGCTTGCACCGGTGTTCCGGACGACAAATGGGAACAGACCTACAAAAAACCG
ACCGGTGGTATCGTTACCGTTTCGTTCTGAAATGGGTGAACCGATCCACAAAATCGCT
ACCCGTGGTGTATGCTGTGGAAAGAATTCGACGAAACCATCTTCAACCTGCCGAAA
AACAAACTGGTTCCGACCCTGGAAGCTAAACGTGACTACATCATCTCTCGTCTGAAC
10 GCTGACTTCCAGAAACCGTGGTTCGCTACCGTTAACGGTCAGGCTCGTGACCTGGCT
ACCATGACCTACGAAGAAGTTGCTAAACGTCTGGTTGAACTGATGTTTCATCCGTTCT
ACCAACTCTTGGTTCGACGTTACCTGGCGTACCTTCACCGGTGACTTCCTGCGTCGTG
TTGAAGAACGTTTTACCAAATCTAAAACCCTGTCTCTGATCCAGTCTTACTCTCTGCT
GGACAAACCGGACGAAGCTATCGAAAAAGTTTTCAACGCTTACCCGGCTGCTCGTG
15 AACAGTTCCTGAACGCTCAGGACATCGACCACTTCCTGTCTATGTGCCAGAACCCGA
TGCAGAAACCGGTTCCGTTCCGTTCCGTTCTGGACCGTCGTTTCGAAATCTTCTTCAA
AAAAGACTCTCTGTGGCAGTCTGAACACCTGGAAGCTGTTGTTGACCAGGACGTTCA
GCGTACCTGCATCCTGCACGGTCCGGTTGCTGCTCAGTTCACCAAAGTTATCGACGA
ACCGATCAAATCTATCATGGACGGTATCCACGACGGTCACATCAAAAAACTGCTGC
20 ACCAGTACTACGGTGACGACGAATCTAAAATCCCGGCTGTTGAATACTTCGGTGGTG
AATCTCCGGTTGACGTTCACTCTCAGGTTGACTCTTCTTCTGTTTCTGAAGACTCTGC
TGTTTTCAAAGCTACCTCTTCTACCGACGAAGAATCTTGGTTCAAAGCTCTGGCTGGT
TCTGAAATCAACTGGCGTCACGCTTCTTTCCTGTGCTCTTTCATCACCCAGGACAAAA
TGTTTCGTTTCTAACCCGATCCGTAAAGTTTTCAAACCGTCTCAGGGTATGGTTGTTGA
25 AATCTCTAACGGTAACACCTCTTCTAAAACCGTTGTTACCCTGTCTGAACCGGTTCA
GGGTGAACTGAAACCGACCGTTATCCTGAAACTGCTGAAAGAAAACATCATCCAGA
TGGAATGATCGAAAACCGTACCATGGACGGTAAACCGGTTTCTCTGCCGCTGCTGT
ACAACTTCAACCCGGACAACGGTTTCGCTCCGATCTCTGAAGTTATGGAAGACCGTA
ACCAGCGTATCAAAGAAATGTA CTGGA AACTGTGGATCGACGAACCGTTCAACCTG
30 GACTTCGACCCGCGTGACGTTATCAAAGGTAAAGACTTCGAAATCACCGCTAAAGA
AGTTTACGACTTCACCCACGCTGTTGGTAACA AACTGCGAAGACTTCGTTTCTCGTCC
GGACCGTACCATGCTGGCTCCGATGGACTTCGCTATCGTTGTTGGTTGGCGTGCTAT
CATCAAAGCTATCTTCCCGAACACCGTTGACGGTGACCTGCTGAAACTGGTTACCT

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ

В ответ на Уведомление от 22.12.2022

GTCTAACGGTTACAAAATGATCCCGGGTGCTAAACCGCTGCAGGTTGGTGACGTTGT
TTCTACCACCGCTGTTATCGAATCTGTTGTTAACCAGCCGACCGGTAAAATCGTTGA
CGTTGTTGGTACCCTGTCTCGTAACGGTAAACCGGTTATGGAAGTTACCTCTTCTTTC
TTCTACCGTGGTAACTACACCGACTTCGAAAACACCTTCCAGAAAACCGTTGAACCG
5 GTTTACCAGATGCACATCAAAACCTCTAAAGACATCGCTGTTCTGCGTTCTAAAGAA
TGGTTCAGCTGGACGACGAAGACTTCGACCTGCTGAACAAAACCTGACCTTCGAA
ACCGAAACCGAAGTTACCTTCAAAAACGCTAACATCTTCTCTTCTGTAAATGCTTC
GGTCCGATCAAAGTTGAACTGCCGACCAAAGAAACCGTTGAAATCGGTATCGTTGA
CTACGAAGCTGGTGCTTCTCACGGTAACCCGGTTGTTGACTTCCTGAAACGTAACGG
10 TTCTACCCTGGAACAGAAAGTTAACCTGGAAAACCCGATCCCGATCGCTGTTCTGGA
CTCTTACACCCCGTCTACCAACGAACCGTACGCTCGTGTCTTCTGGTGACCTGAACCC
GATCCACGTTTCTCGTCACTTCGCTTCTTACGCTAACCTGCCGGGTACCATCACCCAC
GGTATGTTCTCTTCTGCTTCTGTTCTGCTCTGATCGAAAACCTGGGCTGCTGACTCTG
TTTCTTCTCGTGTTCTGGTTACACCTGCCAGTTCGTTGACATGGTTCTGCCGAACACCGC
15 TCTGAAAACCTCTATCCAGCACGTTGGTATGATCAACGGTTCGTAACCTGATCAA
ATTCGAAACCCGTAACGAAGACGACGTTGTTGTTCTGACCGGTGAAGCTGAAATCG
AACAGCCGGTTACCACCTTCGTTTTACCCGGTCAGGGTTCTCAGGAACAGGGTATGG
GTATGGACCTGTACAAAACCTCTAAAGCTGCTCAGGACGTTTGAACCGTGCTGACA
ACCACTTCAAAGACACCTACGGTTTCTCTATCCTGGACATCGTTATCAACAACCCGG
20 TTAACCTGACCATCCACTTCGGTGGTGA AAAAGGTAAACGTATCCGTGAAAACCTACT
CTGCTATGATCTTCGAAACCATCGTTGACGGTAAACTGAAAACCGAAAAATCTTCA
AAGAAATCAACGAACACTCTACCTCTTACACCTTCGTTCTGAAAAGGTCTGCTGT
CTGCTACCCAGTTCACCCAGCCGGCTCTGACCCTGATGGAAAAGCTGCTTTCGAAG
ACCTGAAATCTAAAGGTCTGATCCCGGCTGACGCTACCTTCGCTGGTCACTCTCTGG
25 GTGAATACGCTGCTCTGGCTTCTCTGGCTGACGTTATGTCTATCGAATCTCTGGTTGA
AGTTGTTTTCTACCGTGGTATGACCATGCAGGTTGCTGTICCGCGTGACGAACTGGG
TCGTTCTAACTACGGTATGATCGCTATCAACCCGGGTCGTGTIGCTGCTICTTTCTCT
CAGGAAGCTCTGCAGTACGTTGTTGAACGTGTTGGTAAACGTACCGGTIGGCTGGTI
GAAATCGTTAACTACAACGTTGAAAACAGCAGTACGTIGCTGCTGGTGACCTGCGT
30 GCTCTGGACACCGTIACCAACGTTCTGAACTTCATCAAACCTGCAGAAAATCGACATC
ATCGAACTGCAGAAATCTCTGTCTCTGGAAGAAGTTGAAGGTCACCTGTTCGAAATC
ATCGACGAAGCTICTAAAAAATCTGCTGTTAAACCGCGTCCGCTGAAACTGGAACGT
GGTTICGCTTGCATCCCGCTGGTTGGTATCTCTGTTCCGTTCCACTCTACCTACCTGA

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ
В ответ на Уведомление от 22.12.2022

TGAACGGTGTAAACCGTTCAAATCTTTCCTGAAAAAAACATCATCAAAGAAAAC
 GTTAAAGTTGCTCGTCTGGCTGGTAAATACATCCCGAACCTGACCGCTAAACCGTTC
 CAGGTTACCAAAGAATACTTCCAGGACGTTTACGACCTGACCGGTTCTGAACCGATC
 AAAGAAATCATCGACAACCTGGGAAAAATACGAACAGTCTIAA

5

SEQ ID NO. 15: -

AGCTCTACTCCCATTATTATCGTTTTCTGTGATCTTTTCTACATACTGTGCTTCAAAA
 GAAAAAGGAAAATGCAGCGTGCCTTTCGTCGTCTCAGCAAGCGTGCCGTCGTTCC
 CTGCAACTGCGGCGCTGCTICGGTTTTCTCAGACGACGTCGCTGGTTCGTGCCCTG
 10 TTACCGCGTGCGCAGGCGCTGTTCTTGCCTACCAGTGCTCTATCCGAGCCTACTCCG
 ATGCCACCACGAGGAGAGCGCTACTCGCAGCGCCAATACCTCCTCGACAAGAAC
 GACGTGCTGACGCGTGTGCTCGAGGTAGTGAAGAACTTCGAGAAGGTTGATGCCTCT
 AAGGTGACGCCTGAGTCTCACTTCGTGAACGATCTCGGCCTCAACTCTCTCGACGTT
 GTGGAGGTCGTITTTGCCATCGAGCAGGAGTTCATCTTAGATATCCCTGATCACGAT
 15 GCCGAAAAGATCCAGTCCATTCTGATGCTGTGGAGTACATTGCGCAGAATCCAATG
 GCCAAGTAA

SEQ ID NO. 16: -

ATGGAAGGTTCTCCGGTTACCTCTGTICGTCTGTCTTCTGTTGTTCCGGCTTCTGTTGT
 20 TGGTGAACAACAACCGCGTCAGCTGACCCCGATGGACCTGGCTATGAAACTGCACT
 ACGTICGTGCTGTTTACTTCTTCAAAGGTGCTCGTGACTTCACCGTTGCTGACGTTAA
 AAACACCATGTTACCCTGCAGTCTCTGCTGCAGTCTTACCACCACGTTTCTGGTCGT
 ATCCGTATGTCTGACAACGACAACGACACCTCTGCTGCTGCTATCCCGTACATCCGT
 TGCAACGACTCTGGTATCCGTGTTGTIGAAGCTAACGTTGAAGAATTCACCGTIGAA
 25 AAATGGCTGGAACCTGGACGACCGTTCTATCGACCACCGTTTCCTGGTTIACGACCAC
 GTTCTGGGTCCGGACCTGACCTTCTCTCCGCTGGTTTICCTGCAGATCACCCAGTTCA
 AATGCGGTGGTCTGTGCATCGGTCTGTCTTGGGCTCACATCCTGGGTGACGTTTTCTC
 TGCTTCTACCTTCATGAAAACCTGGGTGAGTGGTTTCTGGTACGCTCCGACCAA
 ACCGGTITACCCGAAAACCCCGAACTGACCTCTCACGCTCGTAACGACGGTGAAG
 30 CTATCTCTATCGAAAAATCGACTCTGTTGGTGAATACTGGCTGCTGACCAACAAAT
 GCAAAATGGGTGCTCACATCTTCAACTTCTCTCTGAACCACATCGACTCTCTGATGG

CTAAATACACCACCCGTGACCAGCCGTTCTCTGAAGTTGACATCCTGTACGCTCTG
A
TCTGGAATCTCTGCTGAACATCCGTGGTCAAACCAACCAACGTIATCACCATCT
GCCACCGTAAAAATCTTCTACCTGCTGGAACGAAGACCTGGTIATCTCTGTTGTTG
5 AAAAAACGACGAAATGGTTGGTATCTCTGAACTGGCTGCTCTGATCGCTGGTGAA
AACGTGAAGAAAACGGTGCTATCAAACGTATGATCGAACAGGACAAAGGTICTIC
TGACTTCTICACCTACGGTGCTAACCTGACCTTCGTTAACCTGGACGAAATCGACAT
GTACGAACTGGAAATCAACGGTGGTAAACCGGACTICGTTAACTACACCATCCACG
GTGTIGGTGACAAAGGTGTTGTTCTGGTITCCCGAAACAGAACTTCGCTCGTATCG
10 TTICTGTTGTTATGCCGGAAGAAGACCTGGCTAAACTGAAAGAAGAAGTIACCAAC
ATGATCATCTAA

SEQ ID NO: 17 –

MVDKRESYTKEDLLASGRGELFGAKGPQLPAPNMLMMDRVVVKMTETGGNFDK
15 GYVE
AELDINPDLWFFGCHFIGDPVMPGCLGLDAMWQLVGFYLGWLGEGEKGRALGVGEVK
FTGQVLPTAKKVYRIHFKRIVNRRLIMGLADGEVLVDGRLIYTASDLKVGLEFQDTSAF

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система биопроизводства для получения органического продукта, содержащая: по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора;

где указанный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического субстрата,

где указанный культуральный раствор органического субстрата содержит первый рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического субстрата,

где указанный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический субстрат,

где указанный первый рекомбинантный микроорганизм способен использовать источник углерода для продукции указанного органического субстрата,

где указанный первый рекомбинантный микроорганизм продуцирует по меньшей мере одну культуральную примесь органического субстрата, включающую кислород, по меньшей мере один побочный продукт в газовой, жидкой и твердой фазе; и

где указанный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора содержит культуральный раствор органического продукта,

где указанный культуральный раствор органического продукта содержит второй рекомбинантный микроорганизм, имеющий улучшенную способность к продукции органического продукта,

где указанный второй рекомбинантный организм экспрессирует по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности фермента, образующего органический продукт,

где указанный второй рекомбинантный организм способен использовать указанный органический субстрат для продукции указанного по меньшей мере одного органического продукта.

2. Система по п. 1, в которой указанный по меньшей мере один культуральный сосуд биореактора включает первый культуральный сосуд биореактора, включающий впускное отверстие для источника углерода, и источник энергии; и второй культуральный сосуд биореактора, включающий путь потока жидкости, соединенный с и находящийся между первым культуральным сосудом биореактора и вторым культуральным сосудом биореактора, и выпускное отверстие для органического продукта;

где указанный первый культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического субстрата, и указанный второй культуральный сосуд биореактора включает культуральный раствор органического продукта; или

где указанный первый культуральный сосуд биореактора или указанный второй культуральный сосуд биореактора дополнительно содержит порт для сбора биомассы.

3. Система по п. 2, в которой источник углерода включает диоксид углерода, монооксид углерода, глицерин, глюкозу, фруктозу, сахарозу, моносахарид, дисахарид, полисахарид, гликоген, уксусную кислоту, жирную кислоту или их комбинацию; или

в которой источник энергии включает солнечный свет, источник солнечной энергии, источник электрической энергии или их комбинацию; или

в которой летучий газ включает кислород, метан или их комбинацию; или

в которой по меньшей мере один органический субстрат включает альфа-кетоглутарат, сахарозу, глюкозу, фруктозу, ксилозу, арабинозу, галактозу, глицерин, моносахарид, дисахарид, полисахарид, гликоген, жирную кислоту или их комбинацию; или

в которой по меньшей мере один органический продукт включает спирт, метанол, этанол, пропанол, бутанол, этандиол, органическую кислоту, пропионовую кислоту, уксусную кислоту, альдегид, формальдегид, длинноцепочечную жирную кислоту, *n*-алкан, углеводород, этан, пропен, бутен, этан, пропан, бутан, C₂-C₂₀алкан, C₂-C₂₀алкен или их комбинацию; или

в которой второй культуральный сосуд биореактора дополнительно включает впускное отверстие для источника углерода, выпускное отверстие для летучего газа, источник энергии или их комбинацию.

4. Система по п. 1, в которой культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединены в одном культуральном сосуде биореактора; или

культуральный раствор органического субстрата и культура органического продукта разделены фильтром, где указанный фильтр включает размер пор от примерно 0,2 мкм до примерно 10 мкм или более; или

где указанная система дополнительно содержит блок карбонизации, аминовый десорбер, установку аминокислотной очистки, каталитический конвертер, холодильник, компрессор, башню щелочения, сушилку или их комбинации.

5. Система по п. 1, в которой органический субстрат включает альфа-кетоглутарат (AKG), при этом количество указанного по меньшей мере одного фермента, образующего AKG, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий AKG; или

в которой указанный по меньшей мере один фермент, образующий органический продукт, включает фермент, образующий этилен (EFE), при этом количество EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE.

6. Система по п. 5, в которой первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует по меньшей мере один белок альфа-кетоглутаратпермеазу (AKGP) посредством осуществления экспрессии по меньшей мере одной ненативной нуклеотидной последовательности, образующей AKGP.

7. Система по п. 5, в которой указанный по меньшей мере один фермент, образующий AKG, включает белок изоцитратдегидрогеназу (ICD), белок глутаматдегидрогеназу (GDH) или их комбинацию.

8. Система по п. 7, в которой первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок ICD, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка ICD, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2; или

первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок GDH, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка GDH, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6, или

их комбинацию; или в которой второй рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок EFE, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 7, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка EFE, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 8.

9. Система по п. 1, в которой первый рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из фотосинтезирующей бактерии, *Cyanobacteria*, *Synechococcus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus leopoliensis*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Chlamydomonas* и *Chlamydomonas reinhardtii*; или

в которой второй рекомбинантный микроорганизм включает микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Geobacteria*, *Arthrobacter paraffineus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas Putida*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Serratia marcescens*, *Bacillus metatherium*, *Candida paludigena*, *Pichia inositovora*, *Torulopsis glabrata*, *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cereviciae*, вида рода *Aspergillus*, *Bacillus subtilis* и вида рода *Lactobacillus*.

10. Система по п. 1, в которой первый рекомбинантный микроорганизм включает дельта-glgc мутантный микроорганизм, не имеющий экспрессии белка глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы; или в которой указанный первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозосинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности белка сахарозосинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 10; или в которой первый рекомбинантный микроорганизм экспрессирует белок сахарозофосфатсинтазу, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 11, посредством осуществления экспрессии ненативной нуклеотидной последовательности сахарозофосфатсинтазы, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 12.

11. Система по п. 5, в которой количество по меньшей мере одного фермента, образующего АКГ, продуцируемого первым рекомбинантным микроорганизмом, больше на от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей фермент, образующий АКГ; или

в которой количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, больше на от примерно 5% до примерно 200% или более, чем количество, продуцируемое относительно контрольного микроорганизма, не имеющего ненативной нуклеотидной последовательности, экспрессирующей EFE; или

в которой количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 20 граммов до примерно 100 граммов на литр или более культурального раствора органического продукта.

12. Система по п. 5, в которой второй рекомбинантный микроорганизм включает *E. coli*, и количество белка EFE, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 30% до примерно 80% или более от общего клеточного количества белка второго рекомбинантного микроорганизма; или

скорость продукции по меньшей мере одного органического продукта, продуцируемого вторым рекомбинантным микроорганизмом, составляет от примерно 45,36 миллионов килограммов/год до примерно 453,6 миллионов килограммов/год или более; или в которой концентрация популяции клеток второго рекомбинантного микроорганизма находится в диапазоне от примерно 10^7 до примерно 10^{13} клеток на миллилитр, или, в сухой массе клеток на литр культурального раствора органического продукта, от примерно 100 граммов до примерно 300 граммов сухой массы клеток на литр.

13. Система по п. 5, в которой ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая фермент, образующий АКГ, или ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, вставлена в микробный экспрессионный вектор, где указанный микробный экспрессионный вектор включает плазмиду бактериального вектора, нуклеотид-проводник системы гомологичной рекомбинации, устойчивую к антибиотикам систему и вспомогательную систему для очистки и выявления белка, систему CRISPR CAS, систему фагового дисплея или их комбинацию.

14. Система по п. 5, в которой нуклеотидная последовательность, экспрессирующая EFE, имеет число копий в микробном экспрессионном векторе от примерно 2 до примерно 500; или в которой указанный микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии.

15. Система по п. 14, в которой по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор *Lac*, промотор T7, промотор *CspA*, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор *psbA* или их комбинацию.

16. Способ получения органического продукта, включающий стадии, на которых:

берут систему биопроизводства по п. 2;

культивируют первый рекомбинантный микроорганизм в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в первом культуральном сосуде биореактора; и

культивируют второй рекомбинантный микроорганизм во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта во втором культуральном сосуде биореактора.

17. Способ по п. 16, дополнительно включающий стадии, на которых:

удаляют некоторое количество по меньшей мере одного летучего газа из культурального раствора органического субстрата через выпускное отверстие для летучего газа;

удаляют некоторое количество по меньшей мере одного органического продукта из культурального раствора органического продукта через выпускное отверстие для органического продукта;

при условии, что источник углерода включает диоксид углерода, подают некоторое количество диоксида углерода из источника диоксида углерода в культуральный раствор органического субстрата через впускное отверстие для источника углерода;

поддерживают уровень pH культурального раствора органического субстрата и культурального раствора органического продукта от примерно 5,0 до примерно 8,5;

поддерживают культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта при температуре от примерно 25 градусов Цельсия до примерно 70 градусов Цельсия;

при условии, что первый культуральный сосуд биореактора или второй культуральный сосуд биореактора включает порт для сбора биомассы, осуществляют сбор некоторого количества биомассы, продуцированной первым рекомбинантным микроорганизмом или вторым рекомбинантным микроорганизмом, через порт для сбора биомассы; или

поддерживают количество летучего газа во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или менее, в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора.

18. Способ по п. 16, в котором ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, или ненативную нуклеотидную последовательность, экспрессирующую органический продукт, вставляют в микробный экспрессионный вектор, где указанный по меньшей мере один микробный экспрессионный вектор включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии, дополнительно включающий стадию, на которой:

осуществляют контроль количества продуцируемых по меньшей мере одного органического субстрата или количества по меньшей мере одного органического продукта посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата или культуральный раствор органического продукта.

19. Способ по п. 18, в котором указанный по меньшей мере один микробный промотор экспрессии включает светочувствительный промотор, хемочувствительный промотор, температурочувствительный промотор, промотор Lac, промотор T7, промотор CspA, промотор PL лямбда, промотор CL лямбда, промотор постоянной продукции, промотор psbA или их комбинацию; и по меньшей мере один индуктор промотора включает лактозу, ксилозу, IPTG, холодовой шок, тепловой шок или их комбинацию.

20. Способ по п. 16, дополнительно включающий стадию, на которой:

при условии, что указанная по меньшей мере одна культуральная примесь органического субстрата включает по меньшей мере один летучий газ, удаляют указанный по меньшей мере один летучий газ через выпускное отверстие для летучего газа; или

выделяют некоторое количество по меньшей мере одного органического продукта, продуцируемого со скоростью от примерно 45,36 миллионов килограммов/год до примерно 453,6 миллионов килограммов/год; или

где количество указанного по меньшей мере одного продуцируемого органического продукта содержит количество летучего газа примерно 1 мольный процент или меньше.

21. Способ получения органического продукта, включающий стадии, на которых:

берут систему биоремедиации по п. 1, в которой культуральный раствор органического субстрата и культуральный раствор органического продукта объединены в одном культуральном сосуде биореактора, при этом ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая рекомбинантный фермент, образующий органический субстрат, вставлена в первый микробный экспрессионный вектор, при этом ненативная нуклеотидная последовательность, экспрессирующая фермент, образующий органический продукт, вставлена во второй микробный экспрессионный вектор, причем каждый из первого и второго микробного экспрессионного вектора включает по меньшей мере один микробный промотор экспрессии,

берут источник углерода, соединенный с выпускным отверстием для источника углерода;

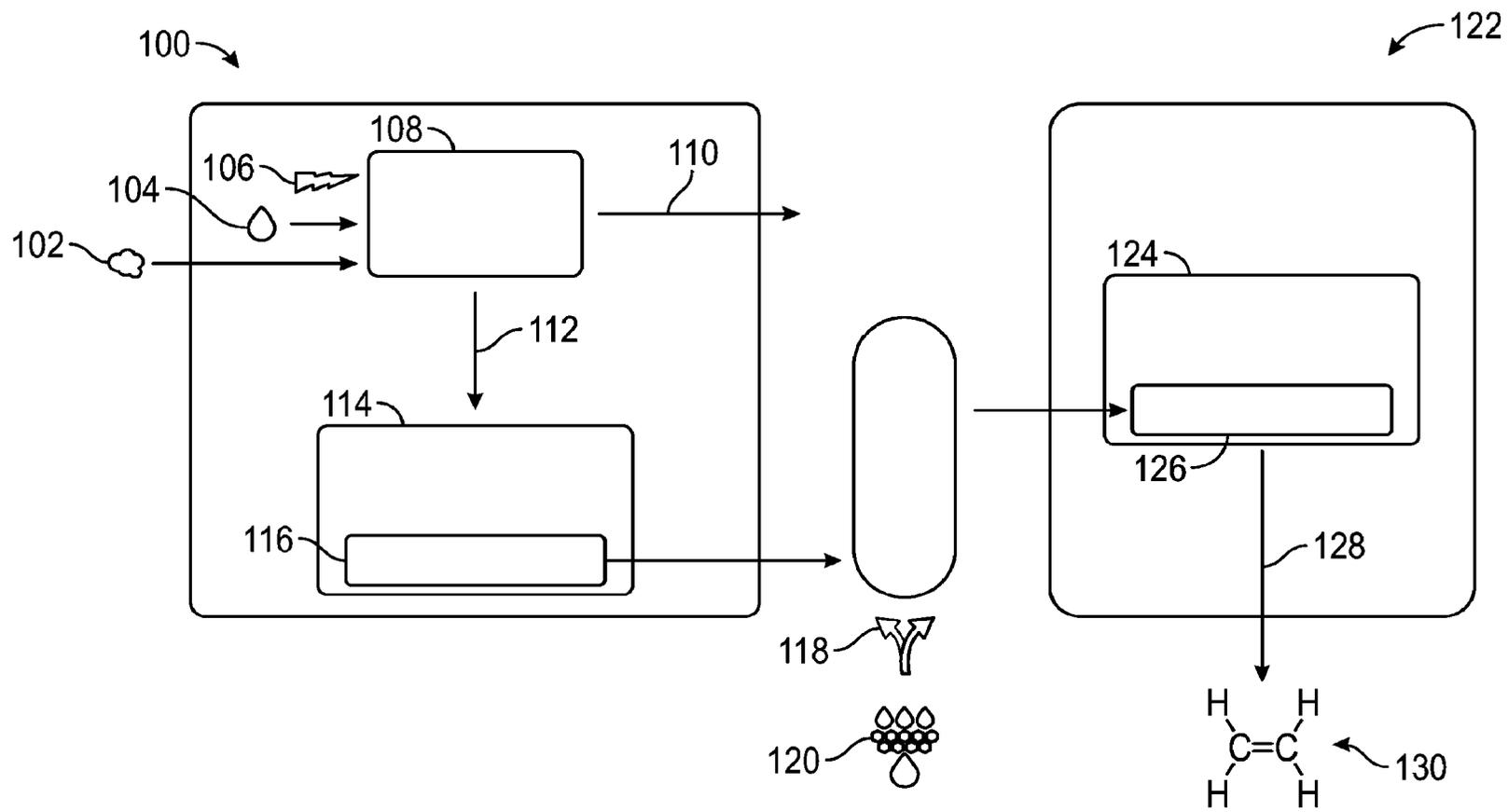
культивируют первый рекомбинантный микроорганизм в первом культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического субстрата в указанном первом культуральном сосуде биореактора;

получают определенное количество указанного по меньшей мере одного органического субстрата посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического субстрата в первый момент времени;

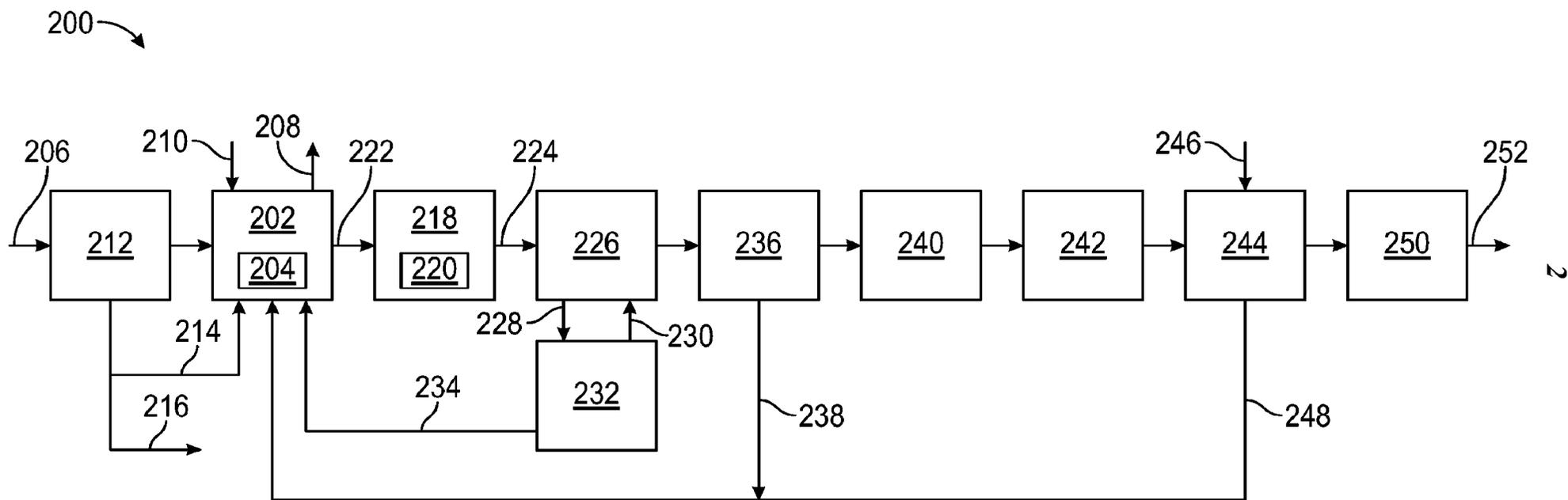
культивируют второй рекомбинантный микроорганизм во втором культуральном сосуде биореактора в условиях, достаточных для продукции некоторого количества по меньшей мере одного органического продукта в указанном втором культуральном сосуде биореактора; и

получают определенное количество указанного по меньшей мере одного органического продукта посредством добавления по меньшей мере одного индуктора промотора в культуральный раствор органического продукта во второй момент времени.

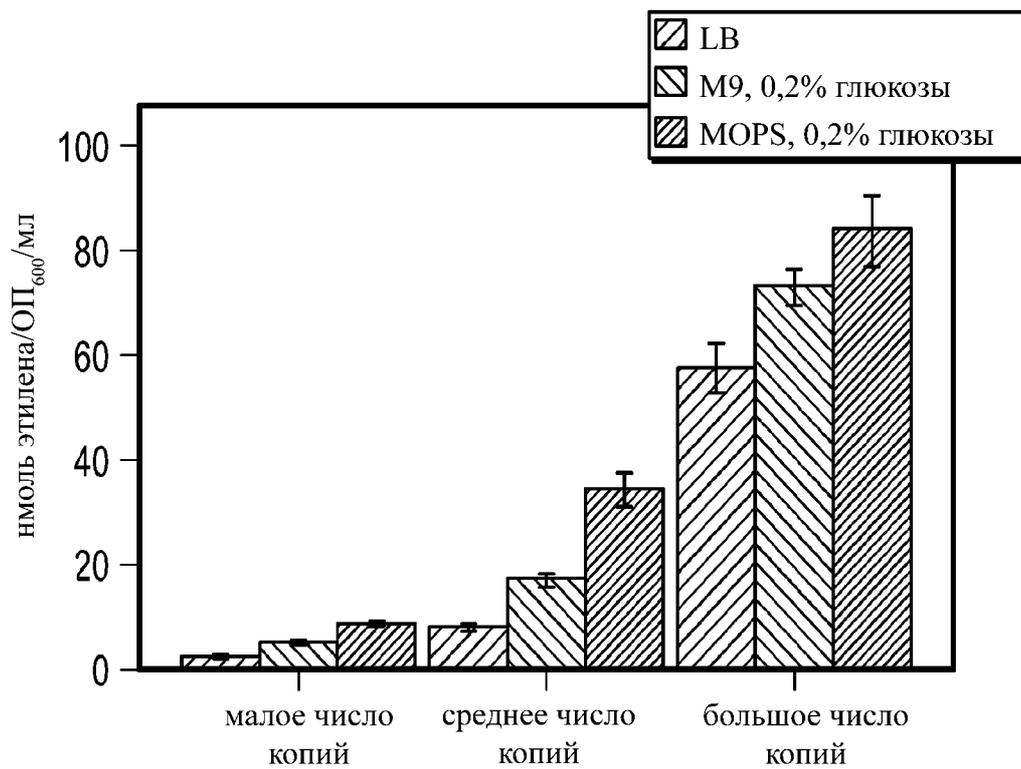
22. Способ по п. 21, дополнительно включающий снижение количества кислорода во втором культуральном сосуде биореактора от примерно 10% по объему до примерно 1% по объему или менее, в расчете на общий внутренний объем второго культурального сосуда биореактора, перед вторым моментом времени.



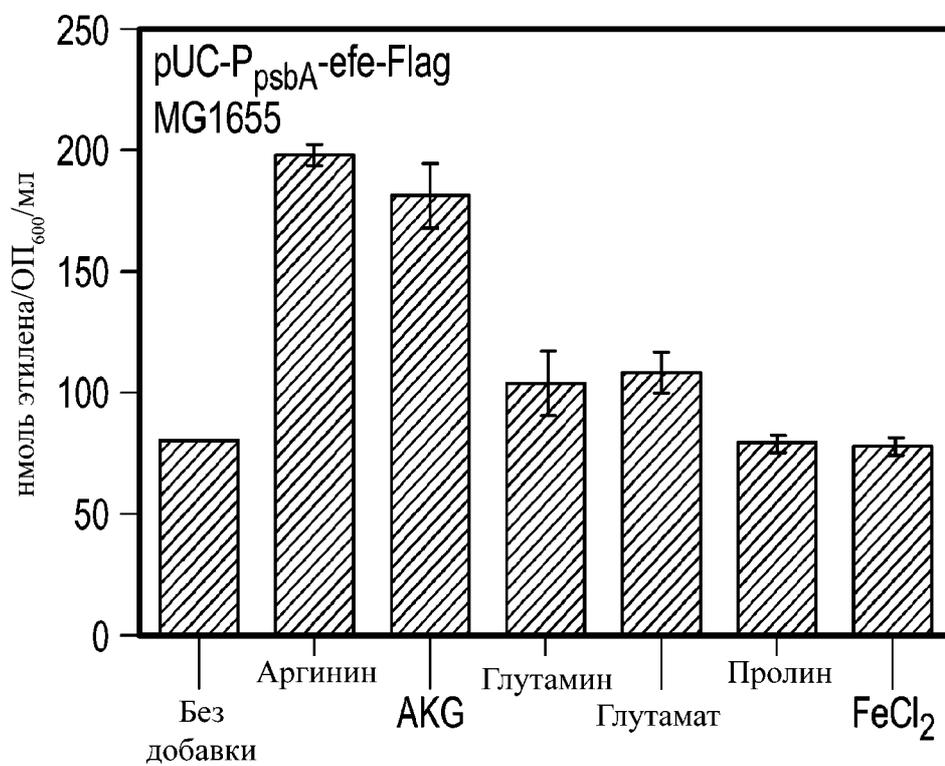
ФИГ. 1



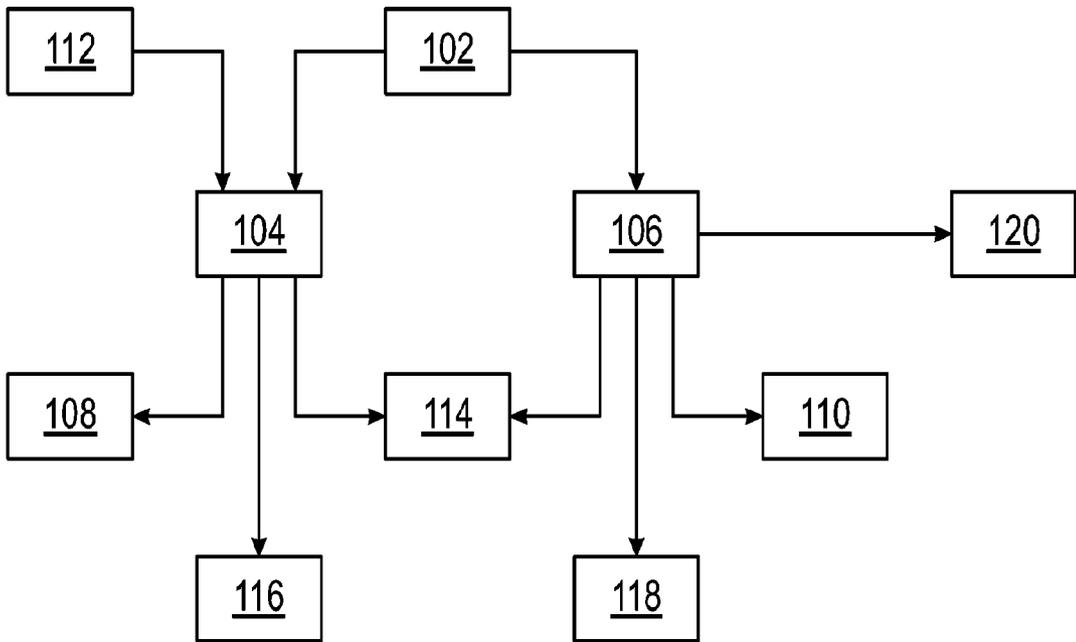
ФИГ. 2



ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 4