

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201792544** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.05.31

(22) Дата подачи заявки
2016.05.26

(51) Int. Cl. **C12N 15/70** (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

(54) ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ ХОРИЗМАТА ПРОДУКТОВ

(31) **62/167,101**

(32) **2015.05.27**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/034495**

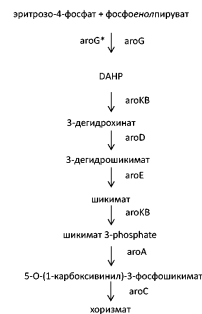
(87) **WO 2016/191625 2016.12.01**

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

(72) Изобретатель:
**Берендорфф Джеймс Брюс Ярнтон,
Кёпке Михель, Тран Лоан Пхуонг,
Аллен Уайатт Эрик (US)**

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

(57) Согласно настоящему изобретению предложены генетически сконструированные микроорганизмы и способы получения происходящих из хоризмата продуктов, таких как парагидроксibenзойная кислота, салицилат, 2-аминобензоат, 2,3-дигидроксibenзоат и 4-гидроксициклогексанкарбоновая кислота. Как правило, указанный микроорганизм содержит по меньшей мере одно из следующего: (a) экзогенную хоризмат-пируват-лиазу, (b) экзогенную изохоризматсинтазу, (c) экзогенную изохоризмат-пируват-лиазу и (d) префенатсинтазу, которая содержит нарушающую экспрессию мутацию.



201792544

A1

A1

201792544

ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ ХОРИЗМАТА ПРОДУКТОВ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

1 Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент
5 США № 62/167,101, поданной 27 мая 2015 г., полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

2 Настоящее изобретение относится к генетически сконструированным
микроорганизмам и способам получения происходящих из хоризмата продуктов путем
10 микробиологической ферментации, в частности, путем микробиологической ферментации газообразного субстрата.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

3 Современные химические продукты, которые получают биологическим путем с
применением либо продовольственных, либо непродовольственных
15 сельскохозяйственных культур с получением сырьевых материалов на основе сахаров или целлюлозы, отличаются недостатками, связанными с землепользованием, продовольственной безопасностью, нестабильностью поставок и экологическими проблемами.

4 Уже долгое время известно, что каталитические процессы можно применять для
20 преобразования газов, содержащих монооксид углерода (CO), и/или диоксид углерода (CO₂) и водород (H₂), в различные виды топлива и химические вещества. Однако для биологического преобразования таких газов в топливо и химические вещества можно также применять микроорганизмы. Биологические процессы отличаются рядом преимуществ относительно каталитических процессов, в том числе более высокой
25 специфичностью, более высоким выходом, меньшими затратами энергии и большей устойчивостью к отравлению катализатора.

5 CO представляет собой основной богатый свободной энергией побочный продукт
неполного сгорания органических материалов, таких как уголь или нефть, и
происходящих из нефти продуктов. Например, сталеплавающая промышленность в
30 Австралии, по имеющимся сведениям, производит и выбрасывает в атмосферу свыше 500 000 тонн CO ежегодно.

6 Способность микроорганизмов расти, потребляя СО в качестве единственного источника углерода, впервые была обнаружена в 1903 г. Позже было определено, что указанная способность присуща микроорганизмам, использующим для аутотрофного роста биохимический путь ацетилкофермента А (ацетил-КоА), также известный как путь Вуда-Льюнгаля. Значительное число анаэробных микроорганизмов, в том числе карбоксидотрофных, фотосинтезирующих, метаногенных и ацетогенных, как было показано, метаболизируют СО с образованием различных конечных продуктов, а именно, СО₂, Н₂, метана, н-бутанола, ацетата и этанола.

7 Ароматическое соединение пара-гидроксибензойная кислота (рНВА) представляет собой основной мономер, применяемый в жидкокристаллических полимерах, а также в качестве предшественника для получения парагидроксибензоатов или сложных эфиров парагидроксибензойной кислоты, обычно называемых парабенами. Жидкокристаллические полимеры включают кевлар и вектран, которые находят разное применение. Парабены и их соли применяют в ряде отраслей, включая косметическую, фармацевтическую и пищевую промышленность. Они представляют собой эффективные консерванты и, ввиду бактерицидных и фунгицидных свойств, могут применяться в косметических и пищевых составах.

8 Соответственно, сохраняется потребность в дополнительных микроорганизмах и способах получения рНВА и других высокоценных происходящих из хоризмата продуктов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

9 Согласно настоящему изобретению предложен генетически сконструированный (генно-инженерно-модифицированный) микроорганизм, способный продуцировать происходящие из хоризмата продукты. В частности, согласно настоящему изобретению предложен генетически сконструированный микроорганизм, способный продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт, при этом бактерия содержит по меньшей мере что-либо одно из (а) экзогенной хоризмат-пируват-лиазы (ЕС 4.1.3.40), (b) экзогенной изохоризматсинтазы (ЕС 5.4.4.2), (с) экзогенной изохоризмат-пируват-лиазы (ЕС 4.2.99.21) и (d) префенатсинтазы (ЕС 5.4.99.5), содержащей нарушающую экспрессию мутацию. Согласно конкретным вариантам реализации указанный генетически сконструированный микроорганизм представляет собой С1-усваивающую бактерию, такую как бактерия *Clostridium*, способную продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт путем ферментации С1-содержащего газообразного субстрата.

- 10 Например, хоризмат-пируват-лиаза может представлять собой *ubiC*,
изохоризматсинтаза может представлять собой *pchA*, исохоризмат-пируват-лиаза может
представлять собой *pchB*, а префенатсинтаза может представлять собой *pheA*.
Нарушающая экспрессию мутация префенатсинтазы может понижать или полностью
5 устранять экспрессию или активность префенатсинтазы. Такая нарушающая экспрессию
мутация может приводить к образованию бактерии, которая продуцирует пониженное
количество префената или происходящих из префената продуктов по сравнению с
исходной бактерией, и/или бактерии, которая по существу не продуцирует тирозин или
фенилаланин.
- 10 11 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать по меньшей
мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере что-либо одно из (a)
экзогенной хоризмат-пируват-лиазы, (b) экзогенной исохоризматсинтазы, (c) экзогенной
изохоризмат-пируват-лиазы и (d) префенатсинтазы, содержащей нарушающую
экспрессию мутацию. Согласно некоторым вариантам реализации указанную
15 нуклеиновую кислоту кодон-оптимизируют для экспрессии в *Clostridium*.
- 12 Происходящий из хоризмата продукт может представлять собой любой продукт,
продуцируемый прямым или непрямым образом из хоризмата. В частности,
происходящий из хоризмата продукт может содержать 6-членное углеродное кольцо,
например, бенzenовое или циклогексановое кольцо, замещенное карбоксильной группой
20 или карбоксилатным анионом, и дополнительно замещенное по меньшей мере одной OH-
группой и/или по меньшей мере одной NH₂-группой. Происходящие из хоризмата
продукты включают, не ограничиваясь перечисленными, пара-гидроксибензойную
кислоту, салицилат, 2-аминобензоат, дигидроксибензоат и 4-
гидроксициклогексанкарбоновую кислоту.
- 25 13 Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему
изобретению экспрессирует хоризмат-пируват-лиазу *ubiC* и продуцирует происходящий
из хоризмата продукт, пара-гидроксибензойную кислоту. Согласно одному варианту
реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению дополнительно
экспрессирует нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.
- 30 14 Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему
изобретению экспрессирует исохоризматсинтазу *pchA* и исохоризмат-пируват-лиазу *pchB*,
и продуцирует происходящий из хоризмата продукт, салицилат. Согласно одному
варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению дополнительно
экспрессирует нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

15 Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению включает префенатсинтазу, содержащую нарушающую экспрессию мутацию, и продуцирует один или более происходящих из хоризмата продуктов, 2-аминобензоат, 2,3-дигидроксибензоат, 3,4-дигидроксибензоат и 4-5 гидроксциклогексанкарбоновую кислоту.

16 Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению продуцирует по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт, который не продуцирует исходный микроорганизм, или продуцирует большее количество по меньшей мере одного происходящего из хоризмата продукта, чем исходный 10 микроорганизм.

17 Согласно одному варианту реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из C1-усваивающей исходной бактерии. Согласно предпочтительному варианту реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Clostridium* 15 *autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из исходной бактерии *Clostridium autoethanogenum*, депонированной в DSMZ под номером доступа DSM23693.

18 Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения продукта 20 ферментации, включающий ферментирование микроорганизма согласно настоящему изобретению в присутствии C1-содержащего газообразного субстрата. Обычно продукт ферментации представляет собой происходящий из хоризмата продукт. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный газообразный субстрат содержит по меньшей мере один источник C1-углерода.

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

19 На Фиг. 1 приведена схема, отражающая продуцирование хоризмата природным шикиматным путем у *Clostridia*.

20 На Фиг. 2 приведена схема, отражающая путь продуцирования рНВА у генетически сконструированной бактерии *Clostridium*.

30 21 На Фиг. 3 приведена схема, отражающая путь продуцирования салицилата у генетически сконструированной бактерии *Clostridium*.

22 На Фиг. 4 приведена схема, отражающая путь продуцирования ароматических продуктов у генетически сконструированной бактерии *Clostridium*, содержащей нарушающую экспрессию мутацию в нуклеиновой кислоте, кодирующей pheA.

- 23 На Фиг. 5 приведен график стандартной кривой для количественного определения с использованием аутентичных стандартов рНВА.
- 24 На Фиг. 6а приведен график, отражающий общее количество ионов аутентичных стандартов (i) аутентичный стандарт рНВА (триметилсилилированной) в супернатанте культуральной среды *C. autoethanogenum* LZ1561, (ii) аутентичный стандарт рНВА (триметилсилилированной) в воде и (iii) масс-спектр триметилсилилированной рНВА.
- 25 На Фиг. 6б приведен график, отражающий регистрацию выбранных ионов для ферментированных образцов и стандартов: (i) *C. autoethanogenum* LZ1561 без плазмиды рARO_01, (ii) и (iii) образцы *C. autoethanogenum* LZ1561, несущей плазмиду рARO_01, (iv) аутентичный стандарт рНВА и (v) сравнение общего количества ионов в для рНВА в базе данных NIST и пика рНВА для LZ1561/рARO_01.
- 26 На Фиг. 7 приведена схема плазмиды рARO_01. Хоризмат-пируват-лиаза (ubiC) и нечувствительная к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтаза (agoG*) находятся под контролем промотора пути Вуда-Льюнгаля (Pwl). Также показаны другие характеристики челночного вектора.
- 27 На Фиг. 8 приведен график, отражающий накопление биомассы в тестируемых штаммах. Биомассу оценивали по изменению поглощения в образцах культур при 600 нм в разные моменты времени. Точки данных соответствуют среднему для культур в n=3 повторностях ± 1 стандартное отклонение. LZ1561 относится к нетрансформированной *C. autoethanogenum* LZ1561. рARO_01(1) и рARO_01(2) – биологические репликаты *C. autoethanogenum* LZ1561, трансформированной плазмидой рARO_01.
- 28 На Фиг. 9а и 9б приведены графики, отражающие накопление п-гидроксibenзоата в тестируемых штаммах. На Фиг. 9а представлено количественное определение рНВА, детектированной в каждом образце в моменты времени 24, 96, 144 и 192 часа. Из культур в трех повторностях получали образцы для определения штамма отрицательного контроля (*C. autoethanogenum* LZ1561) и *C. autoethanogenum* LZ1561, несущей рARO_01, два биологических репликата. На Фиг. 9б приведено среднее для n=3 технических повторностей ± 1 SD.
- 29 На Фиг. 10 приведен график, отражающий продуцирование новых ароматических соединений генетически сконструированной бактерией *Clostridium*, содержащей нарушающую экспрессию мутацию в нуклеиновой кислоте, кодирующей pheA. Штамм Δ pheA продуцирует 4-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту, 2-аминобензойную

кислоту и 3,4-дигидроксibenзойную кислоту, тогда как контрольный штамм (LZ1561) не продуцирует указанных кислот.

30 На Фиг. 11a приведен график, отражающий прирост биомассы продуцирующего салицилат штамма с индукцией и без индукции пути биосинтеза салицилата.

5 **31** На Фиг. 11b приведен график, отражающий различия в накоплении салицилата в жидких культурах тестируемого штамма с индукцией и без индукции пути биосинтеза салицилата.

32 На Фиг. 12 приведен график, отражающий концентрацию 4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты, 2-аминобензойной кислоты и 3,4-
10 дигидроксibenзойной кислоты, полученных путем ферментации сконструированной бактерии *Clostridium*, содержащей нарушающую экспрессию мутацию в нуклеиновой кислоте, кодирующей pheA.

33 На Фиг. 13 приведена таблица, где указаны примеры источников хоризмат-пируват-лиазы (ЕС 4.1.3.40).

15 **34** На Фиг. 14 приведена таблица, где указаны примеры источников изохоризматсинтазы (ЕС 5.4.4.2).

35 На Фиг. 15 приведена таблица, где указаны примеры источников изохоризмат-пируват-лиазы (ЕС 4.2.99.21).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 **36** *Clostridia* естественным образом продуцируют хоризмат, который служит в качестве предшественника ароматических аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина, продуцируемых из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата через шикиматный путь (Фиг. 1). Указанный путь подробно описан в источнике: Bentley, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 25,5: 307-384, 1990. Согласно настоящему изобретению предложена
25 генетически сконструированная бактерия, способная продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт путем ферментации газообразного субстрата.

37 Авторы настоящего изобретения продемонстрировали возможность устойчивого получения и выделения из источника C1-углерода происходящих из хоризмата продуктов. Согласно настоящему изобретению предложен способ получения по меньшей мере одного
30 происходящего из хоризмата продукта с использованием C1-содержащего газообразного субстрата в качестве главного источника углерода и энергии. Таким образом, согласно настоящему изобретению обеспечивается ряд преимуществ по сравнению с процессами,

задействующими субстраты на основе сахара или целлюлозы. Так, субстраты на основе сахара или целлюлозы, как правило, также подходят для пищевого применения (как, например, сахарный тростник), и связанное с ними интенсивное землепользование имеет отрицательные экологические последствия. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен альтернативный способ получения происходящих из хоризмата продуктов, необязательно посредством использования газообразных отходов (например, СО образующегося в ходе промышленных процессов). Соответственно, согласно настоящему изобретению предложен источник получения прибыли из газообразных отходов и, кроме того, захват углерода из указанных газообразных отходов со снижением выброса диоксида углерода, имеющего место при сгорании указанных газов в атмосфере.

38 Гетеротрофные микроорганизмы, такие как *E. coli* и *S. cerevisiae*, продуцируют относительно высокие уровни АТФ путем гликолиза. Напротив, микроорганизмы, использующие источники С1-углерода (например, СО или СО₂), отличаются низкой доступностью АТФ. Например, при анализе реакционной кинетики типичного карбоксидотрофного микроорганизма *C. autoethanogenum* расчетный выход АТФ при продуцировании рНВА, происходящего из хоризмата продукта, составляет -0,4 АТФ на моль фиксируемого СО. Соответственно, ввиду энергетических ограничений продуцирование какого-либо количества рНВА маловероятно. Аналогичным образом, маловероятно, что карбоксидотрофный микроорганизм будет продуцировать другие происходящие из хоризмата продукты ввиду метаболической нагрузки при продуцировании таких соединений в аутотрофных условиях. Тем не менее, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что, неожиданным образом, из газообразного субстрата может быть получен ряд происходящих из хоризмата продуктов. Кроме того, указанные продукты могут быть получены из газообразных промышленных отходов, что обеспечивает практические, экономические и экологические преимущества относительно применения других субстратов.

39 В частности, согласно настоящему изобретению предложены генетически сконструированные микроорганизмы, способные продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт за счет введения по меньшей мере чего-либо одного из (а) нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенную хоризмат-пируват-лиазу, (b) нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенную изохоризматсинтазу (также известную как изохоризматмутаза), (с) нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенную изохоризмат-пируват-лиазу, и (d) нуклеиновой кислоты, кодирующей префенатсинтазу, содержащую нарушающую экспрессию мутацию. Согласно предпочтительному варианту реализации

указанный генетически сконструированный микроорганизм представляет собой C1-фиксирующую бактерию, способную продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт путем ферментации газообразного субстрата. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанная C1-фиксирующая бактерия
5 представляет собой бактерию *Clostridium*.

40 Термины «происходящий из хоризмата продукт», или «продукт, происходящий из хоризмата», или аналогичные термины охватывают продукты, продуцируемые прямым или непрямым образом из хоризмата (или хоризмовой кислоты). Происходящие из хоризмата продукты, как правило, содержат 6-членное углеродное кольцо, например,
10 бенzenовое или циклогексановое кольцо, замещенное карбоксильной группой или карбоксилатным анионом, и дополнительно замещенное одной или более ОН-групп и/или одной или более NH₂-групп. В частности, происходящие из хоризмата продукты включают, не ограничиваясь перечисленными, пара-гидроксibenзойную кислоту, салицилат, 2-аминобензоат, 2,3-дигидроксibenзоат, 3,4-дигидроксibenзоат и 4-
15 гидроксibenзоат.

41 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать экзогенный фермент хоризмат-пируват-лиазу (ЕС 4.1.3.40), которая катализирует конверсию хоризмата в пара-гидроксibenзойную кислоту и пируват на первом обязательном этапе биосинтеза убихинона. Указанный фермент может происходить из любого
20 микроорганизма, у которого имеется такой фермент. Указанный фермент может представлять собой фермент UbiC. Фермент UbiC может происходить из *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* или любого другого микроорганизма, у которого имеется фермент UbiC. Согласно одному варианту реализации указанный фермент UbiC происходит из *Escherichia coli* и содержит SEQ ID NO: 1 или ее функционально
25 эквивалентный вариант.

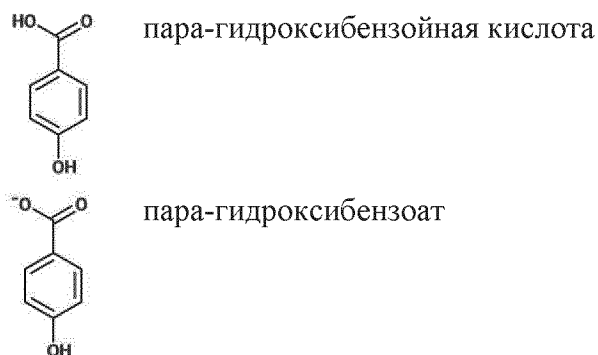
42 Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенную хоризмат-пируват-лиазу. Указанная нуклеиновая кислота может представлять собой ген хоризмат-пируват-лиазы, происходящий из любого микроорганизма, у которого имеется такой ген. Указанный ген
30 хоризмат-пируват-лиазы может представлять собой ген *ubiC*. Указанный ген *ubiC* может происходить из *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* или любого другого микроорганизма, у которого имеется ген *ubiC*. Согласно одному варианту реализации указанный ген *ubiC* происходит из *Escherichia coli* и содержит SEQ ID NO: 2 или ее кодон-оптимизированный или функционально эквивалентный вариант.

43 Фермент UbiC или ген *ubiC* может также быть модифицирован (например, мутирован) для повышения растворимости, стабильности или других свойств гена/фермента. Такие модификации могут приводить к увеличению титра продукта. В примере 4 описан экспериментальный протокол для конструирования фермента UbiC для
5 уменьшения ингибирования продукта за счет удержания пара-гидроксибензойной кислоты. Одна конкретная модификация включает конструирование гена *ubiC* для экспрессии фермента UbiC с двумя поверхностно-активными серинами вместо цистеинов. Остатки серин обеспечивают менее выраженную агрегацию белков и, следовательно, улучшение растворимости. Соответственно, согласно конкретному варианту реализации
10 фермент UbiC содержит мутацию, обеспечивающую замену по меньшей мере одного поверхностно-активного цистеина на серин.

44 Согласно альтернативным вариантам реализации указанная хоризмат-пируват-лиаза (ЕС 4.1.3.40) может быть получена или может происходить, например, из любых источников, идентифицированных на Фиг. 13.

15 45 Введение экзогенной хоризмат-пируват-лиазы (например, *ubiC*) или нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенную хоризмат-пируват-лиазу (например, *ubiC*) приводит к продуцированию микроорганизмом согласно настоящему изобретению пара-гидроксибензойной кислоты – происходящего из хоризмата продукта. Продуцирование пара-гидроксибензойной кислоты иллюстрирует Фиг. 2. С1-фиксирующие бактерии,
20 включающие виды *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*, естественным образом не продуцируют пара-гидроксибензойную кислоту. Фактически, поскольку убихинон обычно продуцируют только аэробно дышащие микроорганизмы, хоризмат-пируват-лиаза, как правило, отсутствует у карбоксидотрофных микроорганизмов. Хотя можно ожидать, что
30 перенаправление хоризмата на продуцирование рНВА вместо аминокислот будет оказывать вредные эффекты на рост или выживание микроорганизма, авторы настоящего изобретения показали, что воздействие на микроорганизм не достигает степени, значимо ухудшающей выживание и рост в стандартных условиях.

46 Пара-гидроксibenзойная кислота может называться также, например, pHBA, 4-гидроксibenзойной кислотой, п-гидроксibenзойной кислотой или пара-гидроксibenзоатом. В настоящем документе любыми из указанных терминов охвачена указанная молекула как в форме кислоты, так и в форме аниона.



5

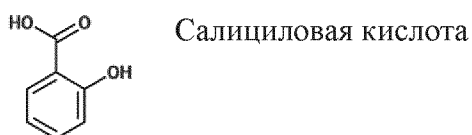
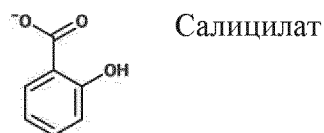
47 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать экзогенный фермент изохоризматсинтазу, также называемую изохоризматмутазой, (EC 5.4.4.2), которая катализирует конверсию хоризмата в изохоризмат. Указанный фермент может происходить из любого микроорганизма, у которого имеется такой фермент. Указанный фермент может представлять собой фермент PchA. Указанный фермент PchA может происходить из *Pseudomonas aeruginosa* или любого другого микроорганизма, у которого имеется фермент PchA. Согласно одному варианту реализации указанный PchA фермент происходит из *Pseudomonas aeruginosa* и содержит SEQ ID NO: 3 или ее функционально эквивалентный вариант.

15 48 Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенную изохоризматсинтазу. Указанная нуклеиновая кислота может представлять собой ген изохоризматсинтазы, происходящий из любого микроорганизма, у которого имеется такой ген. Указанный ген изохоризматсинтазы может представлять собой ген *pchA*. Указанный ген *pchA* может происходить из *Pseudomonas aeruginosa* или любого другого микроорганизма, у которого имеется ген *pchA*. Согласно одному варианту реализации указанный ген *pchA* происходит из *Pseudomonas aeruginosa* и содержит SEQ ID NO: 4 или ее кодон-оптимизированный или функционально эквивалентный вариант.

25 49 Согласно альтернативным вариантам реализации изохоризматсинтаза (EC 5.4.4.2) может быть получена или может происходить, например, из любых источников, идентифицированных на Фиг. 14.

- 50** Микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать экзогенный фермент изохоризмат-пируват-лиазу (ЕС 4.2.99.21), которая катализирует конверсию изохоризмата в салицилат и пируват. Указанный фермент может происходить из любого микроорганизма, у которого имеется такой фермент. Указанный фермент может представлять собой фермент PchB. Указанный фермент PchB может происходить из *Pseudomonas aeruginosa* или любого другого микроорганизма, у которого имеется фермент PchB. Согласно одному варианту реализации указанный фермент PchB происходит из *Pseudomonas aeruginosa* и содержит SEQ ID NO: 5 или ее функционально эквивалентный вариант.
- 51** Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенную изохоризмат-пируват-лиазу. Указанная нуклеиновая кислота может представлять собой ген изохоризмат-пируват-лиазы, происходящий из любого микроорганизма, у которого имеется такой ген. Указанный ген изохоризмат-пируват-лиазы может представлять собой ген *pchB*. Указанный ген *pchB* может происходить из *Pseudomonas aeruginosa* или любого другого микроорганизма, у которого имеется ген *pchB*. Согласно одному варианту реализации указанный ген *pchB* происходит из *Pseudomonas aeruginosa* и содержит SEQ ID NO: 6 или ее кодон-оптимизированный или функционально эквивалентный вариант.
- 52** Согласно альтернативным вариантам реализации указанная изохоризмат-пируват-лиаза (ЕС 4.2.99.21) может быть получена или может происходить, например, из любых источников, идентифицированных на Фиг. 15.
- 53** Введение (1) экзогенной изохоризматсинтазы (например, *pchA*) и (2) экзогенной изохоризмат-пируват-лиазы (например, *pchB*) приводит к продуцированию салицилата, происходящего из хоризмата продукта, микроорганизмом согласно настоящему изобретению. Продуцирование салицилата иллюстрирует Фиг. 3, на которой видно, что изохоризматсинтаза преобразует хоризмат в изохоризмат, а затем изохоризмат-пируват-лиаза преобразует его в салицилат и пируват. С1-фиксирующие бактерии, включающие виды *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*, естественным образом не продуцируют салицилат.

54 Салицилат может также быть называться, например, 2-гидроксибензоатом, салициловой кислотой или 2-гидроксибензойной кислотой. В настоящем документе любыми из указанных терминов охвачена указанная молекула как в форме кислоты, так и в форме аниона.



5

(d) Префенатсинтаза, содержащая нарушающую экспрессию мутацию

55 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать фермент префенатсинтазу (ЕС 5.4.99.5), содержащую нарушающую экспрессию мутацию. Префенатсинтаза, как правило, катализирует конверсию хоризмата в префенат (т.е. мутазную реакцию хоризмат ↔ префенат). Соответственно, фермент префенатсинтаза, содержащий нарушающую экспрессию мутацию, неспособен или обладает меньшей способностью катализировать конверсию хоризмата в префенат. Указанная префенатсинтаза, содержащая нарушающую экспрессию мутацию, может представлять собой *pheA*, содержащую нарушающую экспрессию мутацию. Указанная префенатсинтаза может также называться хоризматмутазой.

56 Согласно некоторым вариантам реализации указанный фермент *pheA* может представлять собой бифункциональный фермент, осуществляющий как префенатсинтазную (т.е. хоризматмутазную) (ЕС 5.4.99.5), так и префенатдегидратазную (ЕС 4.2.1.51) реакции. У микроорганизмов, у которых указанные две реакции осуществляют отдельные ферменты, нокаут активности ЕС 5.4.99.5 приводит к значимому уменьшению или полному прекращению продуцирования префената или следующих за префенатом соединений, тогда как нокаут активности только ЕС 4.2.1.51 не приводит к такому же фенотипу, поскольку префенат все же может продуцироваться. Согласно одному варианту реализации *pheA* происходит из *Clostridium autoethanogenum* и содержит SEQ ID NO: 11 или ее функционально эквивалентный вариант.

57 Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую префенатсинтазу, содержащую нарушающую экспрессию мутацию. Указанная нуклеиновая кислота может представлять

собой ген *pheA*, содержащий нарушающую экспрессию мутацию. Согласно одному варианту реализации указанная нарушающая экспрессию мутация представляет собой нокаутную мутацию гена *pheA*. Согласно одному варианту реализации указанный ген *pheA* происходит из *Clostridium autoethanogenum* и содержит SEQ ID NO: 10 или ее кодон-оптимизированный или функционально эквивалентный вариант.

58 Разрушение префенатсинтазы приводит к снижению или полному прекращению продуцирования фенилаланина и тирозина. Неожиданным образом, разрушение префенатсинтазы также приводит к продуцированию дополнительных продуктов, которые, как правило, не продуцируются или продуцируются исключительно в очень 10 незначительных количествах.

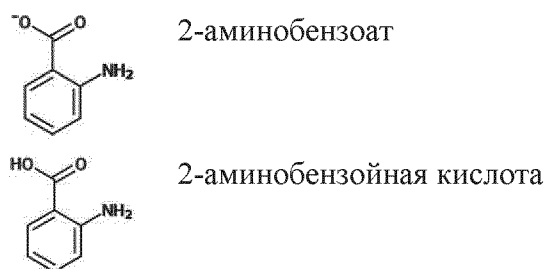
59 В частности, введение нарушающей экспрессию мутации в префенатсинтазу (например, *pheA*) или нуклеиновую кислоту, кодирующую префенатсинтазу (например, *pheA*) приводит к продуцированию чего-либо одного или более из 2-аминобензоата, дигидроксibenзоата и 4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты, представляющих 15 собой происходящие из хоризмата продукты, микроорганизмом согласно настоящему изобретению. Пути продуцирования указанных продуктов иллюстрирует Фиг. 4. Многие микроорганизмы, в том числе виды *Clostridia*, такие как *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*, естественным образом не продуцируют указанные продукты или продуцируют их исключительно в очень незначительных 20 количествах.

60 Приведены примеры источников *pheA*. Однако, следует отметить, что могут быть доступны и другие подходящие источники *pheA*. Префенатдегидратаза может быть получена или может происходить, например, из любого из следующих источников, последовательности которых являются общедоступными:

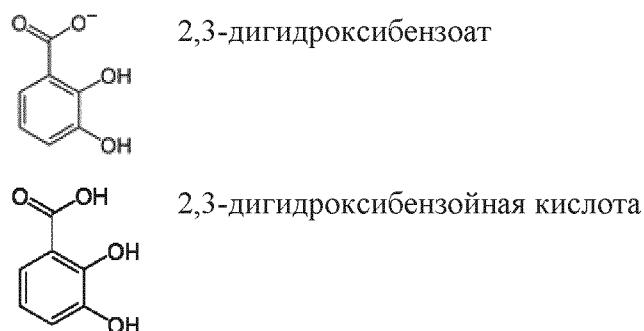
Описание	Микроорганизм	Номер доступа Genbank
Бифункциональная хоризматмутаза/ префенатдегидратаза	<i>Acetobacterium woodii</i>	AFA49374.1
Префенатдегидратаза	<i>Blautia producta</i>	WP_033143345.1
Префенатдегидратаза	<i>Clostridium aceticum</i>	WP_044823168.1
Префенатдегидратаза	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	AGY75132.1
Бифункциональная хоризматмутаза/ префенатдегидратаза	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	WP_007060905.1
Бифункциональная хоризматмутаза/ префенатдегидратаза	<i>Clostridium coskatii</i>	WP_063600678.1
Бифункциональная	<i>Clostridium drakei</i>	WP_032076381.1

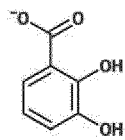
хоризматмутаза/ префенатдегидратаза		
Бифункциональная хоризматмутаза/ префенатдегидратаза	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	WP_063554005.1
префенатдегидратаза	<i>Clostridium magnum</i>	KZL89370.1
Бифункциональная хоризматмутаза/ префенатдегидратаза	<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_029159263.1
Хоризматмутаза	<i>Eubacterium limosum</i>	WP_058695931.1
Хоризматмутаза	<i>Oxobacter pfennigii</i>	WP_054874911.1
Префенатдегидратаза	<i>Sporomusa ovata</i>	EQB25731.1
Префенатдегидратаза	<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	WP_049685038.1

61 2-аминобензоат может также называться, например, 2-аминобензойной кислотой, о-аминобензойной кислотой, анраниловой кислотой, анранилатом или витамином L1. В настоящем документе любыми из указанных терминов охвачена указанная молекула как в форме кислоты, так и в форме аниона.

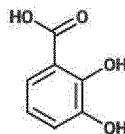


62 Дигидроксибензоат может называться, например, 2,3-дигидроксибензоатом, 2,3-дигидроксибензойной кислотой, 3,4-дигидроксибензоатом, 3,4-дигидроксибензойной кислотой или протокатеховой кислотой. В настоящем документе любыми из указанных терминов охвачена указанная молекула как в форме кислоты, так и в форме аниона.



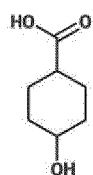


3,4-дигидроксibenзоат

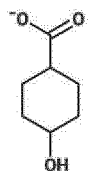


3,4-дигидроксibenзойная кислота, протокатеховая кислота

63 4-гидроксициклогексанкарбоновая кислота может также называться, например, цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислотой или 4-гидроксициклогексан-1-карбоксилатом. В настоящем документе любыми из указанных терминов охвачена 5 указанная молекула как в форме кислоты, так и в форме аниона.



4-гидроксициклогексанкарбоновая кислота



4-гидроксициклогексанкарбоксилат

64 Согласно другому варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу. ДАГФ-синтаза катализирует первый обязательный этап шикиматного пути (Фиг. 1), в ходе которого 10 эритрозо-4-фосфат и фосфоенолпируват преобразуются в 3-дезоксид-арабиногептозонат-7-фосфат. Авторы настоящего изобретения полагают, что на указанном этапе пути происходит ингибирование по типу обратной связи ароматическими аминокислотами (триптофаном, фенилаланином, тирозином) согласно описанному для *E. coli* (Hu et al. J. Basic Microbiol. 2003, 43:399-406). Соответственно, авторы настоящего изобретения, на 15 основании указанной информации, известной из уровня техники, разработали нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу, которая, предположительно, снижает риск снижения притока происходящих из хоризмата продуктов за счет указанного ингибирования по типу обратной связи. Нуклеиновые кислоты, кодирующие подходящие ДАГФ-синтазы, известны специалистам в данной 20 области техники. При этом, например, кодирующая ДАГФ-синтазу нуклеиновая кислота может происходить из *Escherichia coli*, *Clostridium beijerinckii* или *Saccharomyces cerevisiae*. Согласно одному варианту реализации указанная ДАГФ-синтаза может

представлять собой нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу *Escherichia coli*, имеющую последовательность нуклеиновых кислот, представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8. Указанная нечувствительная к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтаза может
5 быть введена в тот же вектор, что и ген, кодирующий один из вышеуказанных ферментов, или в другой вектор. Указанная нечувствительная к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтаза может иметь собственный промотор или может располагаться за промотором одного из вышеуказанных ферментов в бицистронном порядке, при этом один промотор управляет транскрипцией одной мРНК, которая кодирует и указанный
10 фермент, и указанную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

65 Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению включает экзогенный фермент хоризмат-пируват-лиазу (ЕС 4.1.3.40) и экзогенную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.
15 Согласно конкретным вариантам реализации указанный микроорганизм содержит экзогенный фермент UbiC и экзогенную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу. Согласно конкретному варианту реализации настоящее изобретение включает экзогенный ген ubiC, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 1, и экзогенную нечувствительную к регуляции по типу
20 обратной связи ДАГФ-синтазу, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7. Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм, содержащий и экзогенный фермент хоризмат-пируват-лиазу, и экзогенную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу, демонстрирует более высокие уровни продукции пара-гидроксibenзойной кислоты по сравнению с микроорганизмом, не содержащим нечувствительной к регуляции по типу
25 обратной связи ДАГФ-синтазы.

66 Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую и экзогенную хоризмат-пируват-лиазу, и нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

67 Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению включает (i) экзогенную изохоризматмутазу, (ЕС 5.4.4.2), (ii) фермент изохоризмат-пируват-лиазу (ЕС 4.2.99.21) и (iii) экзогенную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу. Согласно конкретным вариантам реализации указанный микроорганизм содержит экзогенный фермент PchA, экзогенный
30

фермент PchB и экзогенную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу. Согласно одному варианту реализации указанный микроорганизм, содержащий экзогенную нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу, демонстрирует более высокие уровни продукции салициловой кислоты по сравнению с микроорганизмом, не содержащим нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

68 Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую и экзогенную хоризмат-пируват-лиазу, и нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

69 Согласно другому варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению не содержит нечувствительной к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазы, а вместо этого содержит эндогенную ДАГФ-синтазу. В случае предполагаемого достаточно низкого уровня продуцирования или естественной концентрации ароматических аминокислот, не способного индуцировать ингибирование по типу обратной связи, нет необходимости вводить нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

70 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может продуцировать происходящие из хоризмата продукты в любой концентрации или в любом количестве. Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению продуцирует происходящие из хоризмата продукты в концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 5 мг/л, 10 мг/л, 15 мг/л, 20 мг/л, 30 мг/л, 50 мг/л, 75 мг/л, 100 мг/л, 200 мг/л, 500 мг/л, 750 мг/л, 1 г/л, 1,5 г/л или 2 г/л. Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению продуцирует по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/л, 50 мг/л, 100 мг/л, 500 мг/л, 800 мг/л или 1 г/л.

71 Кроме того, микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть сконструирован таким образом, чтобы продуцировать продукты с определенной селективностью или с минимальной селективностью. Согласно одному варианту реализации происходящий из хоризмата целевой продукт составляет по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации указанный происходящий из хоризмата целевой продукт составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению, таким образом, что микроорганизм согласно

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

72 Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения продукта ферментации, в частности, происходящего из хоризмата продукта, включающий ферментирование микроорганизма согласно настоящему изобретению в присутствии газообразного субстрата.

73 Согласно настоящему изобретению также предложены происходящие из хоризмата продукты, получаемые путем ферментирования микроорганизма согласно настоящему изобретению в присутствии газообразного субстрата.

Определения и уровень техники

74 Термин «генетическая модификация», или «генетическое конструирование» в широком смысле относится к манипуляциям с геномом или нуклеиновыми кислотами микроорганизма. Способы генетической модификации включают, например, гетерологичную генную экспрессию, вставки или делеции генов или промоторов, мутацию нуклеиновой кислоты, измененную генную экспрессию или инактивацию, конструирование ферментов, направленную эволюцию, интеллектуальный дизайн, методы случайного мутагенеза, перестановку генов и кодон-оптимизацию.

75 «Рекомбинантный» показывает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм представляет собой продукт генетической модификации, конструирования или рекомбинации. Обычно термин «рекомбинантный» относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, содержащей(ему) генетический материал или закодированной(ому) генетическим материалом, происходящим из нескольких источников, например, двух или более разных штаммов или видов микроорганизмов. В настоящем документе термин «рекомбинантный» может также применяться для описания микроорганизма, который содержит мутированную нуклеиновую кислоту или мутированный белок, в том числе мутированную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или эндогенного белка.

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

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

78 «Активность фермента» относится в широком смысле к ферментативной активности, в том числе, однако не ограничиваясь указанным, к активности фермента, количеству фермента или доступности фермента для катализа реакции. Соответственно, «увеличение» активности фермента включает увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или увеличение доступности фермента для катализа реакции.

79 «Мутированный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, который был модифицирован в микроорганизме согласно настоящему изобретению относительно микроорганизма дикого типа или исходного микроорганизма, из которого происходит микроорганизм согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации указанная мутация может представлять собой делецию, вставку или замену в гене, кодирующем фермент. Согласно другому варианту реализации указанная мутация может представлять собой делецию, вставку или замену одной или более аминокислот в ферменте.

80 В частности, «нарушающая экспрессию (дизруптивная) мутация» представляет собой мутацию, которая уменьшает или полностью прекращает (т.е. «разрушает») экспрессию или активность гена или фермента. Нарушающая экспрессию мутация может частично инактивировать, полностью инактивировать или полностью удалять ген или фермент. Нарушающая экспрессию мутация может представлять собой нокаутную (КО) мутацию. Нарушающая экспрессию мутация может представлять собой любую мутацию, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, продуцируемого ферментом. Нарушающая экспрессию мутация может включать, например, мутацию в гене, кодирующем фермент, мутацию в генетическом регуляторном элементе, вовлеченном в экспрессию гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, который уменьшает или ингибирует активность фермента, или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК, коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)), или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Нарушающая экспрессию мутация может быть введена с применением любого способа, известного в данной области техники.

81 «Кодон-оптимизация» относится к мутации нуклеиновой кислоты, такой как ген, для оптимизации или улучшения трансляции указанной нуклеиновой кислоты у конкретного штамма или вида. Кодон-оптимизация может приводить к повышению скоростей трансляции или повышению точности трансляции. Согласно предпочтительному варианту реализации гены согласно настоящему изобретению кодон-оптимизированы для экспрессии у *Clostridium*, в частности, у *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации гены согласно настоящему изобретению кодон-оптимизированы для экспрессии у *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, депонированной в DSMZ под номером доступа DSM23693.

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

83 Термин «варианты» включает нуклеиновые кислоты и белки, последовательность которых отличается от последовательности референсных нуклеиновой кислоты и белка,

например, последовательности референсных нуклеиновой кислоты и белка, раскрытых в уровне техники или представленных в примерах, приведенных в настоящем документе. Практическая реализация настоящего изобретения может осуществляться с применением вариантов нуклеиновых кислот или белков, выполняющих по существу ту же функцию, что и референсная нуклеиновая кислота или референсный белок. Например, вариант белка может выполнять по существу ту же функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и референсный белок. Вариант гена может кодировать тот же или по существу тот же белок, что и референсный ген. Вариант промотора может обладать по существу такой же способностью содействовать экспрессии одного или более генов, что и референсный промотор.

84 Такие нуклеиновые кислоты или белки могут называться в настоящем документе «функционально эквивалентными вариантами». Например, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и т.п. Гомологичные гены других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. Указанные гены включают гомологичные гены таких видов, как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробные описания которых размещены в открытом доступе на таких веб-сайтах, как Genbank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты также включают нуклеиновые кислоты, последовательность которых варьирует в результате кодон-оптимизации для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно отличается идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты относительно референсной нуклеиновой кислоты, составляющей по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более (процент гомологии). Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно отличается идентичностью аминокислот относительно референсного белка, составляющей по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более (процент гомологии). Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с применением любого способа, известного в данной области техники.

85 Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм согласно настоящему изобретению с применением любого способа, известного в данной области

техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде депротенинизированных нуклеиновых кислот или введены в состав с одним или более агентов, таких как липосомы. Нуклеиновые кислоты могут быть представлены ДНК, РНК, кДНК или их комбинациями, в зависимости от обстоятельств. Согласно определенным вариантам реализации могут применяться ингибиторы рестрикции. Дополнительные векторы могут включать плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. Согласно предпочтительному варианту реализации нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм согласно настоящему изобретению с применением плазмиды. Например, трансформация (в том числе трансдукция или трансфекция) может быть осуществлена путем электропорации, обработки ультразвуком, полиэтиленгликоль-опосредованной трансформации, использования химической или естественной компетентности, трансформации протопласта, индукции профага или конъюгации. Согласно определенным вариантам реализации, включающим системы активных рестрикционных ферментов, может требоваться метилирование нуклеиновой кислоты перед введением указанной нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

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

87 «Микроорганизм» представляет собой микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или гриб. Микроорганизм согласно настоящему изобретению, как правило, представляет собой бактерию. Следует понимать, что в настоящем документе термин «микроорганизм» включает термин «бактерия».

88 «Исходный микроорганизм» представляет собой микроорганизм, применяемый для получения микроорганизма согласно настоящему изобретению. Исходный микроорганизм может представлять собой встречающийся в природе микроорганизм (т.е. микроорганизм дикого типа) или микроорганизм, который был ранее модифицирован (т.е. мутантный или рекомбинантный микроорганизм). Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть модифицирован таким образом, чтобы экспрессировать или избыточно экспрессировать один или более ферментов, которые не экспрессирует или

избыточно не экспрессирует исходный микроорганизм. Аналогичным образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть модифицирован таким образом, чтобы содержать один или более генов, не содержащихся в исходном микроорганизме. Согласно одному варианту реализации указанный исходный микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный исходный микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, депонированную в DSMZ под номером доступа DSM23693.

89 Термин «происходящий из» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм на основе другой нуклеиновой кислоты, другого белка или микроорганизма (например, исходной нуклеиновой кислоты, исходного белка или микроорганизма; или нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма дикого типа) был модифицирован или адаптирован с получением новой нуклеиновой кислоты, нового белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации, как правило, включают вставки, делеции, мутации или замены в нуклеиновых кислотах или генах. В общем случае микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из исходного микроорганизма. Согласно одному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, депонированной в DSMZ под номером доступа DSM23693.

90 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть дополнительно классифицирован на основании функциональных характеристик. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может представлять собой C1-фиксирующий микроорганизм, анаэроб, ацетоген, этанологен, карбоксидотроф и/или метаноген, или может происходить из C1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена, карбоксидотрофа и/или метаногена. В Таблице 1 приведен репрезентативный перечень микроорганизмов и идентифицированы их функциональные характеристики.

Таблица 1

C1-фиксирующие	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Аутотроф	Карбоксидотроф	Метанотроф
----------------	---------	----------	------------	----------	----------------	------------

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

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

² Не был исследован вопрос, способен ли *Clostridium magnum* расти на CO.

³ Один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, как было описано, продуцирует этанол из газа.

⁴ Не был исследован вопрос, способен ли *Sporomusa ovata* расти на CO.

⁵ Не был исследован вопрос, способен ли *Sporomusa silvacetica* расти на CO.

⁶ Не был исследован вопрос, способен ли *Sporomusa sphaeroides* расти на CO.

91 «C1» относится к содержащей один атом углерода молекуле, например, CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. «Продукт окисления C1» относится к содержащей один атом углерода молекуле, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. «Источник C1-углерода» относится к содержащей один атом углерода молекуле, которая служит в качестве одного из источников или единственного источника углерода для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать что-либо одно или более из CO, CO₂, CH₄, CH₃OH или CH₂O₂. Предпочтительно, источник C1-углерода содержит что-либо одно из CO и CO₂, либо и то, и другое. «C1-фиксирующий микроорганизм» представляет собой микроорганизм, способный продуцировать один или более продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. Согласно предпочтительному варианту реализации

микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из C1-фиксирующего микроорганизма, идентифицированного в Таблице 1.

92 «Анаэроб» представляет собой микроорганизм, которому не требуется кислород для роста. В присутствии кислорода может наблюдаться негативная реакция или даже гибель анаэроба. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой анаэроба. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из анаэроба, идентифицированного в Таблице 1.

93 «Ацетоген» представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать ацетат (или уксусную кислоту) в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогены являются облигатно анаэробными бактериями, использующими путь Вуда-Льюнгаля в качестве главного механизма сохранения энергии, а также для синтеза ацетил-КоА и происходящих из ацетил-КоА продуктов, таких как ацетат (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь ацетил-КоА в качестве (1) механизма восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO₂, (2) конечного электронноакцепторного процесса сохранения энергии, (3) механизма фиксации (ассимиляции) CO₂ при синтезе клеточного углерода (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все встречающиеся в природе ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, аутотрофными и неметанотрофными. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой ацетоген. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из ацетогена, идентифицированного в Таблице 1.

94 «Этанологен» представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой этанологен. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из этанологена, идентифицированного в Таблице 1.

95 «Аутотроф» представляет собой микроорганизм, способный к росту в отсутствие органического углерода. Вместо этого аутотрофы используют неорганические источники углерода, такие как СО и/или СО₂. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой аутотрофа. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из аутотрофа, идентифицированного в Таблице 1.

- 96 «Карбоксидотроф» представляет собой микроорганизм, способный утилизировать СО в качестве единственного источника углерода. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой карбоксидотрофа. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из карбоксидотрофа, идентифицированного в Таблице 1.
- 97 «Метанотроф» представляет собой микроорганизм, способный утилизировать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Согласно некоторым вариантам реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из метанотрофа.
- 98 В более широком смысле микроорганизм согласно настоящему изобретению может происходить из любого рода или вида из идентифицированных в Таблице 1. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой бактерию *Clostridium*.
- 99 Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению происходит из кластера *Clostridia*, включающего виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Указанные виды впервые были описаны и охарактеризованы Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994 (*Clostridium autoethanogenum*), Tanner, *Int J System Bacteriol*, 43: 232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*); и Huhnke, WO 2008/028055 (*Clostridium ragsdalei*).
- 100 Указанные три вида во многом сходны. В частности, все указанные виды являются С1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода *Clostridium*. Указанные виды обладают аналогичными генотипами и фенотипами, способами сохранения энергии и ферментативным метаболизмом. Кроме того, указанные виды кластеризованы в группу гомологии I клостридиальных рРНК с более чем 99% идентичностью 16S рРНК/ДНК, отличаются содержанием G + C в ДНК, составляющим приблизительно 22–30 мол.%, являются грамположительными, обладают аналогичной морфологией и размерами (размер клеток на стадии логарифмического роста составляет 0,5–0,7 × 3–5 мкм), мезофильными (оптимальный диапазон температур для роста – 30–37 °С), отличаются аналогичными диапазонами показателей рН: приблизительно от 4 до 7,5 (при оптимальных показателях рН, составляющих приблизительно 5,5–6), лишены цитохромов и сохраняют энергию с помощью Rnf-комплекса. Также для указанных видов было продемонстрировано восстановление карбоновых кислот до соответствующих спиртов (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Что важно, все указанные виды также

демонстрируют выраженный аутотрофный рост на СО-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве главного продукта ферментации, и продуцируют незначительные количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты в определенных условиях.

5 **101** Однако у указанных трех видов имеется также и ряд различий. Указанные виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* – из ЖКТ кролика, *Clostridium ljungdahlii* – из куриного помета, а *Clostridium ragsdalei* – из пресноводных отложений. У указанных видов различается утилизация различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, 10 указанные виды различаются по ауксотрофности в отношении определенных витаминов (например, тиамина, биотина). У указанных видов различаются последовательности нуклеиновых кислот и последовательности аминокислот генов и белков пути Вуда-Льюнгаля, хотя общая организация и число указанных генов и белков, как было 15 обнаружено, у всех видов одинаковы (Köpke, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011).

102 Соответственно, в целом многие из характеристик *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* не являются специфическими для 20 указанного вида, а представляют собой общие характеристики указанного кластера С1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных представителей рода *Clostridium*. Однако, поскольку указанные виды все же представляют собой различные виды, генетическая модификация или манипуляция с одним из указанных видов может не оказывать идентичного эффекта на другой вид из числа 25 указанных видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

103 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может также происходить из 25 изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Изоляты и мутанты *Clostridium autoethanogenum* включают JA1-1 (DSM10061) (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693). Изоляты и мутанты *Clostridium ljungdahlii* включают ATCC 49587 30 (Tanner, *Int J Syst Bacteriol*, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (US 5593886), C-01 (ATCC 55988) (US 6368819), O-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и

мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

5 **104** «Субстрат» относится к источнику углерода и/или энергии для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например, CO, CO₂ и/или CH₄. Предпочтительно, субстрат содержит источник C1-углерода, представленный CO или CO + CO₂. Субстрат может дополнительно содержать другие не содержащие углерода компоненты, такие как H₂, N₂ или электроны.

10 **105** Субстрат обычно содержит по меньшей мере некоторое количество CO, например, приблизительно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% CO. Субстрат может содержать CO в некотором диапазоне концентраций, например, приблизительно 20–80, 30–70 или 40–60 мол.% CO. Предпочтительно, субстрат содержит приблизительно 40–70 мол.% CO (например, газ сталелитейных производств или доменный газ), приблизительно 20–30 мол.% CO (например, газ основных сталеплавильных печей с подачей кислорода),
15 или приблизительно 15–45 мол.% CO (например, сингаз). Согласно некоторым вариантам реализации субстрат может содержать относительно незначительное количество CO, например, приблизительно 1–10 или 1–20 мол.% CO. Микроорганизм согласно настоящему изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть CO в субстрате в продукт.

20 **106** Субстрат может содержать некоторое количество H₂. Например, субстрат может содержать приблизительно 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.% H₂. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субстрат может содержать относительно большое количество H₂, например, приблизительно, 60, 70, 80 или 90 мол.% H₂. Согласно дополнительным вариантам реализации субстрат по существу не содержит H₂.

25 **107** Субстрат может содержать некоторое количество CO₂. Например, субстрат может содержать приблизительно 1–80 или 1–30 мол.% CO₂. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субстрат может содержать менее чем приблизительно 20, 15, 10 или 5 мол.% CO₂. Согласно другому варианту реализации указанный субстрат по существу не содержит CO₂.

30 **108** Хотя субстрат, как правило, является газообразным, он может также быть представлен альтернативными формами. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO-содержащим газом, с применением генератора дисперсий микропузырьков. Согласно дополнительному примеру субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

109 Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой газообразные отходы, образующиеся в качестве побочного продукта промышленного процесса или получаемые из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автотранспорта или при газификации биомассы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный промышленный процесс выбран из группы, состоящей из 5 производство продуктов черной металлургии, такие как сталелитейное производство, производство продуктов цветной металлургии, процессы нефтепереработки, газификация угля, получение электроэнергии, получение технического углерода, получение аммиака, получение метанола и производство кокса. Согласно указанным вариантам реализации 10 субстрат и/или источник C1-углерода может захватываться в ходе промышленного процесса до выброса в атмосферу с применением любого удобного способа.

110 Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой сингаз, такой как сингаз, получаемый путем газификации угля или остатков после перегонки нефти, газификации биомассы или риформинга природного газа. Состав субстрата может оказывать значимое влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, 15 присутствие кислорода (O₂) может снижать эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата желательным может быть проведение обработки, очистки или фильтрации субстрата для удаления каких-либо нежелательных загрязняющих примесей, такие как токсины, нежелательные компоненты или пылевые 20 частицы, и/или увеличения концентрации требуемых компонентов.

111 Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть культивирован для получения одного или более продуктов. Например, *Clostridium autoethanogenum* продуцирует, или может быть сконструирован таким образом, чтобы продуцировать этанол (WO 2007/117157), ацетат (WO 2007/117157), бутанол (WO 2008/115080 и WO 25 2012/053905), бутират (WO 2008/115080), 2,3-бутандиол (WO 2009/151342), лактат (WO 2011/112103), бутен (WO 2012/024522), бутадиев (WO 2012/024522), метилэтилкетон (2-бутанон) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилен (WO 2012/026833), ацетон (WO 2012/115527), изопропанол (WO 2012/115527), липиды (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионат (3-HP) (WO 2013/180581), изопрен (WO 2013/180584), жирные 30 кислоты (WO 2013/191567), 2-бутанол (WO 2013/185123), 1,2-пропандиол (WO 2014/0369152) и 1-пропанол (WO 2014/0369152). Помимо одного или более целевых продуктов микроорганизм согласно настоящему изобретению может также продуцировать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол.

112 «Селективность» относится к пропорции продуцируемого целевого продукта и всех продуцируемых микроорганизмом продуктов ферментации. Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть сконструирован таким образом, чтобы продуцировать продукты с определенной селективностью или с минимальной селективностью. Согласно одному варианту реализации целевой продукт составляет по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации целевой продукт составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению; таким образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению отличается селективностью в отношении целевого продукта, составляющей по меньшей мере 10%. Согласно другому варианту реализации целевой продукт составляет по меньшей мере 30% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом согласно настоящему изобретению; таким образом, микроорганизм согласно настоящему изобретению отличается селективностью в отношении целевого продукта, составляющей по меньшей мере 30%.

113 Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин «биореактор» включает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или более резервуаров, колонн или систем трубок, например, реактор непрерывного действия с перемешиванием (CSTR), реактор с иммобилизацией клеток (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажная колонка, газлифтный ферментер, статический смеситель, или другой сосуд или другое устройство, подходящее для контакта газа и жидкости. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор может содержать первый ростовой реактор и второй реактор для культивирования/ферментации. Субстрат может вводиться в один или оба указанных реактора. В настоящем документе термины «культура» («культивирование») и «ферментация» («ферментирование») используются взаимозаменяемо. Указанные термины охватывают и фазу роста, и фазу биосинтеза продукта процесса культивирования/ферментации.

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

115 Желательно проведение культивирования/ферментации в подходящих условиях для продуцирования целевого продукта. Учитываемые условия реакции включают давление (или парциальное давление), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, рН среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при применении реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень инокулята, максимальные концентрации газообразного субстрата, при которых концентрация газа в жидкой фазе не становится ограничивающим фактором, и максимальные концентрации продукта, позволяющие избежать ингибирования продукта. В частности, может осуществляться контроль скорости введения субстрата для обеспечения того, чтобы концентрация газа в жидкой фазе не становилась ограничивающим фактором, поскольку в условиях ограниченного количества газа продукты могут потребляться культурой.

116 Функционирование биореактора при повышенном давлении обеспечивает увеличение скорости перехода газовой массы из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, обычно предпочтительно проведение культивирования/ферментации при давлении, превышающем атмосферное давление. Также, поскольку определенная скорость конверсии газа отчасти является функцией от времени удерживания субстрата, а время удерживания обуславливает требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может позволить значительно снизить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для культивирования/ферментации. В свою очередь, это означает, что время удерживания, определяемое как результат деления объема жидкости в биореакторе на скорость входящего потока газа, может быть снижено при поддержании биореакторов в условиях повышенного давления, а не атмосферного давления. Оптимальные условия реакции отчасти зависят от конкретного применяемого микроорганизма. Однако, в целом, предпочтительно проведение ферментации при давлении, превышающем атмосферное давление. Также, поскольку определенная скорость конверсии газа отчасти является функцией от времени удерживания, а достижение требуемого времени удерживания, в свою очередь, обуславливает требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может позволить значительно снизить требуемый объем биореактора, и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для ферментации.

117 Целевые продукты могут быть отделены или очищены из ферментативного бульона с применением любого способа или комбинации способов, известных в данной области техники, включая, например, фракционную дистилляцию, испарение,

первапорацию, отдувку газа, фазовое разделение и экстрактивную ферментацию, в том числе например, жидкость-жидкостную экстракцию. Согласно некоторым вариантам реализации целевые продукты выделяют из ферментативного бульона путем непрерывного удаления части бульона из биореактора, отделения клеток микроорганизмов от бульона (что удобно осуществлять путем фильтрации) и выделения из бульона одного или более целевых продуктов. Спирты и/или ацетон могут быть выделены, например, путем дистилляции. Кислоты могут быть выделены, например, путем адсорбции на активированном угле. Отделенные клетки микроорганизмов, предпочтительно, возвращают в биореактор. Бесклеточный пермеат, оставшийся после извлечения целевых продуктов, также, предпочтительно, возвращают в биореактор. Для восполнения среды перед возвращением в биореактор к бесклеточному пермеату могут быть добавлены дополнительные питательные вещества (такие как витамины В).

ПРИМЕРЫ

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

Пример 1

119 В указанном примере описаны общие способы культивирования *C. autoethanogenum* и *C. ljungdahlii*.

120 *C. autoethanogenum* DSM10061 и DSM23693 (производный от DSM10061) и *C. ljungdahlii* DSM13528 получали из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Инхоффенштрассе, 7 В, 38124, Брауншвейг, Германия).

121 Штаммы выращивали при 37 °С на среде PETC при pH 5,6 с применением стандартных анаэробных техник (Hungate, *Methods Microbiol*, 3В: 117-132, 1969; Wolfe, *Adv Microbiol Physiol*, 6: 107-146, 1971). Фруктозу (гетеротрофный рост) или СО₂-содержащий газ со сталелитейного производства под давлением 30 фунт/кв. дюйм (собранный на объекте New Zealand Steel, Гленбрук, Новая Зеландия; состав: 44% СО, 32% N₂, 22% СО₂, 2% Н₂) в объеме свободного пространства реактора (аутоτροφный рост) применяли в качестве субстрата. Для получения твердой среды добавляли 1,2 % бактоагара (BD, Franklin Lakes, NJ 07417, США).

Компонент среды PETC	Количество на 1,0 л среды PETC
NH ₄ Cl	1 г

KCl	0,1 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 г
NaCl	0,8 г
KH ₂ PO ₄	0,1 г
CaCl ₂	0,02 г
Раствор следовых металлов (см. ниже)	10 мл
Витаминный раствор Вулфа (см. ниже)	10 мл
Дрожжевой экстракт (необязательно)	1 г
Резазурин (основной раствор 2 г/л)	0,5 мл
NaHCO ₃	2 г
Раствор восстанавливающих агентов (см. ниже)	0,006–0,008 % (по объему)
Фруктоза (для гетеротрофного роста)	5 г

Компонент раствора следовых металлов	Количество на 1,0 л раствора следовых металлов
Нитрилотриуксусная кислота	2 г
MnSO ₄ · H ₂ O	1 г
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ · 6H ₂ O	0,8 г
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,2 г
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 мг
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,02 г
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,02 г
Na ₂ SeO ₃	0,02 г
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 г
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0,02 г

Компонент витаминного раствора Вулфа	Количество на 1,0 л витаминного раствора Вулфа
Биотин	2 мг
Фолиевая кислота	2 мг
Пиридоксин гидрохлорид	10 мг
Тиамин HCl	5 мг
Рибофлавин	5 мг
Никотиновая кислота	5 мг
Кальция D-(+)-пантотенат	5 мг
Витамин B12	0,1 мг
P-аминобензойная кислота	5 мг
Тиоктовая кислота	5 мг

Компонент раствора восстанавливающих агентов	Количество на 100 мл раствора восстанавливающих агентов
NaOH	0,9 г
Цистеин-HCl	4 г
Na ₂ S	4 г

Пример 2

122 В указанном примере продемонстрировано конструирование штамма, содержащего плазмиду для экспрессии п-гидроксibenзоата.

123 Последовательность нуклеотидов хоризмат-пируват-лиазы (*ubiC*) (SEQ ID NO: 1) оптимизировали (SEQ ID NO: 2) в соответствии с таблицей частот использования кодонов у *C. autoethanogenum* от GeneArt, и клонировали в экспрессионный вектор pMTL8315 (Фиг. 7) под контролем промотора пути Вуда-Льюнгаля (US 20110256600). Также включали кодирующую последовательность нечувствительной к регуляции по типу обратной связи мутантной 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфатсинтазы (ДАГФ-синтазы) (*agoG**) (SEQ ID NO: 8), за которой следовала *ubiC* в бицистронном формате (Фиг. 7). Плазмидой pARO_01 (SEQ ID NO: 9) трансформировали *C. autoethanogenum* LZ1561 (DSM23693) посредством конъюгации со штаммом *E. coli* CA434 в качестве донорного. Донорные штаммы выращивали в течение ночи на среде LB с добавлением 25 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл спектиномицина. Клетки из 1,5 мл культуры собирали путем центрифугирования и промывали в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ). Внутри анаэробной установки осадок донорных клеток ресуспендировали в 200 мкл с экспоненциально растущим реципиентом LZ1561. Смесь для конъюгации наносили на агаровую среду PETC-MES и инкубировали при 37 °C. Через 24 часа клетки соскребали с чашки для конъюгации и распределяли по агаровой среде PETC-MES с добавлением 7,5 мкг тиамфеникола/мл (Sigma) и 10 мкг триметоприма/мл (Sigma). Три несущие плазмиду колонии изолятов (т.е. биологические трипликаты) выращивали на жидкой среде PETC-MES, содержащей 7,5 мкг тиамфеникола/мл и газовую смесь, имитирующую отходящий газ сталелитейного производства, в качестве источника углерода (50 % CO, 10 % H₂, 30 % CO₂, 10 % N₂, далее в настоящей заявке называемую «отходящим газом»).

124 Жидкие культуры выращивали в 10 мл среды PETC-MES во флаконах для сыворотки, содержащих тиамфеникол и отходящий газ, при давлении при давлении 22 фунта/кв. дюйм. Образцы отбирали ежедневно для измерения биомассы (Фиг. 8) и рНВА (Фиг. 9а и Фиг. 9b).

125 Для измерения рНВА в образцы (100 мкл) добавляли 10 мкл 0,1N NaOH, замораживали и затем высушивали сублимацией. Затем образцы дериватизировали 100 мкл BSTFA + TCMS (99:1) и 100 мкл пиридина. Затем образцы инкубировали при 60 °C в течение 30 минут с образованием триметилсилильных производных функциональной группы карбоновой кислоты. Подробные характеристики метода ГХ-МС: вводимый объем – 1 мкл; температура блока введения – 250 °C; коэффициент деления потока – 10:1.

Начальная T – 50 °C (время выдерживания 5 мин); конечная T – 220 °C (20°C/мин); постоянный поток – 1 мл/мин (газ-носитель He); колонка Zebtron ZB-5MS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Ионная ловушка Varian 4000, работающая в режиме полного сканирования 40–400 м/з. Настройка: ПФТБА

5 **126** На Фиг. 9а, LZ1561 (контрольный штамм) представлены три технических репликата (т.е. полученных путем троекратного выращивания и взятия образцов). Также получали два биологических репликата LZ1561 с pARO_01, с тремя техническими репликатами для каждого. «Технический репликат» относится к выращиванию и взятию образцов каждого штамма в отдельных экспериментах, тогда как «биологический репликат» относится к воспроизведению штамма с самого начала. Таким образом, биологические репликаты отражают фоновые биологические вариации микроорганизма, тогда как технические репликаты отражают вариации, обусловленные техническими аспектами, включающими культивирование, взятие образцов и способы анализа. На Фиг. 9а видно, что рНВА продуцировалась неоднократно в отдельно взятых случаях. На Фиг. 8 и Фиг. 9b приведена общая информация о росте и продуктивности в отношении рНВА.

Пример 3

127 В указанном примере продемонстрировано получение п-гидроксибензоата посредством ферментации газа.

20 **128** *S. autoethanogenum*, несущий плазмиду pARO_01 (SEQ ID NO: 9), выращивали на отходящем газе согласно описанию в примере 1. В ходе ГХ-МС-анализа культуры, осуществляемом согласно примеру 1, было определено, что бактерия, экспрессирующая хоризмат-пируват-лиазу, продуцировала рНВА. Линейный диапазон анализа на рНВА с применением указанного способа составлял 0–12,5 мг/мл (Фиг. 5).

25 **129** Данные для рНВА валидировали путем сравнения со временем удерживания и характеристическими фрагментными ионами аутентичного стандарта рНВА и предсказанными характеристическими ионами из базы данных масс-спектральных данных NIST (Фиг. 6).

130 Продуцирование рНВА наблюдалось во всех культурах, экспрессирующих хоризмат-пируват-лиазу, кодируемую экспрессионным вектором pMTL8315. Наблюдаемый в каждой отдельно взятой культуре пиковый титр рНВА составлял 17 мг рНВА/л через восемь дней (Фиг. 9b). В контрольном образце без экспрессионного вектора присутствия рНВА не наблюдалось.

131 Генетически сконструированная бактерия продуцировала детектируемые уровни рНВА, обнаруживаемые в культуре.

Пример 4

132 В указанном примере продемонстрирован экспериментальный протокол для увеличения продуцирования рНВА путем конструирования ферментов.

133 UbiC подвергается ингибированию продуктом за счет удержания рНВА. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ubiC, может быть модифицирована таким образом, чтобы происходила мутация аминокислот, вовлеченных в удержание продукта ферментом, и высвобождение продукта усиливалось. Для достижения указанной цели аминокислоты, вовлеченные в связывание рНВА, идентифицируют путем анализа существующих структур со связанным продуктом. Затем ингибирование продукта минимизируют путем мутирования аминокислот, вовлеченных в связывание и удержание рНВА. Для идентификации ферментов с максимальной каталитической эффективностью для выхода рНВА может быть получена направленная библиотека мутантов ubiC, где изменяются различные комбинации рНВА-связывающих аминокислот, и указанные мутантные ферменты могут быть проанализированы с применением ферментного анализа. Затем усовершенствованные мутанты экспрессируют у *C. autoethanogenum* LZ1561 для валидации штаммов с наиболее усовершенствованной продуктивностью рНВА.

Пример 5

134 В указанном примере продемонстрировано конструирование штамма, содержащего плазмиду для экспрессии салицилата.

135 Последовательности нуклеотидов *pchA* (SEQ ID NO: 4) и *pchB* (SEQ ID NO: 6) кодировали и клонировали в экспрессионный вектор под контролем тетрациклин-индуцируемого промотора. Плазмидой трансформировали *C. autoethanogenum* LZ1561 (DSM23693) посредством конъюгации со штаммом *E. coli* SA434 в качестве донора. Донорные штаммы выращивали в течение ночи на среде LB с добавлением 25 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл спектиномицина. Клетки из 1,5 мл культуры собирали путем центрифугирования и промывали в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ). Внутри анаэробной установки осадок донорных клеток ресуспендировали в 200 мкл с экспоненциально растущим реципиентом *C. autoethanogenum*. Смесь для конъюгации наносили на агаровую среду PETS-MES и инкубировали при 37 °C. Через 24 часа клетки соскребали с чашки для конъюгации и

распределяли по агаровой среде PETC-MES с добавлением 7,5 мкг тиамфеникола/мл (Sigma) и 10 мкг триметоприма/мл (Sigma). Три несущие плазмиду колонии изолятов (т.е. биологические трипликаты) выращивали на жидкой среде PETC-MES, содержащей 7,5 мкг тиамфеникола/мл, с отходящим газом в качестве источника углерода.

5 **136** Жидкие культуры выращивали в 10 мл среды PETC-MES во флаконах для сыворотки, содержащих тиамфеникол и отходящий газ, при давлении 22 фунта/кв. дюйм.

137 Мониторинг биомассы осуществляли спектрофотометрически. При OD600 нм = 0,3 экспрессию пути биосинтеза салицилата индуцировали путем добавления 40 нг ангидротетрациклина/мл. Культуры в двух повторностях (технические репликаты трех
10 биологических трипликатов) выращивали без добавления ангидротетрациклина, чтобы не индуцировать путь биосинтеза салицилата. Образцы отбирали ежедневно.

138 Концентрации салицилата измеряли посредством анализа с применением газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ-МС), используя систему ГХ-МС Thermo Scientific ISQ LT, оснащенную колонкой Agilent CP-SIL 5CB-MS (50 м × 0,25 мкм × 0,25
15 мкм) и автоматическим пробозаборником. Образцы получали путем разведения 300 мкл образца в 600 мкл ацетонитрила и 50 мкл 0,1N NaOH. Образцы перемешивали на вортексе, после чего центрифугировали в течение 3 минут при 14 000 об/мин; 800 мкл супернатанта переносили в стеклянный флакон, и высушивали образец в Thermo SpeedVac®. Затем высушенные образцы суспендировали в 100 мкл раствора пиридина,
20 содержащего 22 мг/мл метоксиамины HCl, после чего нагревали в герметизированном стеклянном флаконе в течение 60 минут при 60°C. После этого добавляли 300 мкл N,O-бис-трифторацетамида (BSTFA), затем нагревали в герметизированном стеклянном флаконе в течение 60 минут при 60°C. Образцы переносили в автоматический пробозаборник для анализа, с объемом вводимой пробы 1,5 мкл, коэффициентом деления
25 потока 20:1 и температурой на входе 250°C. Хроматографию проводили с использованием следующей программы термостата: от 80 °C (без выдерживания) с подъемом со скоростью 3 °C/мин до 140°C, с подъемом со скоростью 20 °C/мин до 230°C, и с заключительным выдерживанием продолжительностью 4 мин. Скорость потока через колонку составляла 38 см²/мин, в качестве газа-носителя использовали гелий. Температуру источника ионов
30 МС поддерживали на уровне 280 °C. Количественное определение проводили с применением иона с 267 м/з для количественного анализа, и ионов с 135 и 45 м/з для качественного анализа.

139 На Фиг. 11a приведено сравнение роста биомассы в индуцированных и неиндуцированных образцах. На Фиг. 11b видно, что продуцирование салицилата происходило неоднократно.

Пример 6

5 **140** В указанном примере продемонстрирован нокаут *pheA* для усиления продуцирования происходящих из хоризмата продуктов.

141 Ген *pheA* (например, из *S. autoethanogenum*, CAETHG_0905 (CP006763.1:973789..974925)) представляет собой ген, который кодирует фермент префенатсинтазу. Префенатсинтаза катализирует конверсию хоризмата в префенат, который представляет собой предшественник ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина. Нокаут функции *pheA* осуществляли путем разрушения указанного гена с применением метода Clostron (Heap et al., J Microbiol Methods. 2010, 80(1):49-55). Clostron-плазмиду pMTL007C-E2 получали в DNA2.0 и трансформировали *S. autoethanogenum* LZ1561 (DSM23693) посредством конъюгации со штаммом *E. coli* CA434
10 в качестве донорного. Донорные штаммы выращивали в течение ночи на среде LB с добавлением 25 мкг/мл хлорамфеникола. Клетки из 1,5 мл культуры собирали путем центрифугирования и промывали в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ). Внутри анаэробной установки осадок донорных клеток ресуспендировали в 200 мкл с экспоненциально растущим реципиентом *S. autoethanogenum* LZ1561. Смесь для конъюгации наносили на агаровую среду PETS и инкубировали при 37 °C. Через 24 часа клетки соскребали, ресуспендировали в 500 мкл ФСБ и распределяли по агаровой среде PETS с добавлением 7,5 мкг/мл тиамфеникола (Sigma) и 10 мкг/мл триметоприма (Sigma). Несущие плазмиду изоляты выращивали на жидкой среде PETS-MES, содержащей 7,5 мкг тиамфеникола/мл, с отходящим газом в качестве источника углерода.
15

25 **142** Колонии наносили методом штриха на твердую среду PET, содержащую антибиотик кларитромицин (5 мкг/мл). Указанный этап обеспечивал отбор по интеграции перенаправляющей интрон последовательности в геном. Интеграция последовательности интрона в целевой сайт приводит к встраиванию в геном 1800 п.о., скрининг которого проводили с применением ПЦР колонии. Продукт ПЦР положительных по Clostron мутантов очищали и секвенировали для подтверждения сайта встраивания.
30

143 Жидкие культуры выращивали в 10 мл среды PETS-MES во флаконах для сыворотки, содержащих кларитромицин и отходящий газ при давлении 22 фунта/кв. дюйм. Из указанного флакона для сыворотки готовили базовую культуру в глицерине.

- 144 Эксперименты в биореакторе проводили в системе с водяной рубашкой BioFlo 115 объемом 2 л (New Brunswick Scientific Corp., Эдисон, Нью-Джерси) с рабочим объемом 1,5 л. Система CSTR была оснащена двумя 6-лопастными мешалками Раштона; распределители усиливают перемешивание ферментативного бульона и массопередачу между газом и жидкостью. Электроды для измерения pH и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП-электрод) (Broadley-James Corporation) проводили через верхнюю крышку, и их показатели регистрировали с 5-минутными интервалами. Значение pH поддерживали на уровне 5,0 путем автоматизированного добавления 5 М раствора гидроксида аммония.
- 145 Из базовой культуры в глицерине получали инокулят. 1 мл базовой культуры в глицерине переносили в 50 мл среды PETC с отходящим газом при давлении 22 фунта/кв. дюйм в качестве источника углерода. Культуру инкубировали при 37 °C на шейкере в течение 2–3 дней до появления наблюдаемого видимого роста. Затем указанную культуру использовали для инокуляции 200 мл свежей среды в бутылке Schott объемом 1 л и добавляли отходящий газ до достижения давления 22 фунта/кв. дюйм. Бутылку Schott инкубировали дополнительно в течение 24–36 часов до переноса в ферментеры.
- 146 Устанавливали следующие настройки: скорость перемешивания – 200 об/мин, скорость потока газа – 35 мл/мин/л. Через 1 день скорость перемешивания начинали увеличивать на 25 об/мин с 4-часовыми интервалами до максимального значения, составляющего 900 об/мин. Скорость потока газа увеличивали на 25 мл/мин/л с 4-часовыми интервалами до максимального значения скорости потока, при котором может обеспечиваться целевое поглощение CO. На протяжении всего курса ферментации добавляли Na₂S с начальной скоростью нагнетания, составляющей 0,3 мл/ч, и позже, после падения концентрации H₂S в объеме свободного пространства реактора ниже 200~м.д., увеличиваемой с шагом 0,2 мл/ч. Потребление CO и H₂ и продуцирование CO₂, наряду с концентрацией H₂S, измеряли каждый час с применением газовой хроматографии (ГХ). Жидкие образцы отбирали из ферментера с регулярными интервалами на протяжении курса ферментации для определения клеточной массы и концентраций метаболитов с применением ВЭЖХ.
- 147 После старта в режиме периодического культивирования ферментер переводили в непрерывный режим после достижения показателя OD, составляющего 2. Скоростью добавления среды и питательных веществ управляли при помощи одного или более прецизионных перистальтических насосов (насосы Masterflex L/S Digital Drive), при поддержании постоянного объема в ферментере с применением датчика уровня,

запускающего насос для удаления ферментативного бульона из CSTR. Скорость разведения устанавливали на уровне 0,5/день за 1 этап, а затем увеличивали до 1/день, 1,7/день с 24-часовыми интервалами.

5 **148** В качестве дополнительного оборудования для ферментации использовали половолоконную мембрану (GE Healthcare) с размером пор, составляющим 0,2 мкм и площадью поверхности, составляющей 1200 см². Мембрану использовали для увеличения концентрации клеток в ферментативном объеме. Ферментативный бульон прокачивали через мембрану с высокой скоростью и возвращали обратно в ферментер, при этом бесклеточный фильтрат нагнетали в резервуар для фильтрата с меньшей скоростью, чем
10 среде. Это позволяло увеличить время удерживания бактериальных клеток в ферментере.

149 Как видно на Фиг. 10, с применением ГХ-МС были идентифицированы три новых соединения. Указанные соединения представляли собой цис-4-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту, 3,4-дигидроксибензойную кислоту и 2-аминобензойную кислоту. Указанные соединения были детектированы только в указанной
15 культуре pheA::СТ и не были детектированы в культуре исходного штамма (LZ1561).

150 Концентрации 3,4-дигидроксибензойной кислоты, 2-аминобензойной кислоты и цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты измеряли с применением газовой хроматографии (ГХ) на ГХ-хроматографе Agilent 6890N, оснащенный колонкой Agilent CP-SIL 5CB-MS (50 м × 0,25 мкм × 0,25 мкм), автоматическим пробозаборником и
20 пламенно-ионизационным детектором (FID). Образцы получали путем разведения 400 мкл образца в 400 мкл ацетонитрила с последующим 3-минутным центрифугированием при 14 000 об/мин; супернатант переносили в стеклянный флакон, и образец высушивали в Thermo SpeedVac®. Затем высушенные образцы суспендировали в 400 мкл раствора N,O-бис-трифторацетамида (BSTFA) и пиридина (в отношении 3:1) и нагревали в герметизированном стеклянном флаконе в течение 60 минут при 60°C. Образцы
25 переносили в автоматический пробозаборник для анализа, с объемом вводимой пробы 1 мкл, коэффициентом деления потока 30: 1 и температурой на входе 250°C. Хроматографию проводили с использованием следующей программы термостата: 70 °C (без выдерживания) с подъемом со скоростью 3 °C/мин до 110°C, с подъемом со скоростью 15 °C/мин до 230°C, с последующим заключительным подъемом со скоростью
30 40°C/мин до 310°C, с заключительным выдерживанием продолжительностью 3 минуты. Скорость потока через колонку составляла 1,8 мл/мин, в качестве газа-носителя использовали гелий. Температуру FID поддерживали на уровне 320 °C, с поступлением

водорода со скоростью 40 мл/мин, воздуха со скоростью 400 мл/мин и гелия со скоростью 20 мл/мин в качестве вспомогательного газа.

151 На Фиг. 12 приведена концентрация цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты, 3,4-дигидроксибензойной кислоты и 2-аминобензойной кислоты на протяжении
5 одного курса ферментации. Как показано на Фиг. 12, концентрация соединения цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты увеличивалась приблизительно до 0,9 г/л на 6 день ферментации. Происходило накопление 2-аминобензойной кислоты до концентрации, составляющей приблизительно 0,45 г/л на 8–9 день ферментации. 3,4-дигидроксибензойная кислота продуцировалась в меньших количествах, с пиковыми
10 концентрациями, составляющими около 0,3 г/л, на 6–8 дни. На 6 день наблюдалась общее накопление цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты, 2-аминобензойной кислоты и 3,4-дигидроксибензойной кислоты, составляющее >1,3 г/л.

152 О продуцировании цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты из литературных источников известно немного. Имеется только одно сообщение о детекции
15 цис-4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты в образце мочи ребенка с применением ГХ-МС. Было выдвинуто предположение, что указанное соединение представляет собой побочный продукт метаболизма кишечных бактерий (Kronick, *Clinica Chimica Acta*, 132: 205–208, 1983). Вероятно, указанное соединение представляет собой прямой продукт хоризмата или префената, поскольку механизм реакции может быть объяснен
20 расщеплением молекулы пирувата с последующим восстановлением, дополнительно требующим 2,5 молекул H_2 , которые могут поставляться за счет НАД(Ф).

153 2-аминобензойная кислота представляет собой известный промежуточный продукт пути синтеза триптофана из хоризмата. Антранилатсинтаза катализирует аминирование с
25 последующей ароматизацией хоризмата, с получением ароматического остова молекулы триптофана. Известно, что генная экспрессия антранилатсинтазы строго регулируется и подвергается ингибированию по типу обратной связи конечным продуктом триптофаном (Dosselaere, *Crit Rev Microbiol*, 27: 75–131, 2001). 2-аминобензойная кислота секретировалась в ферментативный бульон только после прекращения роста, что указывает на то, что она представляет собой избыточный продукт, который после
30 остановки роста больше не устраняется в результате реакции.

154 Все источники, в том числе публикации, патентные заявки и патенты, упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый источник был индивидуально конкретным образом включен посредством ссылки и полностью приведен в настоящем документе.

Ссылки в настоящем описании на какую-либо информацию, известную из уровня техники, не означают и не должны быть истолкованы как признание того, что указанный уровень техники составляет часть общедоступных сведений в данной области деятельности в любой стране.

5 **155** Применение терминов в единственном числе, в том числе сопровождаемых определением «указанный(ая,ое)» и аналогичных объектов в контексте описания настоящего изобретения (в частности, в контексте приведенной ниже формулы изобретения) подразумевает как единственное, так и множественное число, если в
10 настоящем документе не указано иное или если это явным образом не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий (в том числе)», «содержащий в себе» должны трактоваться как неограничивающие термины (т.е. означающие «в том числе, но не ограничиваясь перечисленным»), если не указано иное. Упоминаемые в настоящем документе диапазоны значений предназначены только для
15 того, чтобы служить в качестве способа сокращения индивидуальных обозначений каждого отдельного значения, попадающего в указанный диапазон, если в настоящем документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в настоящее описание в той же степени, как если бы они были индивидуальным образом упомянуты в настоящем документе. Все описанные в настоящем документе способы могут быть реализованы в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное
20 или если это иным образом явно не противоречит контексту. Применение всех и каждого из примеров, или выражений для описания примеров (например, «такой как») в настоящем документе предназначено исключительно для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакие выражения в настоящем описании не должны быть истолкованы
25 как указывающие на существенное значение любого не заявленного элемента для практической реализации настоящего изобретения.

156 Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящем документе. Для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания могут стать очевидными вариации указанных
30 предпочтительных вариантов реализации. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты будут надлежащим образом использовать такие вариации, и предполагают возможность практической реализации настоящего изобретения иным образом, чем, в частности, описанный в настоящем документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, упоминаемые в

прилагаемой к настоящему документу формуле изобретения, в установленных соответствующим законодательством границах. Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных вариациях охвачена настоящим изобретением, если в настоящем документе не указано иное, или если это иным образом

5 явно не противоречит контексту.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> LanzaTech New Zealand Limited / ЛанцаТек Нью Зеланд Лимитед

<120> GENETICALLY ENGINEERED MICROORGANISMS FOR THE PRODUCTION
OF CHORISMATE-DERIVED PRODUCTS /
ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ ХОРИЗМАТА ПРОДУКТОВ /

<130> LT109W01

<150> US 62/167101

<151> 2015-05-27

<160> 11

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 165

<212> PRT/БЕЛОК

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ser His Pro Ala Leu Thr Gln Leu Arg Ala Leu Arg Tyr Phe Lys
1 5 10 15

Glu Ile Pro Ala Leu Glu Pro Gln Leu Leu Asp Trp Leu Leu Leu Glu
20 25 30

Asp Ser Met Thr Lys Arg Phe Glu Gln Gln Gly Lys Thr Val Ser Val
35 40 45

Thr Met Ile Arg Glu Gly Phe Val Glu Gln Asn Glu Ile Pro Glu Glu
50 55 60

Leu Pro Leu Leu Pro Lys Glu Ser Arg Tyr Trp Leu Arg Glu Ile Leu
65 70 75 80

Leu Cys Ala Asp Gly Glu Pro Trp Leu Ala Gly Arg Thr Val Val Pro
85 90 95

Val Ser Thr Leu Ser Gly Pro Glu Leu Ala Leu Gln Lys Leu Gly Lys
100 105 110

Thr Pro Leu Gly Arg Tyr Leu Phe Thr Ser Ser Thr Leu Thr Arg Asp
115 120 125

Phe Ile Glu Ile Gly Arg Asp Ala Gly Leu Trp Gly Arg Arg Ser Arg
130 135 140

Leu Arg Leu Ser Gly Lys Pro Leu Leu Leu Thr Glu Leu Phe Leu Pro
145 150 155 160

Ala Ser Pro Leu Tyr
165

<210> 2
<211> 273
<212> DNA/ДНК
<213> Escherichia coli

<400> 2
tttcccgcgc gctgggaaat cctagagatt ctttgagagc ccttggaaaa tatataggcg 60
cgttgcgcga aaattcgcgc gcttgcaaaa ggctctcgga gagattcccc ttagagagat 120
atagaggata ggggcccgga ggatatatag ggtttgggaa agagagatct gcgcgcgctg 180
aggggaggag agagagatcg ctctagatcg atagcggata gacctctaga gatcccgcgc 240
gatagagaaa gggcctctcg agagatcgcg caa 273

<210> 3
<211> 476
<212> PRT/БЕЛОК
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

Met Ser Arg Leu Ala Pro Leu Ser Gln Cys Leu His Ala Leu Arg Gly
1 5 10 15

Thr Phe Glu Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gln Ala Leu Asp Arg Pro Val
20 25 30

Leu Val Ala Ala Ser Phe Glu Ile Asp Pro Leu Asp Pro Leu Gln Val
35 40 45

Phe Gly Ala Trp Asp Asp Arg Gln Thr Pro Cys Leu Tyr Trp Glu Gln
50 55 60

Pro Glu Leu Ala Phe Phe Ala Trp Gly Cys Ala Leu Glu Leu Gln Gly
65 70 75 80

His Gly Glu Gln Arg Phe Ala Arg Ile Glu Glu Asn Trp Gln Leu Leu
85 90 95

Cys Ala Asp Ala Val Val Glu Gly Pro Leu Ala Pro Arg Leu Cys Gly
100 105 110

Gly Phe Arg Phe Asp Pro Arg Gly Pro Arg Glu Glu His Trp Gln Ala
115 120 125

Phe Ala Asp Ala Ser Leu Met Leu Ala Gly Ile Thr Val Leu Arg Glu
130 135 140

Gly Glu Arg Tyr Arg Val Leu Cys Gln His Leu Ala Lys Pro Gly Glu
 145 150 155 160

Asp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Tyr His Cys Ser Ala Leu Leu Arg Leu
 165 170 175

Arg Gln Pro Ala Arg Arg Arg Pro Ser Gly Pro Thr Ala Gly Ala Gln
 180 185 190

Gly Asp Ala Ser Ala Gln Glu Arg Arg Gln Trp Glu Ala Lys Val Ser
 195 200 205

Asp Ala Val Ser Ser Val Arg Gln Gly Arg Phe Gly Lys Val Val Leu
 210 215 220

Ala Arg Thr Gln Ala Arg Pro Leu Gly Asp Ile Glu Pro Trp Gln Val
 225 230 235 240

Ile Glu His Leu Arg Leu Gln His Ala Asp Ala Gln Leu Phe Ala Cys
 245 250 255

Arg Arg Gly Asn Ala Cys Phe Leu Gly Ala Ser Pro Glu Arg Leu Val
 260 265 270

Arg Ile Arg Ala Gly Glu Ala Leu Thr His Ala Leu Ala Gly Thr Ile
 275 280 285

Ala Arg Gly Gly Asp Ala Gln Glu Asp Ala Arg Leu Gly Gln Ala Leu
 290 295 300

Leu Asp Ser Ala Lys Asp Arg His Glu His Gln Leu Val Val Glu Ala
 305 310 315 320

Ile Arg Thr Ala Leu Glu Pro Phe Ser Glu Val Leu Glu Ile Pro Asp
 325 330 335

Ala Pro Gly Leu Lys Arg Leu Ala Arg Val Gln His Leu Asn Thr Pro
 340 345 350

Ile Arg Ala Arg Leu Ala Asp Ala Gly Gly Ile Leu Arg Leu Leu Gln
 355 360 365

Ala Leu His Pro Thr Pro Ala Val Gly Gly Tyr Pro Arg Ser Ala Ala
 370 375 380

Leu Asp Tyr Ile Arg Gln His Glu Gly Met Asp Arg Gly Trp Tyr Ala
 385 390 395 400

Ala Pro Leu Gly Trp Leu Asp Gly Glu Gly Asn Gly Asp Phe Leu Val
405 410 415

Ala Leu Arg Ser Ala Leu Leu Thr Pro Gly Arg Gly Tyr Leu Phe Ala
420 425 430

Gly Cys Gly Leu Val Gly Asp Ser Glu Pro Ala His Glu Tyr Arg Glu
435 440 445

Thr Cys Leu Lys Leu Ser Ala Met Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ile Gly
450 455 460

Gly Leu Asp Glu Val Pro Leu Gln Arg Gly Val Ala
465 470 475

<210> 4
<211> 1431
<212> DNA/ДНК
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 4
atgagccggc tggcgcccct gagccagtgc ctgcacgcct tgcgcgccac cttcgagcgc 60
gccatcggcc aggcgcaggc gctcgatcgt ccggtgctgg tggcggcatc gttcgagatc 120
gaccattgg acccgctgca ggtattcggg gcctgggacg accggcaaac gccctgcctg 180
tactgggaac agcccagact ggcgttcttc gcctggggct gcgccctgga gctgcaaggc 240
cacggcgaac agcgcttcgc ccgatcagag gaaaactggc aattgctctg cgccgacgcc 300
gtggtcgagg gcccgtggc gccgcgcctg tgcggcggat tccgcttcga tccgcgcgcc 360
ccgcgcgagg aacctggca agccttcgcc gatgccagcc tgatgctcgc cggcatcacc 420
gtgctgcgcg agggcgaacg ctaccgggta ctctgccaac acctggccea gcccgcgcaa 480
gatgccctgg cctggccgc ctaccactgc tcggcgctac tgcgctgag gcagccggcc 540
agacgccggc cctcggggcc gaccgctggc gcgcagggcg acgcttcggc gcaggagcgc 600
aggcaatggg aagccaaggt gagcgacgcg gtaagcagtg tccgccaggg acgcttcggc 660
aaggtcgtgc tggcccgcac ccaggcccgg cctctcggcg acatcgagcc gtggcaggtc 720
atcgaacacc tgcgtctgca acatgccgac gccagctgt tcgcctgtcg ccgcggaac 780
gctgcttcc tcggcgccct cccggaacgc ctggtccgca ttcgcgcccg cgaggcactc 840
acctatgcc tggccgggac catcggcccgc ggcggcgatg cccaggaaga tgcgcccgtc 900
ggacaggccc tgctggacag cgccaaggac aggcacgaac accagttggt ggtggaggcg 960
atccgtacgg ccttggaaac cttcagcagag gtgctggaaa tccccgatgc gcccggcctg 1020
aaacgactgg cgcgagtcca gcacctgaac acgccgatcc gcgcccgcct cgctgacgca 1080

ggcgcatcc tgcggctgct acaagcgctg catccgaccc ccgcggtggg cggctaccca 1140
 cgcagcgcgg cgctggacta catccgccag cacgaagga tggaccgcgg ctggtacgcc 1200
 gcgccgctgg gctggctcga cggcgaaggc aacggcgatt tcctggtggc gctgcgctcg 1260
 gccctgctca cgccgggccc gggctacctg ttcgccggct gcggtctggt aggcgattcg 1320
 gaaccggccc acgagtatcg cgaaacctgc cttaagctca gtgccatgcg ggaagctcta 1380
 tccgcatag gcggcctgga cgaagtgcc ttgcagcgcg gcgctgctg a 1431

<210> 5
 <211> 102
 <212> PRT/БЕЛОК
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 5

Met Met Lys Thr Pro Glu Asp Cys Thr Gly Leu Ala Asp Ile Arg Glu
 1 5 10 15

Ala Ile Asp Arg Ile Asp Leu Asp Ile Val Gln Ala Leu Gly Arg Arg
 20 25 30

Met Asp Tyr Val Lys Ala Ala Ser Arg Phe Lys Ala Ser Glu Ala Ala
 35 40 45

Ile Pro Ala Pro Glu Arg Val Ala Ala Met Leu Pro Glu Arg Ala Arg
 50 55 60

Trp Ala Glu Glu Asn Gly Leu Asp Ala Pro Phe Val Glu Gly Leu Phe
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Ile His Trp Tyr Ile Ala Glu Gln Ile Lys Tyr Trp Arg
 85 90 95

Gln Thr Arg Gly Ala Ala
 100

<210> 6
 <211> 309
 <212> DNA/ДНК
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 6

atgatgaaa ctcccgaaga ctgcaccggc ctggcggaca tccgcgaggc catcgaccgg 60
 atcgacctgg atatcgtcca ggcctcggc cgccgcatgg actacgtcaa ggcggcgtcg 120
 cgcttcaagg ccagcgaggc ggcgattccg gcgcccgagc gggtcgccgc gatgctcccc 180
 gagcgcgccc gctgggcccga ggaaaacgga ctcgacgcgc ccttcgtcga gggactgttc 240
 gcgcagatca tccactggta catcgccgag cagatcaagt actggcgcca gacacggggg 300

<210> 7

<211> 350

<212> PRT/BEJOK

<213> Escherichia coli

<400> 7

Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
 20 25 30

Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
 35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
 50 55 60

Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
 85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
 100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
 115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
 130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
 145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Asp Ala
 165 170 175

Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
 180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
 195 200 205

Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
 210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
245 250 255

Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
260 265 270

Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
275 280 285

Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
290 295 300

Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
305 310 315 320

Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
325 330 335

Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
340 345 350

<210> 8

<211> 1053

<212> DNA/ДНК

<213> Escherichia coli

<400> 8

atgaattatc aaaatgatga ttttaagaata aaagaaatta aagaattatt acctcctgta 60

gctttattag aaaaatttcc tgcaactgaa aatgcagcaa atactgtagc acatgcaaga 120

aaagcaatac ataaaatact taaaggtaat gatgatagat tattagtagt aataggacct 180

tgtagtatac atgacacctgt agcagcaaaa gaatatgcaa ctagactttt agcattaaga 240

gaagaattaa aagatgaatt agaaatagta atgagagtat attttgaaaa acctagaact 300

actgtaggat ggaaaggact tataaatgat cctcatatgg ataatagttt tcaaataaat 360

gatggactta gaatagcaag aaaattactt ttagatataa atgatagtgg attacctgca 420

gctgggtgaat ttttagatat gataactcct caatatttag cagatttaat gagttgggga 480

gcaattggag caagaactac tgaaagtcaa gtacatagag aagatgcaag tggacttagt 540

tgtcctgtag gatttaaaaa tggaactgat ggaactataa aagtagcaat agatgcaata 600

aatgcagctg gtgcacctca ttgttttctt agtgtaacaa aatggggaca tagtgcaata 660

gtaaatacta gtggaaatgg tgattgtcat ataacttta gaggtggaaa agaacctaat 720

tattctgcaa aacatgtagc agaagtaaaa gaaggactta ataaagctgg acttcctgca	780
caggtaatga tagatTTTTc tcatgcaaat agtagtaaac aatttaagaa acaaatggat	840
gtatgtgcag atgtatgtca gcaaatagct ggaggtgaaa aagcaataat tggagtaatg	900
gtagaaagtc atttagtaga aggtaatcaa agtttagaaa gtggtgaacc tttagcttat	960
ggaaaaagta taactgatgc atgtatagga tgggaagata ctgatgcact tcttagacaa	1020
cttgcaaatg cagtaaaagc aagaagagga taa	1053

<210> 9
 <211> 6561
 <212> DNA/ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеиновая кислота

<400> 9	
cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaaata gttttatcta caatTTTTT	60
atcaggaaac agctatgacc gcggccgcag atagtcataa tagttccaga atagttcaat	120
ttagaaatta gactaaactt caaaatgttt gttaaataa taccaaaacta gtatagatat	180
TTTTTaaata ctggacttaa acagtagtaa tttgcctaaa aaatTTTTTc aatTTTTTTT	240
aaaaaatcct tttcaagttg tacattgtta tggtaatatg taattgaaga agttatgtag	300
taatattgta aacgtttctt gattTTTTTt catccatgta gtgcttaaaa aaccaaaata	360
tgtcacatgc aattgtatat ttcaaataac aatatttatt ttctcgtaa attcacaat	420
aatttattaa taatatcaat aaccaagatt aactttaat ggatgtttat tttttaacac	480
TTTTatagta aatatTTTt ttttatgtag taaaagggtt ataattataa ttgtatttat	540
tacaattaat taaaataaaa atagggtttt aggtaaaatt aagttatttt aagaagtaat	600
tacaataaaa attgaagtta ttgctttaag gagggaatta ttcatatgag tcatcctgca	660
cttactcaac ttagagcatt aagatatttt aaagaaatac ctgcattaga acctcaatta	720
ttagattggg tattacttga agatagtatg actaaaagat ttgaacaaca gggaaaaact	780
gtaagtgtaa ctatgataag agaaggattt gtagaacaaa atgaaatacc tgaagaatta	840
cctttattac ctaaagaaag tagatattgg ttaagagaaa tattactttg tgcagatggg	900
gaaccttggg tagctggaag aactgtagta cctgtaagta ctttaagtgg acctgaactt	960
gcacttcaa aattaggaaa aactccttta ggaagatatc tttttactag tagtacttta	1020
actagagatt ttatagaaat tggaagagat gcaggattat ggggaagaag aagtagatta	1080
agattaagtg gaaaaccttt attacttact gaattatttc ttcttgcaag tcctctttat	1140
taagaattcg agctcggtag gaggtcagaa tgaattatca aatgatgat ttaagaataa	1200
aagaaattaa agaattatta cctcctgtag ctttattaga aaaatTTTcct gcaactgaaa	1260

atgcagcaaa	tactgtagca	catgcaagaa	aagcaataca	taaaatactt	aaaggtaatg	1320
atgatagatt	attagtagta	ataggacctt	gtagtataca	tgatcctgta	gcagcaaaaag	1380
aatatgcaac	tagactttta	gcattaagag	aagaattaaa	agatgaatta	gaaatagtaa	1440
tgagagtata	ttttgaaaaa	cctagaacta	ctgtaggatg	gaaaggactt	ataaatgatc	1500
ctcatatgga	taatagtttt	caaataaatg	atggacttag	aatagcaaga	aaattacttt	1560
tagatataaa	tgatagtgga	ttacctgcag	ctggtgaatt	tttagatatg	ataactcctc	1620
aatatthtagc	agatthtaatg	agttgggggag	caattgggagc	aagaactact	gaaagtcaag	1680
tacatagaga	agatgcaagt	ggacttagtt	gtcctgtagg	atthaaaaat	ggaactgatg	1740
gaactataaa	agtagcaata	gatgcaataa	atgcagctgg	tgcacctcat	tgttttctta	1800
gtgtaacaaa	atggggacat	agtgcaatag	taaatactag	tggaaatggg	gattgtcata	1860
taatacttag	aggtggaaaa	gaacctaat	attctgcaaa	acatgtagca	gaagtaaaag	1920
aaggacttaa	taaagctgga	cttctgcac	aggtaatgat	agatthttct	catgcaata	1980
gtagtaaaca	atthaaagaa	caaatggatg	tatgtgcaga	tgtatgtcag	caaatagctg	2040
gaggtgaaaa	agcaataatt	ggagtaatgg	tagaaagtca	tttagtagaa	ggtaatcaaa	2100
gtttagaaag	tgggtgaacct	ttagcttatg	gaaaaagtat	aactgatgca	tgtataggat	2160
gggaagatac	tgatgcactt	cttagacaac	ttgcaaatgc	agtaaaagca	agaagaggat	2220
aactctagag	tcgacgtcac	gcgtccatgg	agatctcgag	gcctgcagac	atgcaagctt	2280
ggcactggcc	gtcgttttac	aacgtcgtga	ctgggaaaac	cctggcgta	cccaacttaa	2340
tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	ctggcgtaat	agcgaagagg	cccgcaccga	2400
tcgcccttcc	caacagttgc	gcagcctgaa	tggcgaatgg	cgctagcata	aaaataagaa	2460
gcctgcattt	gcaggcttct	tatthttatg	gcgcgccgcc	attatthttt	tgaacaattg	2520
acaattcatt	tcttatthtt	tattaagtga	tagtcaaaag	gcataacagt	gctgaataga	2580
aagaaattta	cagaaaagaa	aattatagaa	tttagtatga	ttaattatac	tcatttatga	2640
atgtthtaatt	gaatacaaaa	aaaaatactt	gttatgtatt	caattacggg	tthaaatata	2700
gacaagttga	aaaattthaat	aaaaaaataa	gtcctcagct	cttatatatt	aagctaccaa	2760
cttagtatat	aagccaaaac	tthaaatgtgc	taccaacaca	tcaagccggt	agagaactct	2820
atctatagca	atattthcaa	tgtaccgaca	tacaagagaa	acattaacta	tatatattca	2880
atthtatgaga	ttatctthaac	agatataaat	gtaaattgca	ataagtaaga	tttagaagtt	2940
tatagccttt	gtgtattgga	agcagtacgc	aaaggctthtt	ttatthtgata	aaaattagaa	3000
gtatatttht	ttthtcataa	tthaaatthtg	aaaatgaaag	ggggtgagca	aagtgcagaa	3060
ggaaagcagt	atctthtcaa	ataacaaggt	atthagcaata	tcattattga	ctthtagcagt	3120
aaacattatg	actthttatag	tgctthtgagc	taagtagtac	gaaagggggg	gctthtaaaaa	3180

gctccttggg	atacatagaa	ttcataaatt	aatttatgaa	aagaagggcg	tatatgaaaa	3240
cttgtaaaaa	ttgcaaagag	tttattaaag	atactgaaat	atgcaaaaata	cattcgttga	3300
tgattcatga	taaaacagta	gcaacctatt	gcagtaaata	caatgagtca	agatgtttac	3360
ataaagggaa	agtccaatgt	attaattggt	caaagatgaa	ccgatatgga	tggtgtgcca	3420
taaaaatgag	atgttttaca	gaggaagaac	agaaaaaaga	acgtacatgc	attaaatatt	3480
atgcaaggag	ctttaaaaaa	gctcatgtaa	agaagagtaa	aaagaaaaaa	taatttattt	3540
attaatttaa	tattgagagt	gccgacacag	tatgcactaa	aaaatatatc	tgtggtgtag	3600
tgagccgata	caaaggata	gtcactcgca	ttttcataat	acatcttatg	ttatgattat	3660
gtgtcgggtg	gacttcacga	cgaaaacca	caataaaaaa	agagtccggg	gtagggtaa	3720
gcatagttga	ggcaactaaa	caatcaagct	aggatatgca	gtagcagacc	gtaaggctgt	3780
tgtttagggtg	tgttgtaata	catacgctat	taagatgtaa	aaatacggat	accaatgaag	3840
ggaaaagtat	aatttttgga	tgtagtttgt	ttgttcatct	atgggcaaac	tacgtccaaa	3900
gccgtttcca	aatctgctaa	aaagtatatc	ctttctaaaa	tcaaagtcaa	gtatgaaatc	3960
ataaataaag	tttaattttg	aagttattat	gatattatgt	ttttctatta	aaataaatta	4020
agtatataga	atagtttaat	aatagtatat	acttaatgtg	ataagtgtct	gacagtgtca	4080
cagaaaggat	gattgttatg	gattataagc	ggccggccag	tgggcaagtt	gaaaaattca	4140
caaaaatgtg	gtataatatc	tttgttcatt	agagcgataa	acttgaattt	gagagggaac	4200
ttagatggta	tttgaaaaaa	ttgataaaaa	tagttggaac	agaaaagagt	attttgacca	4260
ctactttgca	agtgtacctt	gtacctacag	catgaccggt	aaagtggata	tcacacaaat	4320
aaaggaaaag	ggaatgaaac	tatatcctgc	aatgctttat	tatattgcaa	tgattgtaaa	4380
ccgccattca	gagtttagga	cggcaatcaa	tcaagatggt	gaattgggga	tatatgatga	4440
gatgatacca	agctatacaa	tatttcacaa	tgatactgaa	acattttcca	gcctttggac	4500
tgagtgtaag	tctgacttta	aatcattttt	agcagattat	gaaagtgata	cgcaacggta	4560
tggaaacaat	catagaatgg	aaggaaagcc	aaatgctccg	gaaaacattt	ttaatgtatc	4620
tatgataccg	tggtcaacct	tcgatggctt	taatctgaat	ttgcagaaag	gatatgatta	4680
tttgattcct	atttttacta	tggggaaata	ttataaagaa	gataacaaaa	ttatacttcc	4740
tttggaatt	caagttcatc	acgcagtatg	tgacggattt	cacatttgcc	gttttgtaaa	4800
cgaattgcag	gaattgataa	atagttaact	tcaggtttgt	ctgtaactaa	aaacaagtat	4860
ttaagcaaaa	acatcgtaga	aatacgggtg	tttttgttac	cctaagttta	aactcctttt	4920
tgataatctc	atgacaaaaa	tcccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	4980
cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	5040
gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	5100

tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt 5160
gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt 5220
gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggg 5280
ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac 5340
acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg 5400
agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg 5460
cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc aggggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc 5520
tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggcg 5580
gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc 5640
ttttgctcac atgttctttc ctgcgttata ccctgattct gtggataacc gtattaccgc 5700
ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag 5760
cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgagc ggccccctgc ttcgggggtca ttatagcgat 5820
tttttcggta tatccatcct ttttcgcacg atatacagga ttttgccaaa gggttcgtgt 5880
agactttcct tgggtgatcc aacggcgctca gccgggcagg ataggtgaag taggccacc 5940
cgcgagcggg tgttccttct tctactgtccc ttattcgcac ctggcggtgc tcaacgggaa 6000
tcctgctctg cgaggctggc cggctaccgc cggcgtaaca gatgagggca agcggatggc 6060
tgatgaaacc aagccaacca ggaagggcag cccacctatc aaggtgtact gccttccaga 6120
cgaacgaaga gcgattgagg aaaaggcgcc ggcggccggc atgagcctgt cggcctacct 6180
gctggccgtc ggccagggct acaaaatcac gggcgctcgtg gactatgagc acgtccgca 6240
gctggccccg atcaatggcg acctgggccg cctggggcggc ctgctgaaac tctggctcac 6300
cgacgacctg cgcacggcgc ggttcgggtg tgccacgata ctcgccctgc tggcgaagat 6360
cgaagagaag caggacgagc ttggcaaggt catgatgggc gtggtcgcc cgagggcaga 6420
gccatgactt ttttagccgc taaaacggcc ggggggtgcg cgtgattgcc aagcacgtcc 6480
ccatgcgctc catcaagaag agcgacttgc cggagctggt gaagtacatc accgacgagc 6540
aaggcaagac cgatcgggcc c 6561

<210> 10
<211> 1137
<212> DNA/ДНК
<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 10
ttggaagatt tggagtatth aagagatgag ataaataaaa tagataaaga aatgattgaa 60
ctttttgaaa agagggcaaa agtatctcgc aaagtagcag aatataaaat ggaaaattct 120
atggatatac ttgataaatc aagagaagaa gaggtaataa aggttaactt aaaaaatctt 180
aaagataagt ctataaaaga tgaaactaaa atctttttga agaatgttat ggaaataagc 240

aggaacatac aaaaaagaga attcaaacia tcttctaaaa gtagtgaaat taagcctaaa 300
 gggcaaaata gtgatttatt taaaattgga tttcaaggag taccagcatc tttcagtcac 360
 gaagcactgt tagagtattt tggaatgaa tcagaagcat taaactttga aagctttaaa 420
 gatgtatttg aagctctaaa aatggggct ataaagtatg gcgttcttcc tattgaaaat 480
 tcctctacag gtggcatccc acaggtttat gatcttatag gagaatatga cttttacata 540
 gttggagaaa aatgtattga agtaaatac aatttattag gagtaaaggg agcgtctatt 600
 tccgatataa aagaagttta ttctcatagt caagcattta tgcaaagtag taaatttctg 660
 gagaaacaca agaattggaa gctaaatccc tattttaata cagctagaag tgccaaatat 720
 ataagtgagc aaaatgtaa gagtaaagct gctatagcaa gtaaaaatgc agcaaaactt 780
 tatggacttg atataataga aaaaaatata aattataaca gcaataatta cactagattt 840
 ataataatag gaaaaaatat agaaagtgat aaacaacgtg acaagataag tatattgatt 900
 actctgccgc atgaaccagg aactctttat aatgttttga agtatttcca tgaaaataac 960
 ttgaatatga ctaaaataga gtcaaggcct ataataaata aatcctggca gtacttcttt 1020
 tacattgatt ttaatggaaa tattatggat aaagatacta ggtatgcttt aaatgggata 1080
 gaagaagaaa gcgcatattt taaacttttg ggggaattaca aaggagattg tttttag 1137

<210> 11
 <211> 378
 <212> PRT/BEJOK
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 11

Met Glu Asp Leu Glu Tyr Leu Arg Asp Glu Ile Asn Lys Ile Asp Lys
 1 5 10 15

Glu Met Ile Glu Leu Phe Glu Lys Arg Ala Lys Val Ser Arg Lys Val
 20 25 30

Ala Glu Tyr Lys Met Glu Asn Ser Met Asp Ile Leu Asp Lys Ser Arg
 35 40 45

Glu Glu Glu Val Ile Lys Val Asn Leu Lys Asn Leu Lys Asp Lys Ser
 50 55 60

Ile Lys Asp Glu Thr Lys Ile Phe Leu Lys Asn Val Met Glu Ile Ser
 65 70 75 80

Arg Asn Ile Gln Lys Arg Glu Phe Lys Gln Ser Ser Lys Ser Ser Glu
 85 90 95

Ile Lys Pro Lys Gly Gln Asn Ser Asp Leu Phe Lys Ile Gly Phe Gln
 100 105 110

Gly Val Pro Ala Ser Phe Ser His Glu Ala Leu Leu Glu Tyr Phe Gly
 115 120 125

Asn Glu Ser Glu Ala Leu Asn Phe Glu Ser Phe Lys Asp Val Phe Glu
 130 135 140

Ala Leu Lys Asn Gly Ala Ile Lys Tyr Gly Val Leu Pro Ile Glu Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Thr Gly Gly Ile Pro Gln Val Tyr Asp Leu Ile Gly Glu Tyr
 165 170 175

Asp Phe Tyr Ile Val Gly Glu Lys Cys Ile Glu Val Asn His Asn Leu
 180 185 190

Leu Gly Val Lys Gly Ala Ser Ile Ser Asp Ile Lys Glu Val Tyr Ser
 195 200 205

His Ser Gln Ala Phe Met Gln Ser Ser Lys Phe Leu Glu Lys His Lys
 210 215 220

Asn Trp Lys Leu Asn Pro Tyr Phe Asn Thr Ala Arg Ser Ala Lys Tyr
 225 230 235 240

Ile Ser Glu Gln Asn Val Lys Ser Lys Ala Ala Ile Ala Ser Lys Asn
 245 250 255

Ala Ala Lys Leu Tyr Gly Leu Asp Ile Ile Glu Lys Asn Ile Asn Tyr
 260 265 270

Asn Ser Asn Asn Tyr Thr Arg Phe Ile Ile Ile Gly Lys Asn Ile Glu
 275 280 285

Ser Asp Lys Gln Arg Asp Lys Ile Ser Ile Leu Ile Thr Leu Pro His
 290 295 300

Glu Pro Gly Thr Leu Tyr Asn Val Leu Lys Tyr Phe His Glu Asn Asn
 305 310 315 320

Leu Asn Met Thr Lys Ile Glu Ser Arg Pro Ile Ile Asn Lys Ser Trp
 325 330 335

Gln Tyr Phe Phe Tyr Ile Asp Phe Asn Gly Asn Ile Met Asp Lys Asp
 340 345 350

Thr Arg Tyr Ala Leu Asn Gly Ile Glu Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Lys
 355 360 365

Leu Leu Gly Asn Tyr Lys Gly Asp Cys Phe
370 375

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически сконструированная C1-фиксирующая бактерия, способная продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт, при этом указанная бактерия содержит по меньшей мере одно из следующего:

- a. экзогенную хоризмат-пируват-лиазу (ЕС 4.1.3.40),
- b. экзогенную изохоризматсинтазу (ЕС 5.4.4.2),
- c. экзогенную изохоризмат-пируват-лиазу (ЕС 4.2.99.21), и
- d. префенатсинтазу (ЕС 5.4.99.5), которая содержит нарушающую экспрессию мутацию.

2. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия представляет собой бактерию *Clostridium*, способную продуцировать по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт путем ферментации газообразного субстрата.

3. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная хоризмат-пируват-лиаза представляет собой ubiC.

4. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная изохоризматсинтаза представляет собой pchA.

5. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная изохоризмат-пируват-лиаза представляет собой pchB.

6. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная префенатсинтаза представляет собой pheA.

7. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная нарушающая экспрессию мутация уменьшает или полностью прекращает экспрессию или активность указанной префенатсинтазы.

8. Бактерия по п. 7, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество префената или происходящих из префената продуктов по сравнению с исходной бактерией.

9. Бактерия по п. 7, отличающаяся тем, что указанная бактерия по существу не продуцирует тирозина или фенилаланина.

10. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одно из следующего:

- a. экзогенную хоризмат-пируват-лиазу,
- b. экзогенную изохоризматсинтазу,

- c. экзогенную изохоризмат-пируват-лиазу, и
- d. префенатсинтазу, которая содержит нарушающую экспрессию мутацию.

11. Бактерия по п. 10, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота является кодон-оптимизированной для экспрессии в *Clostridium*.

12. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанный происходящий из хоризмата продукт содержит 6-членное углеродное кольцо, замещенное карбоксильной группой или карбоксилатным анионом, и дополнительно замещенное по меньшей мере одной ОН-группой и/или по меньшей мере одной NH₂-группой.

13. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанный происходящий из хоризмата продукт выбран из группы, состоящей из пара-гидроксибензойной кислоты, салицилата, 2-аминобензоата, дигидроксибензоата, 4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты и их солей и ионов.

14. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия экспрессирует хоризмат-пируват-лиазу ubiC и продуцирует происходящий из хоризмата продукт, представляющий собой пара-гидроксибензойную кислоту.

15. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия экспрессирует изохоризматсинтазу rchA и изохоризмат-пируват-лиазу rchB, и продуцирует происходящий из хоризмата продукт, представляющий собой салицилат.

16. Бактерия по любому из пп. 14 и 15, отличающаяся тем, что указанная бактерия дополнительно экспрессирует нечувствительную к регуляции по типу обратной связи ДАГФ-синтазу.

17. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия содержит префенатсинтазу, содержащую нарушающую экспрессию мутацию, и продуцирует происходящий из хоризмата продукт, представляющий собой 2-аминобензоат, 2,3-дигидроксибензоат или 4-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту.

18. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует по меньшей мере один происходящий из хоризмата продукт, который не продуцирует исходная бактерия.

19. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует большее количество по меньшей мере одного происходящего из хоризмата продукта, чем исходная бактерия.

20. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия получена из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

21. Бактерия по п. 20, отличающаяся тем, что указанная *Clostridium autoethanogenum* представляет собой *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

22. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанный газообразный субстрат содержит по меньшей мере один из CO, CO₂ и H₂.

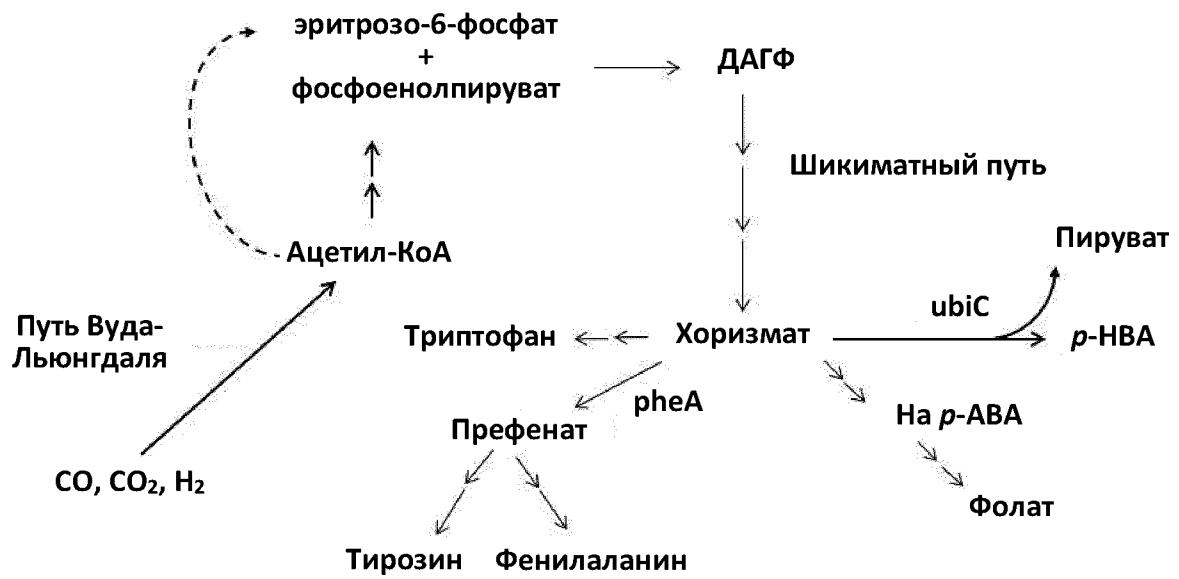
23. Способ получения продукта ферментации, включающий ферментирование бактерии по п. 1 в присутствии газообразного субстрата для получения продукта ферментации.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит по меньшей мере один из CO, CO₂ и H₂.

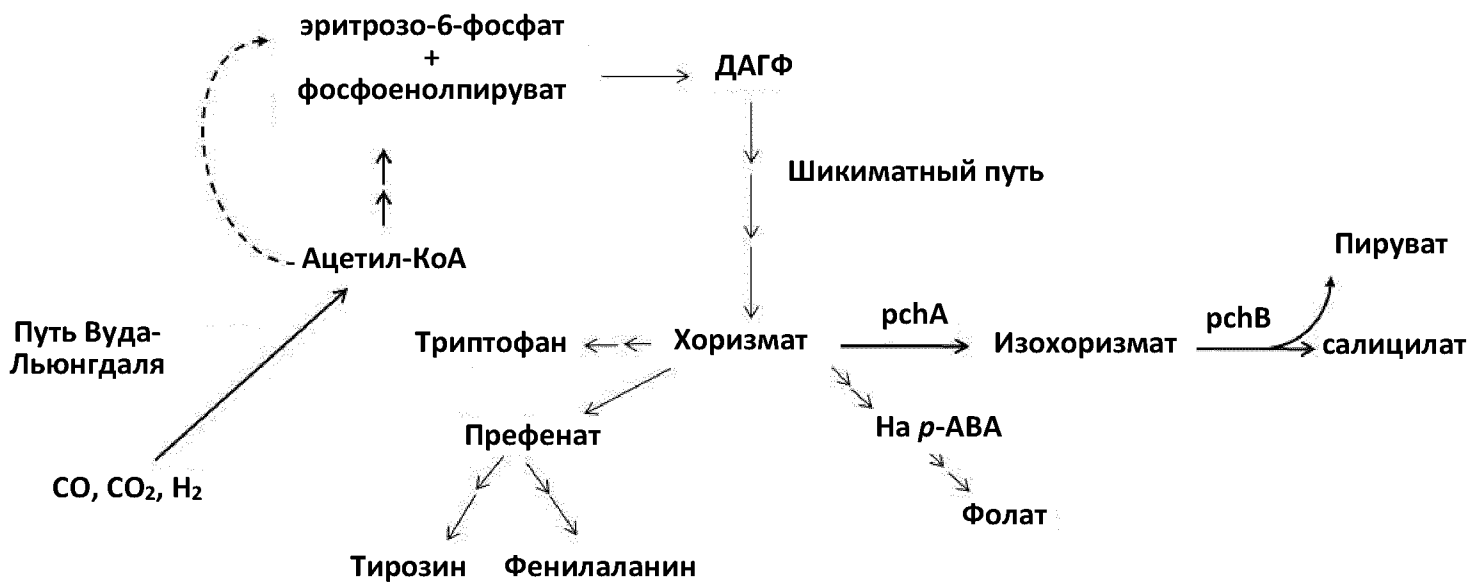
эритрозо-4-фосфат + фосфоенолпируват



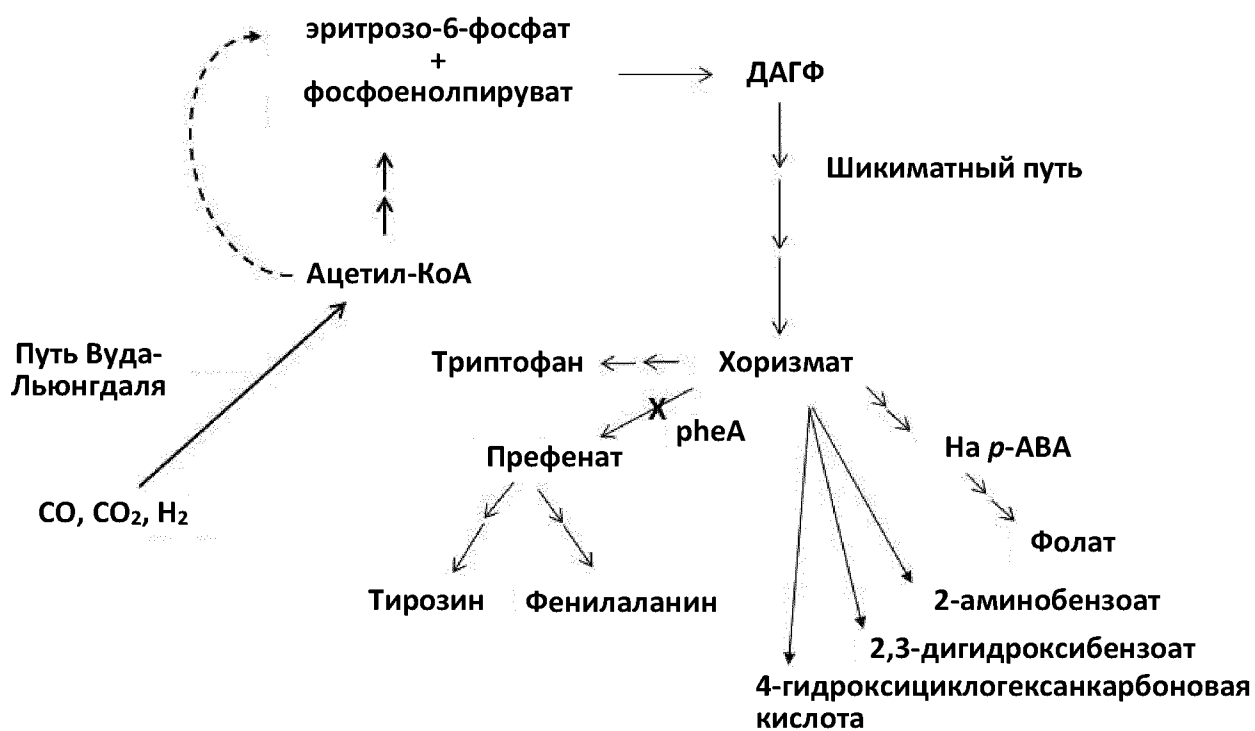
Фиг. 1



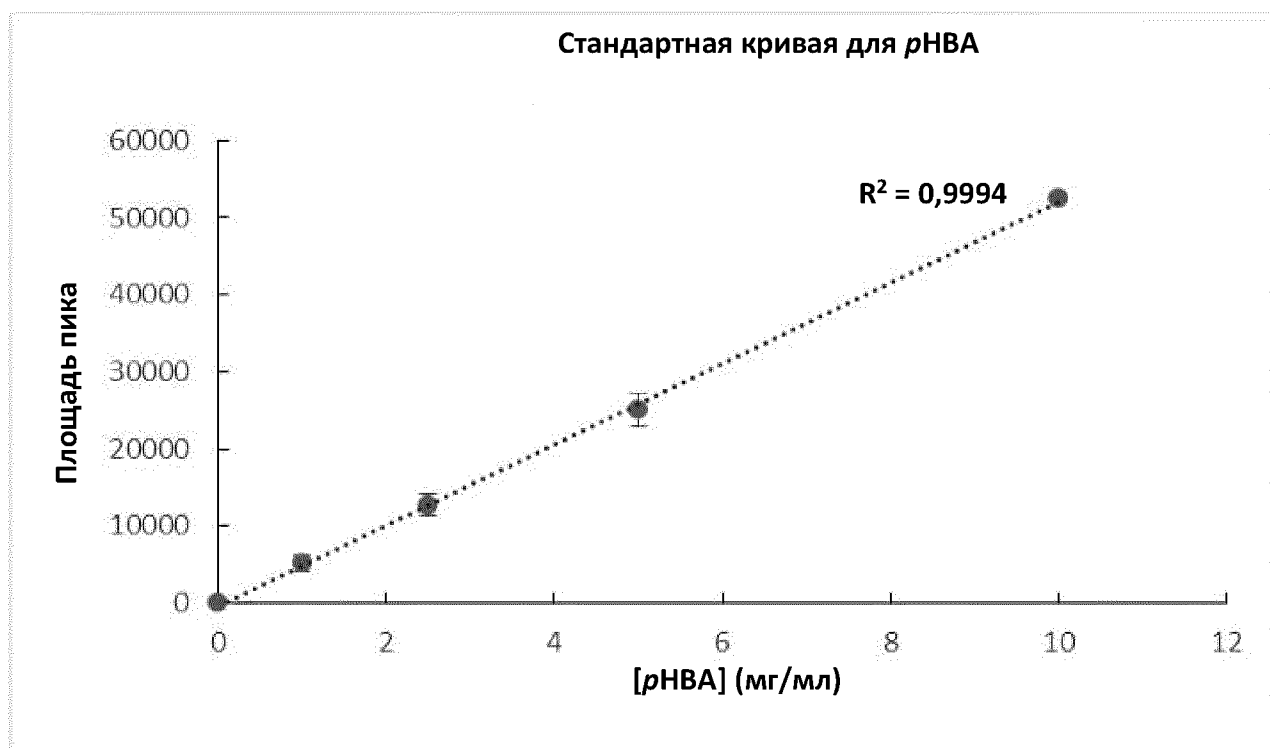
Фиг. 2



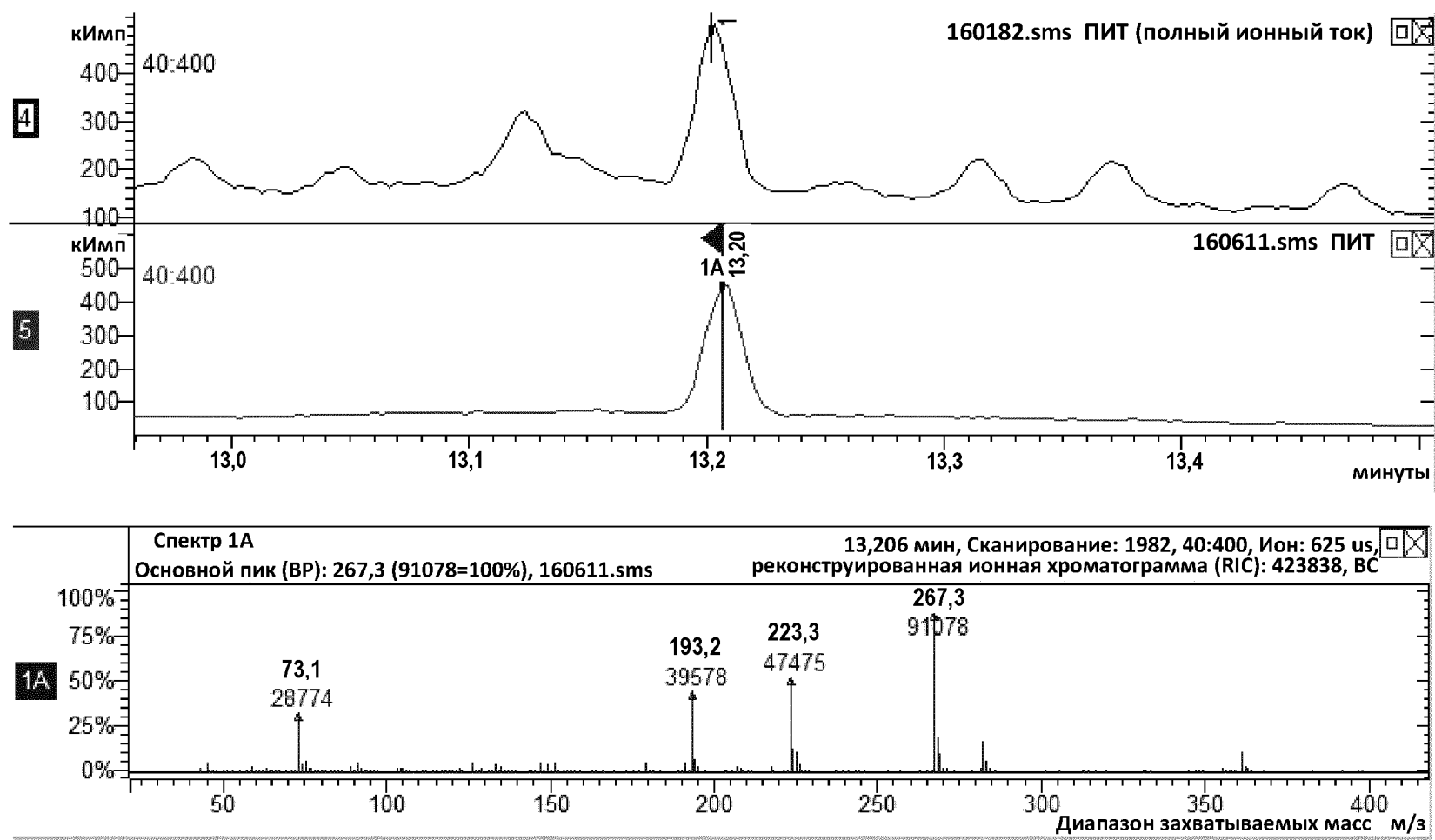
Фиг. 3



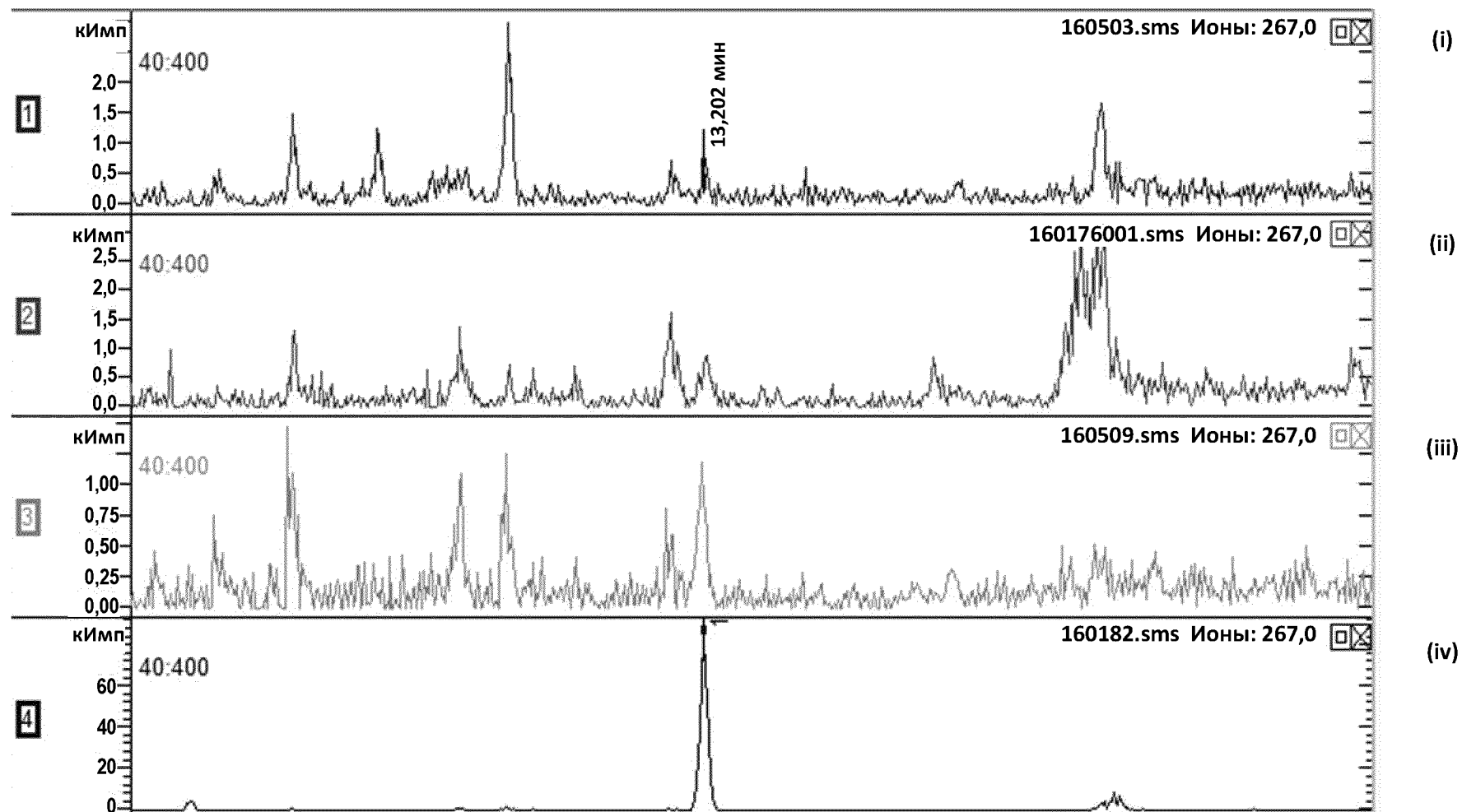
Фиг. 4



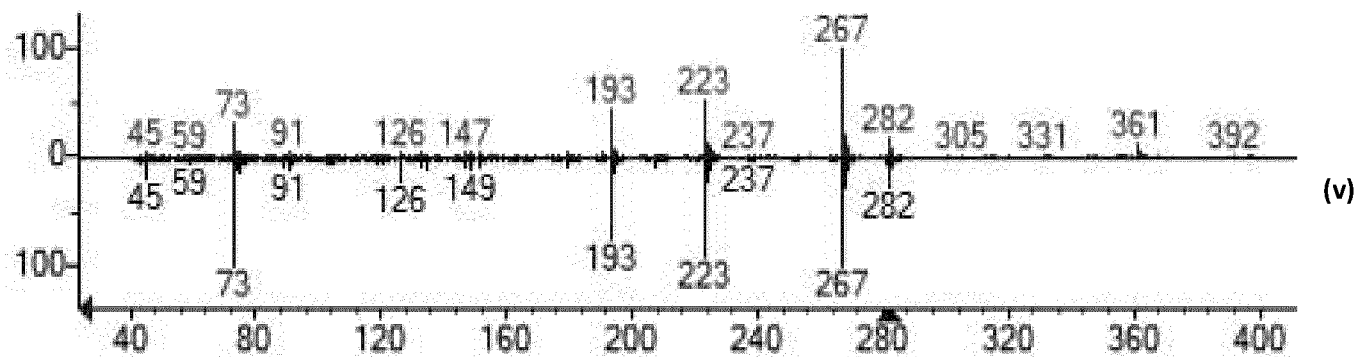
Фиг. 5



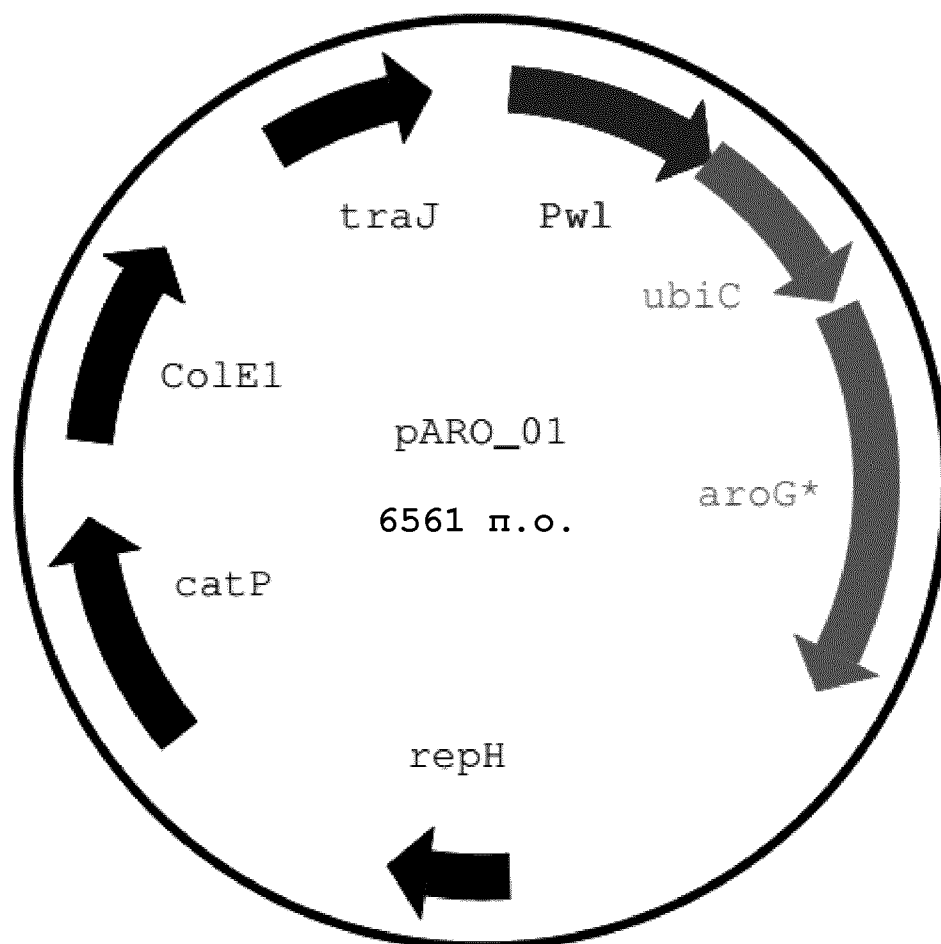
Фиг. 6а



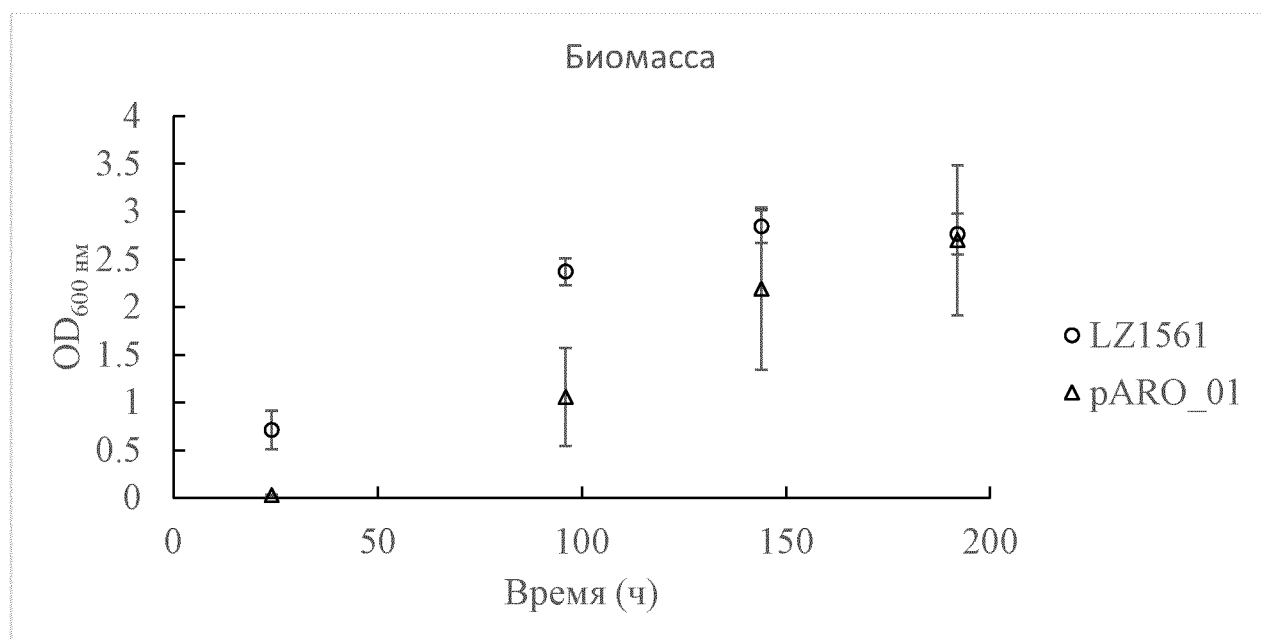
Фиг. 6b



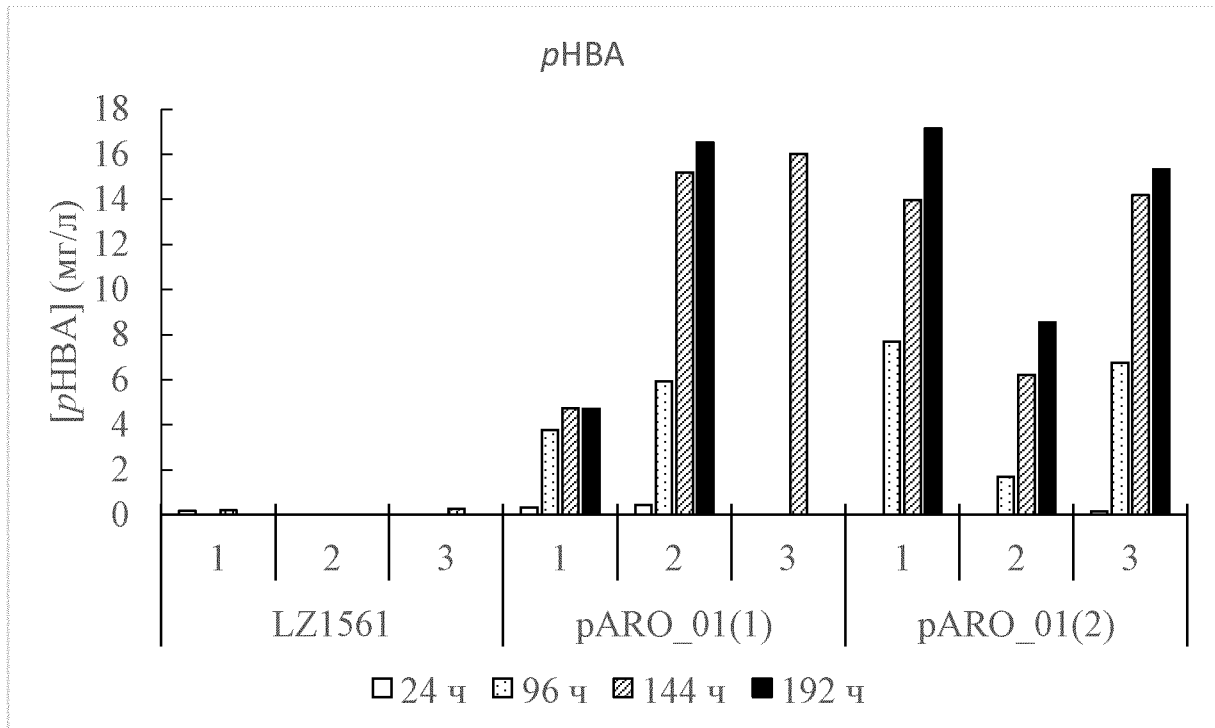
Фиг. 6b (продолжение)



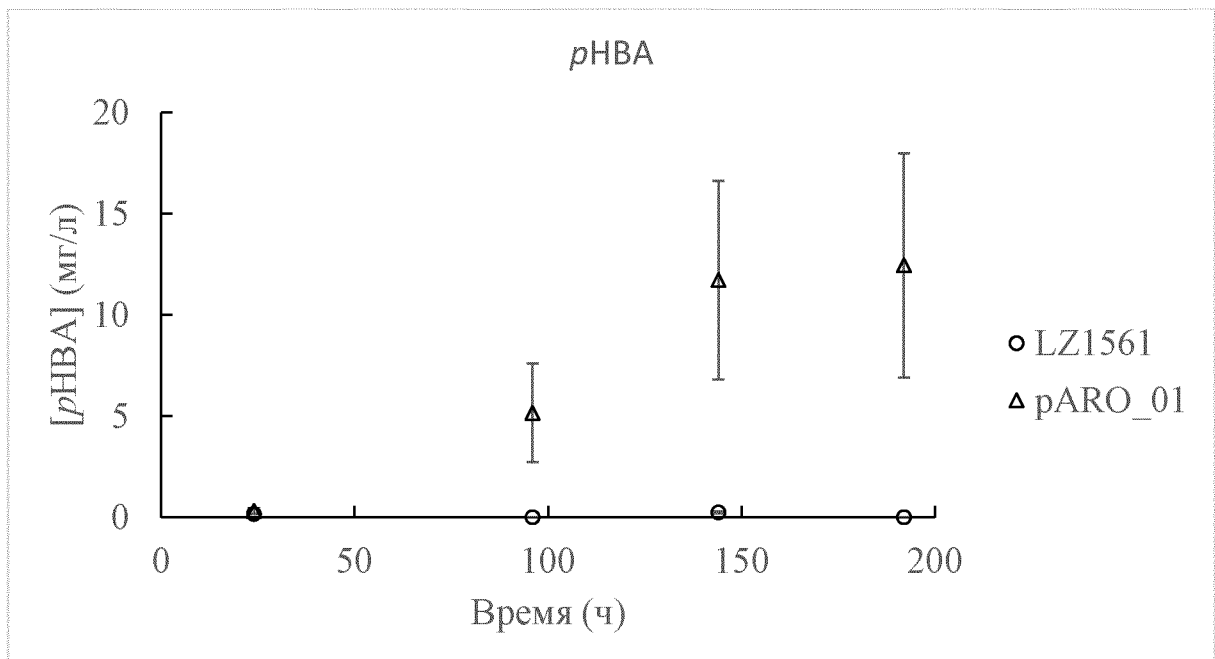
Фиг. 7



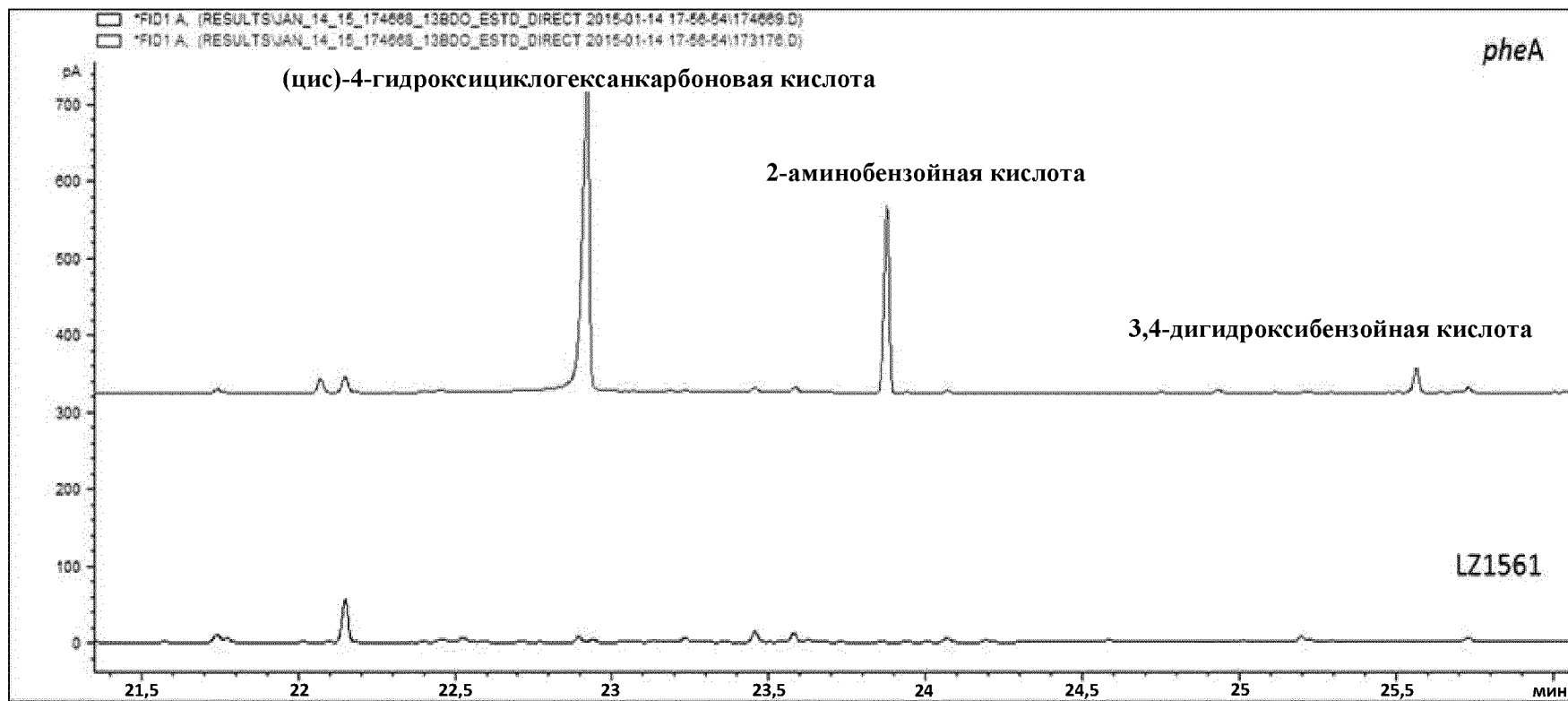
Фиг. 8



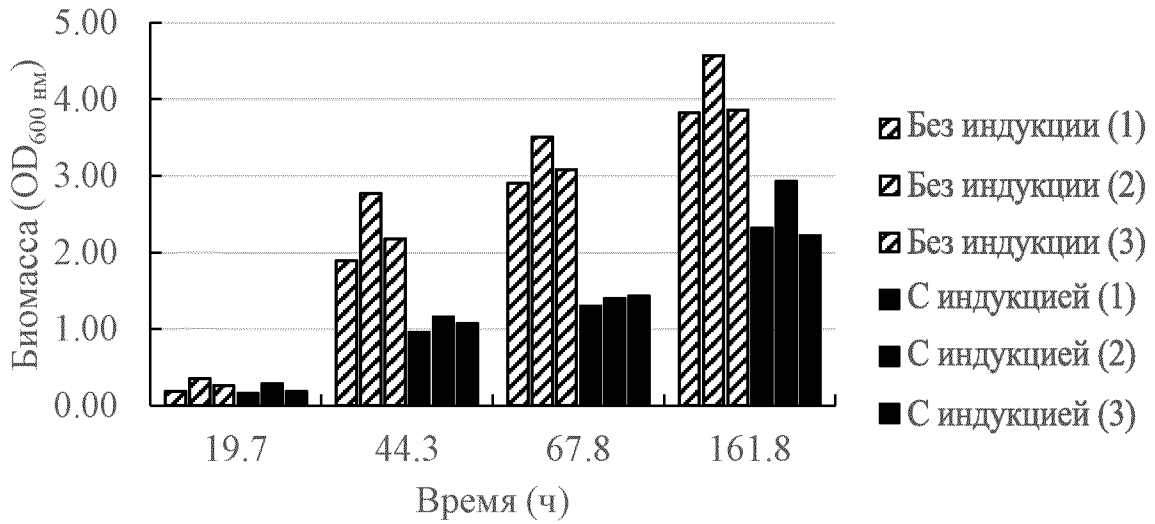
Фиг. 9а



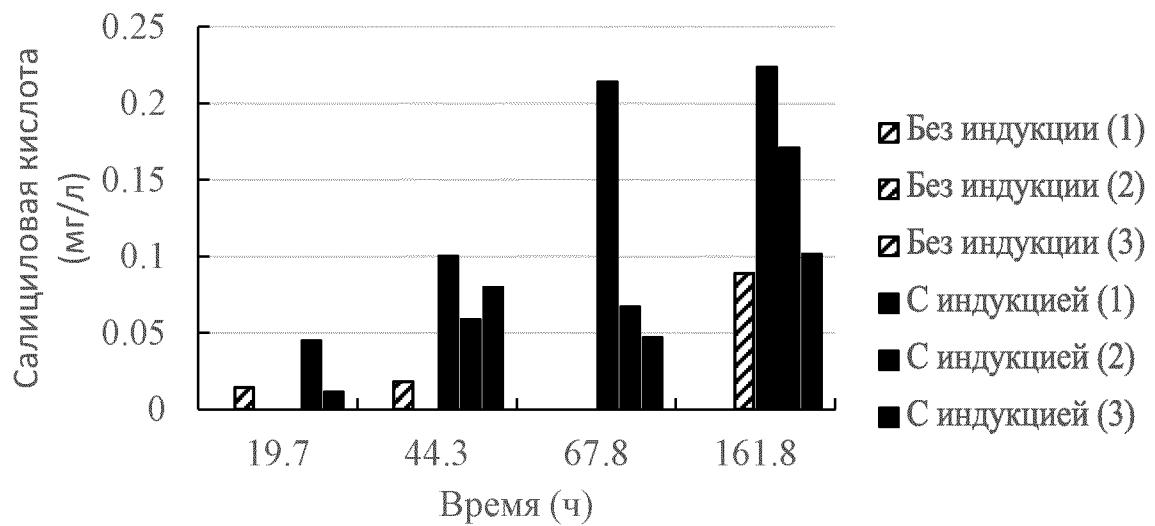
Фиг. 9б



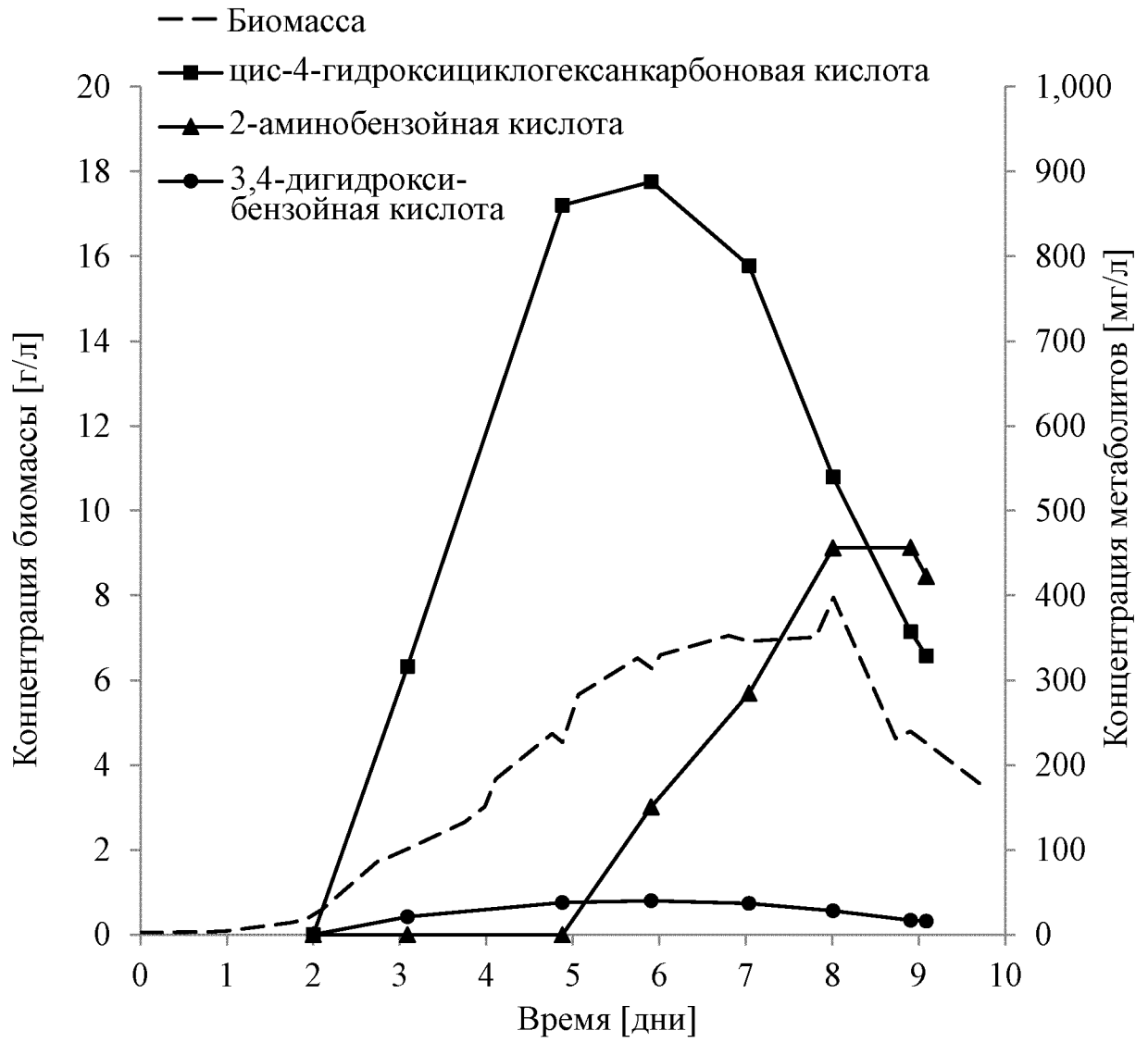
Фиг. 10



Фиг. 11а



Фиг. 11б



Фиг. 12

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Proteobacteria	WP_001326644.1	Bartonella clarridgeiae	WP_013544696.1
Escherichia coli	WP_032343343.1	Providencia alcalifaciens	WP_036955412.1
Enterobacteriaceae	WP_001295693.1	Providencia rustigianii	WP_006816067.1
Shigella flexneri	WP_005071384.1	Bartonella rattimassiliensis	WP_007347862.1
Shigella sp. SF-2015	WP_005002785.1	Edwardsiella anguillarum	WP_034163029.1
Escherichia	WP_000019214.1	Edwardsiella	WP_045427790.1
Shigella sonnei	WP_052990089.1	Phaseolibacter flectens	WP_028684858.1
Escherichia albertii	WP_000019228.1	Providencia stuartii	WP_004925912.1
Citrobacter youngae	WP_006688307.1	Edwardsiella ictaluri	WP_015869674.1
Citrobacter freundii	WP_054527959.1	Edwardsiella piscicida	WP_015460726.1
Citrobacter	WP_048213934.1	Sodalis praecaptivus	WP_051440195.1
Citrobacter pasteurii	WP_005132668.1	Sodalis glossinidius	WP_011411956.1
Комплек Citrobacter freundii	WP_032942095.1	Edwardsiella tarda	WP_035597793.1
Enterobacter cloacae	WP_063411731.1	Providencia sneebia	WP_008916956.1
Citrobacter amalonaticus	WP_061075585.1	Providencia burhodogranariae	WP_008913736.1
Гаммапротеобактерия	WP_042999031.1	Edwardsiella hoshinae	WP_024524687.1
Enterobacter	WP_014882105.1	Candidatus Sodalis pierantonius	WP_025246620.1
Комплек Enterobacter cloacae	WP_045355219.1	Photobacterium aquae	WP_047877737.1
Enterobacter sp. BIDMC 29	WP_041911565.1	Photobacterium marinum	WP_007469524.1
Enterobacter sp. 35730	WP_045268808.1	Photobacterium sanguinancrui	WP_062688249.1
Enterobacter sp. T1-1	WP_029882656.1	Photobacterium swingsii	WP_048898785.1
Enterobacter cloacae, комплекс 'Hoffmann кластер IV'	WP_008500083.1	Photobacterium damselaе	WP_044173922.1
Enterobacter asburiae	WP_023617246.1	Photobacterium sanctipauli	WP_036818650.1
Enterobacter sp. BIDMC92	WP_047957525.1	Agarivorans albus	WP_016399749.1
Enterobacter sp. 638	WP_011915505.1	Photobacterium profundum	WP_006233275.1
Citrobacter farmeri	WP_042321063.1	Vibrio maritimus	WP_042478790.1
Citrobacter koseri	WP_012134646.1	Vibrio metoecus	WP_055052109.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Enterobacter hormaechei	WP_023299087.1	Grimontia celer	WP_062666858.1
Escherichia fergusonii	WP_000019211.1	Vibrio	WP_001072883.1
Enterobacter cancerogenus	WP_042321179.1	Agarivorans gilvus	WP_055733842.1
Enterobacter sp. GN02454	WP_047742368.1	Vibrio alginolyticus	WP_053311436.1
Salmonella enterica	WP_000019223.1	Grimontia indica	WP_002535407.1
Lelliottia amnigena	WP_059179835.1	Photobacterium ganghwense	WP_047887262.1
Enterobacter sp. Bisph1	WP_039055748.1	Grimontia sp. AD028	WP_046303386.1
Salmonella bongori	WP_020845807.1	Vibrio neptunius	WP_045975676.1
Enterobacter sp. FY-07	WP_061498857.1	Vibrio coralliilyticus	WP_043006692.1
Escherichia vulneris	WP_042388891.1	Photobacterium aphoticum	WP_047873744.1
Yokenella regensburgei	WP_040902665.1	Photobacterium leiognathi	WP_053987423.1
Trabulsiella odontotermis	WP_054179777.1	Plesiomonas	WP_010862816.1
Trabulsiella guamensis	WP_038158396.1	Vibrio xuii	WP_053441696.1
Enterobacter sp. MT20	WP_061706855.1	Vibrio sp. VPAP30	WP_049845305.1
Kosakonia radicincitans	WP_043955711.1	Vibrio tubiashii	WP_038197373.1
Kluyvera intermedia	WP_047372194.1	Salinivibrio socompensis	WP_025673764.1
Enterobacter sp. Bisph2	WP_039077918.1	Grimontia marina	WP_062709804.1
Klebsiella oxytoca	WP_004109561.1	Vibrio galathea	WP_045956983.1
Enterobacter xiangfangensis	WP_058715018.1	Grimontia hollisae	WP_005501667.1
Leclercia adecarboxylata	WP_039031929.1	Photobacterium sp. SKA34	WP_006647642.1
Enterobacter aerogenes	WP_045362420.1	Vibrio cholerae	WP_032480537.1
Klebsiella	WP_014227537.1	Vibrio caribbeanicus	WP_009602602.1
Enterobacter massiliensis	WP_044180994.1	Vibrionales, бактерия SWAT-3	WP_008224249.1
Citrobacter rodentium	WP_012907701.1	Enterovibrio calviensis	WP_017016798.1
Raoultella terrigena	WP_045853463.1	Vibrio bivalvicida	WP_054963396.1
Klebsiella sp. OBRC7	WP_009654674.1	Vibrio orientalis	WP_004409565.1
Klebsiella sp. RIT-PI-d	WP_049838501.1	Vibrio sp. HI00D65	WP_063524665.1
Raoultella ornithinolytica	WP_041143590.1	Vibrio ordalii	WP_038198194.1

Фиг. 13 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_023342419.1	<i>Vibrio splendidus</i>	WP_032554291.1
<i>Klebsiella</i> sp. 10982	WP_025713803.1	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	WP_045967092.1
Бактерия Enterobacteriaceae, штамм FGI 57	WP_015966334.1	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	WP_045031601.1
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	WP_048284191.1	<i>Salinivibrio</i> sp. KP-1	WP_046074636.1
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	WP_061283371.1	<i>Photobacterium gaetbulicola</i>	WP_044622288.1
<i>Franconibacter helveticus</i>	WP_024553577.1	<i>Photobacterium</i>	WP_045083799.1
<i>Kluyvera ascorbata</i>	WP_035896877.1	<i>Enterovibrio norvegicus</i>	WP_016961855.1
<i>Franconibacter pulveris</i>	WP_029593165.1	<i>Photobacterium angustum</i>	WP_005372020.1
<i>Shimwellia blattae</i>	WP_002445222.1	<i>Vibrio brasiliensis</i>	WP_040895525.1
Enterobacteriaceae, бактерия LSJC7	WP_017373629.1	<i>Aliivibrio fischeri</i>	WP_012534390.1
<i>Cronobacter</i>	WP_007796820.1	<i>Vibrio pacinii</i>	WP_038175692.1
<i>Erwinia</i> sp. SCU-B244	WP_058912420.1	<i>Vibrio litoralis</i>	WP_051241116.1
<i>Cronobacter sakazakii</i>	WP_054624115.1	<i>Vibrio</i> sp. HENC-03	WP_009705152.1
<i>Cronobacter turicensis</i>	WP_007764634.1	<i>Vibrio</i> , геномовид F6	WP_017051810.1
<i>Cronobacter malonaticus</i>	WP_032994815.1	<i>Photobacterium aquimaris</i>	WP_060997736.1
<i>Cronobacter muytjensii</i>	WP_038867328.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	WP_024699858.1
<i>Enterobacter</i> sp. Ag1	WP_008455844.1	<i>Vibrio harveyi</i>	WP_033007672.1
<i>Cronobacter condimenti</i>	WP_007667577.1	<i>Vibrio fortis</i>	WP_032553387.1
<i>Cronobacter universalis</i>	WP_007702330.1	<i>Vibrio campbellii</i>	WP_051118327.1
<i>Cedecea neteri</i>	WP_039299465.1	<i>Vibrio</i> sp. CAIM 1540	WP_047049487.1
<i>Cronobacter dublinensis</i>	WP_007752848.1	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	WP_045035868.1
<i>Klebsiella michiganensis</i>	WP_045780974.1	<i>Moritella dasanensis</i>	WP_017222441.1
<i>Buttiauxella agrestis</i>	WP_034456982.1	Группа <i>Vibrio harveyi</i>	WP_045372302.1
<i>Siccibacter colletis</i>	WP_031521381.1	<i>Psychromonas arctica</i>	WP_028869261.1
<i>Cedecea davisae</i>	WP_016517422.1	<i>Vibrio rotiferianus</i>	WP_029560889.1
<i>Mangrovibacter</i> sp. MFB070	WP_036102985.1	<i>Bermanella marisrubri</i>	WP_050758020.1
<i>Enterobacter ludwigii</i>	WP_061718382.1	<i>Vibrio nereis</i>	WP_053396837.1
<i>Pantoea</i> sp. RIT-PI-b	WP_049851273.1	<i>Vibrio</i> sp. OY15	WP_033907265.1
<i>Pantoea</i> sp. GM01	WP_009128583.1	<i>Aliivibrio wodanis</i>	WP_060993987.1
<i>Pantoea</i> sp. 3.5.1	WP_031375526.1	<i>Vibrio renipiscarius</i>	WP_040988992.1

Фиг. 13 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Pantoea sp. YR343	WP_008109935.1	Vibrio sp. AND4	WP_043991786.1
Erwinia billingiae	WP_013200342.1	Vibrio shilonii	WP_050798660.1
Pantoea sp. AS-PWVM4	WP_021184075.1	Vibrio ichthyenteri	WP_006713584.1
Pantoea	WP_038643645.1	Vibrio azureus	WP_033004368.1
Pantoea sp. BL1	WP_045832390.1	Vibrio sp. 3062	WP_063605216.1
Erwinia typographi	WP_034898291.1	Vibrio diazotrophicus	WP_042489735.1
Erwinia	WP_014539619.1	Vibrio crassostreae	WP_048662880.1
Erwinia iniecta	WP_052902020.1	Vibrio sp. MED222	WP_009848243.1
Pantoea sp. PSNIH2	WP_038629825.1	Vibrio tasmaniensis	WP_032500146.1
Erwinia piriflorinigrans	WP_023656527.1	Vibrio hyugaensis	WP_045466146.1
Pantoea agglomerans	WP_033780412.1	Moritella viscosa	WP_045112351.1
Erwinia toletana	WP_017801681.1	Vibrio sp. J2-17	WP_050654326.1
Erwinia mallotivora	WP_034935024.1	Vibrio navarrensis	WP_039422096.1
Pantoea sp. IMH	WP_024966000.1	Psychromonas ingrahamii	WP_011771703.1
Erwinia amylovora	WP_004160504.1	Idiomarina xiamenensis	WP_008489429.1
Симбионт типа F Plautia stali	WP_058956993.1	Vibrio sagamiensis	WP_039980960.1
Pantoea sp. Sc1	WP_009092618.1	Vibrio owensii	WP_042980126.1
Pantoea anthophila	WP_046101010.1	Vibrio sp. J2-4	WP_050649045.1
Erwinia persicina	WP_062748343.1	Aliivibrio salmonicida	WP_012551314.1
Pantoea sp. At-9b	WP_013507482.1	Vibrio rhizosphaerae	WP_038185523.1
Бактерия-симбионт BFo1 Frankliniella occidentalis	WP_048917577.1	Aliivibrio logei	WP_017020963.1
Erwinia tasmaniensis	WP_012442801.1	Vibrio, геномовид F10	WP_017036869.1
Erwinia sp. Leaf53	WP_056235041.1	Vibrio breoganii	WP_017243149.1
Pantoea sp. PSNIH1	WP_039381957.1	Alteromonas macleodii	WP_041693341.1
Pantoea ananatis	WP_029569357.1	Vibrio hepatarius	WP_053410680.1
Симбионт типа D Plautia stali	WP_058972255.1	Vibrio mytili	WP_041155288.1
Pantoea stewartii	WP_006121550.1	Vibrio scophthalmi	WP_005599707.1
Pantoea dispersa	WP_058757568.1	Psychromonas sp. SP041	WP_025564742.1
Симбионт типа B Plautia stali	WP_059028282.1	Vibrio sp. S234-5	WP_045569648.1
Pantoea sp. OXW06B1	WP_063877979.1	Vibrio sp. 2423-01	WP_061893561.1
Yersinia	WP_019212311.1	Marinobacter lipolyticus	WP_036190774.1
Erwinia tracheiphila	WP_016191385.1	Vibrio sp. MEBiC08052	WP_059123026.1
Yersinia frederiksenii	WP_004711220.1	Alteromonas mediterranea	WP_012516591.1
Pantoea sp. A4	WP_026042541.1	Vibrio toranzoniae	WP_060468829.1

Фиг. 13 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Yersinia rohdei</i>	WP_032817534.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	WP_016798923.1
<i>Yersinia aldovae</i>	WP_049689167.1	<i>Vibrio rumoiensis</i>	WP_017024312.1
<i>Rouxiella chamberiensis</i>	WP_045048258.1	<i>Vibrio sinaloensis</i>	WP_039481766.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	WP_057648693.1	<i>Vibrio</i> sp. N418	WP_009384140.1
<i>Candidatus Hamiltonella defensa</i>	WP_016857191.1	<i>Marinobacterium rhizophilum</i>	WP_020679626.1
<i>Yersinia mollaretii</i>	WP_050536989.1	<i>Psychromonas hadalis</i>	WP_022942336.1
<i>Yersinia kristensenii</i>	WP_004391858.1	<i>Vibrio kanaloae</i>	WP_017055514.1
<i>Yersinia intermedia</i>	WP_005191489.1	<i>Marinobacterium litorale</i>	WP_027854294.1
<i>Serratia odorifera</i>	WP_004957855.1	<i>Vibrio</i> sp. ECSMB14106	WP_046224925.1
<i>Yersinia bercovieri</i>	WP_005271235.1	<i>Pseudomonas</i> sp. NBRC 111130	WP_054884750.1
<i>Serratia fonticola</i>	WP_059199031.1	<i>Gallibacterium</i> , геномовид 2	WP_039136020.1
<i>Yersinia pekkanenii</i>	WP_049613832.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 2-92(2010)	WP_028618504.1
<i>Serratia marcescens</i>	WP_015962093.1	<i>Moritella</i> sp. PE36	WP_006030970.1
<i>Serratia rubidaea</i>	WP_054305351.1	<i>Vibrio mimicus</i>	WP_032467641.1
<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_012147158.1	<i>Shewanella waksmanii</i>	WP_028772807.1
<i>Serratia ficaria</i>	WP_061799193.1	<i>Vibrio fluvialis</i>	WP_032081097.1
<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_044553804.1	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	WP_028942480.1
<i>Serratia</i> sp. S4	WP_017894211.1	<i>Idiomarina atlantica</i>	WP_034733921.1
<i>Serratia grimesii</i>	WP_037416107.1	<i>Gallibacterium</i> , геномовид 1	WP_039174494.1
<i>Serratia</i>	WP_020837172.1	<i>Shewanella frigidimarina</i>	WP_059745295.1
<i>Serratia plymuthica</i>	WP_062868878.1	<i>Pseudomonas putida</i>	WP_043209917.1
<i>Yersinia ruckeri</i>	WP_004719425.1	<i>Vibrio haliotocoli</i>	WP_023405283.1
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	WP_050117587.1	<i>Simiduia agarivorans</i>	WP_015047857.1
<i>Yersinia pestis</i>	WP_054104465.1	<i>Alteromonas australica</i>	WP_052806549.1
<i>Serratia</i> sp. YD25	WP_063918667.1	<i>Alteromonas marina</i>	WP_039222473.1
Комплекс <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	WP_033848617.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WP_034101515.1
<i>Serratia symbiotica</i>	WP_061770918.1	<i>Pseudomonas</i> sp. FeS53a	WP_044401466.1
<i>Serratia</i> sp. FS14	WP_044030326.1	<i>Gamma</i> proteobacterium IMCC1989	WP_009670102.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Serratia</i> sp. Leaf50	WP_055774138.1	<i>Spiribacter salinus</i>	WP_016352700.1
Enterobacteriaceae, бактерия B14	WP_051014381.1	<i>Gallibacterium anatis</i>	WP_039166724.1
<i>Serratia</i> sp. M24T3	WP_009638599.1	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	WP_005538626.1
<i>Yersinia nurmii</i>	WP_049598056.1	<i>Cellvibrio</i> sp. BR	WP_007638851.1
<i>Tatumella saanichensis</i>	WP_029686453.1	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	WP_050694113.1
<i>Photobacterium luminescens</i>	WP_040154039.1	<i>Idiomarina sediminum</i>	WP_051207005.1
<i>Xenorhabdus poinarii</i>	WP_045959602.1	<i>Shewanella sediminis</i>	WP_012144760.1
<i>Bartonella senegalensis</i>	WP_019221445.1	<i>Vibrio furnissii</i>	WP_055466655.1
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	WP_038235621.1	<i>Vibrio ezurae</i>	WP_021715061.1
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	WP_039355229.1	<i>Pseudomonas</i> sp. TTU2014-105ASC	WP_058063592.1
<i>Serratia</i> sp. DD3	WP_023490517.1	<i>Vibrio proteolyticus</i>	WP_021707164.1
<i>Chania multitudinisentens</i>	WP_024913341.1	<i>Balneatrix alpica</i>	WP_051527455.1
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	WP_039303019.1	<i>Pseudomonas parafulva</i>	WP_039582433.1
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	WP_011092244.1	<i>Shewanella loihica</i>	WP_011867537.1
<i>Photobacterium heterorhabditis</i>	WP_054478023.1	<i>Vibrio vulnificus</i>	WP_039541844.1
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	WP_012822481.1	<i>Nitrococcus mobilis</i>	WP_040661924.1
<i>Xenorhabdus</i>	WP_047769935.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 5	WP_045186199.1
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	WP_038219455.1	<i>Pseudomonas trivialis</i>	WP_049710900.1
<i>Bartonella henselae</i>	WP_011181000.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	WP_038663939.1
<i>Bartonella koehlerae</i>	WP_034459798.1	<i>Pseudomonas tuomuerensis</i>	WP_039606725.1
<i>Tatumella morbirosei</i>	WP_038023855.1	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	WP_040266714.1
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	WP_021014322.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ARP3	WP_047881785.1
<i>Ewingella americana</i>	WP_034793486.1	<i>Alteromonas</i> sp. ALT199	WP_025257082.1
<i>Hafnia alvei</i>	WP_043490453.1	<i>Cellvibrio</i> sp. pealriver	WP_049631176.1
<i>Rahnella</i>	WP_013577374.1	<i>Psychromonas aquimarina</i>	WP_028862328.1
<i>Rahnella aquatilis</i>	WP_047612327.1	<i>Pseudomonas</i>	WP_043314995.1

Фиг. 13 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Serratia sp. Leaf51	WP_056776024.1	Marinobacter daepoensis	WP_029654624.1
Pectobacterium sp. SCC3193	WP_014698702.1	Sedimenticola selenatireducens	WP_037375012.1
Bartonella bacilliformis	WP_041849739.1	Pseudomonas sp. TKP	WP_024078144.1
Dickeya sp. DW 0440	WP_035339654.1	Pseudomonas corrugata	WP_024777876.1
Budvicia aquatica	WP_036017158.1	Pseudomonas sp. AAC	WP_043268085.1
Photobacterium asymbiotica	WP_036770256.1	Colwellia psychrerythraea	WP_033093585.1
Brenneria sp. EniD312	WP_009114521.1	Shewanella sp. P1-14-1	WP_055024157.1
Xenorhabdus doucetiae	WP_045972447.1	Pseudomonas fluorescens группа	WP_033897276.1
Proteus vulgaris	WP_036938822.1	Pseudomonas mediterranea	WP_047704174.1
Bartonella bovis	WP_010702680.1	Marinobacter subterrani	WP_048497131.1
Proteus mirabilis	WP_036971463.1	Pseudohongiella spirulinae	WP_058022208.1
Proteus hauseri	WP_023583078.1	Pseudomonas sp. URHB0015	WP_027616796.1
Bartonella birtlesii	WP_006590207.1	Pseudomonadaceae	WP_027588895.1
Bartonella quintana	WP_042995424.1	Marinobacter santoriniensis	WP_040886922.1
Bartonella vinsonii	WP_015399203.1	Vibrio metschnikovii	WP_040903602.1
Xenorhabdus sp. NBAII XenSa04	WP_047683929.1	Pseudomonas sp. NBRC 111123	WP_060483806.1
Xenorhabdus bovienii	WP_038187361.1	Pseudomonas sp. URMO17WK12:18	WP_027917043.1
Bartonella sp. DB5-6	WP_007553455.1	Marinobacter sp. C1570	WP_022993199.1
Bartonella taylorii	WP_004859565.1	Pseudomonas fuscovaginae	WP_054057810.1
Xenorhabdus khoisanae	WP_047963672.1	Pseudomonas sp. M1	WP_024128089.1
Xenorhabdus cabanillasii	WP_038260250.1	Pseudomonas poae	WP_015373328.1
Bartonella washoensis	WP_006924009.1	Marinobacter hydrocarbonoclasticus	WP_014422862.1
бактерия-симбионт BFo2 of Frankliniella occidentalis	WP_048911280.1	Marinobacter sp. CP1	WP_053113189.1
Bartonella florencae	WP_019218918.1	Marinobacter similis	WP_052471995.1
Bartonella elizabethae	WP_005773162.1	Moritella marina	WP_019441181.1
Dickeya dadantii	WP_038924493.1	Vibrio sp. RC586	WP_001072884.1
Lonsdalea quercina	WP_026739591.1	Shewanella colwelliana	WP_028764686.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Photorhabdus temperata	WP_046974225.1	Pseudomonas cremoricolorata	WP_038411439.1
Dickeya dianthicola	WP_024104487.1	Aestuariibacter salexigens	WP_051275567.1
Arsenophonus nasoniae	WP_034249744.1	Pseudomonas simiae	WP_047542440.1
Dickeya zeae	WP_016943166.1	Pseudomonas sp. SHC52	WP_041020540.1
Pragia fontium	WP_047782060.1	Saccharospirillum impatiens	WP_051208090.1
Bartonella melophagi	WP_007476822.1	Pseudomonas chloritidismutans	WP_042927861.1
Dickeya	WP_038917764.1	Nitrincola sp. A-D6	WP_036522654.1
Leminorella grimontii	WP_027275775.1	Shewanella sp. cp20	WP_041509787.1
Bartonella alsatica	WP_005864859.1	Gammaproteobacterium HTCC2207	WP_007231113.1
Dickeya sp. NCPPB 3274	WP_042858576.1	Pseudomonas sp. p21	WP_063912245.1
Bartonella queenslandensis	WP_039758997.1	Alteromonas	WP_032094739.1
Эндосимбионт Arsenophonus Nilaparvata lugens	WP_032116478.1	Pseudomonas batumici	WP_040071885.1
Bartonella doshiae	WP_004855905.1	Pseudomonas sp. Ant30-3	WP_028620438.1
Bartonella schoenbuchensis	WP_010704040.1	Marinobacter sp. EVN1	WP_023009487.1
Providencia rettgeri	WP_004261323.1	Pseudomonas monteilii	WP_060477249.1
Dickeya sp. 2B12	WP_033570629.1	Actinobacillus	WP_005625006.1
Dickeya solani	WP_022632063.1	Pseudomonas sp. URMO17WK12:I4	WP_027908969.1
Tatumella	WP_025900954.1	Pseudomonas sp. FGI182	WP_025341124.1
Morganella morganii	WP_024475151.1	Pseudomonas agarici	WP_017132350.1
Morganella	WP_004241531.1	Pseudomonas veronii	WP_017849993.1
Bartonella tribocorum	WP_038473768.1		
Dickeya chrysanthemi	WP_040002537.1		
Brenneria goodwinii	WP_048636333.1		
Dickeya paradisiaca	WP_015855063.1		
Candidatus Regiella insecticola	WP_006705673.1		
Dickeya sp. NCPPB 569	WP_042868420.1		
Bartonella grahamii	WP_034451706.1		

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Moellerella wisconsensis	WP_053907569.1		
Bartonella rattaaustraliani	WP_019222387.1		

Фиг. 13 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Pseudomonas	WP_003114686.1	Bacillus sp. NH7I_1	WP_060697735.1
Pseudomonas aeruginosa	WP_023089494.1	Bacillus sp. WP8	WP_039180923.1
Pseudomonas sp. 2_1_26	WP_009316330.1	Bacillus sp. Aph1	WP_034271361.1
Microvirgula aerodenitrificans	WP_028498979.1	Azospirillum sp. B506	WP_049975975.1
Burkholderia contaminans	WP_039366334.1	Virgibacillus pantothenicus	WP_050350407.1
Burkholderia cepacia	WP_059525390.1	Bacillus sp. B-jedd	WP_048826224.1
Комплекс Burkholderia cepacia	WP_027789658.1	Bacillus simplex	WP_061142094.1
Burkholderia cenocepacia	WP_043887199.1	Virgibacillus sp. SK37	WP_040955898.1
Burkholderia oklahomensis	WP_010108306.1	Bacillus thermotolerans	WP_039238772.1
Burkholderia	WP_048024784.1	unclassified Bacillaceae	WP_040037859.1
Burkholderia anthina	WP_059640804.1	Bacillus sp. Root920	WP_056766977.1
Burkholderia lata	WP_011354275.1	Anoxybacillus thermarum	WP_043966577.1
Burkholderia sp. MSh1	WP_031398726.1	Bacillus coahuilensis	WP_010174447.1
Burkholderia sp. MSh2	WP_034198724.1	Bacillus safensis	WP_044332225.1
Burkholderia sp. ABCPW 11	WP_059505050.1	Alkalibacillus haloalkaliphilus	WP_017187026.1
Burkholderia seminalis	WP_059556868.1	Bacillus sp. J33	WP_034263269.1
Burkholderia pseudomallei	WP_004551415.1	Viridibacillus arenosi	WP_038188166.1
Burkholderia thailandensis	WP_009900942.1	Bacillus sp. FJAT-14578	WP_028395275.1
Burkholderia glumae	WP_052498364.1	Oceanobacillus kimchii	WP_017797441.1
Burkholderia plantarii	WP_055139495.1	Bacillus decisifrondis	WP_053592881.1
Pseudomonas mandelii	WP_050482791.1	Virgibacillus halodenitrificans	WP_019379016.1
Pseudomonas fluorescens	WP_047337084.1	Gracilibacillus sp. Awa-1	WP_058306868.1
Nitrococcus mobilis	WP_005004375.1	Bacillus sp. MSP13	WP_039074850.1
Pseudomonas protegens	WP_041752315.1	Lysinibacillus macroides	WP_053996681.1
Pseudomonas sp. PH1b	WP_025129888.1	Bacillus sp. FJAT-27251	WP_053364401.1
Pseudomonas putida	WP_023535698.1	Lysinibacillus massiliensis	WP_036180684.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Pseudomonas</i> sp. ABAC61	WP_058436407.1	<i>Lysinibacillus</i> sp. FJAT-14745	WP_053485081.1
<i>Pseudomonas veronii</i>	WP_032804924.1	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	WP_052295394.1
<i>Pseudomonas</i> sp. ARP3	WP_053060097.1	<i>Bacillus</i> sp. SA2-6	WP_046525629.1
<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 25886	WP_010169497.1	<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	WP_041968022.1
<i>Pseudomonas</i> sp. MRSN12121	WP_044463386.1	<i>Gracilimonas tropica</i>	WP_020401972.1
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	WP_040269528.1	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	WP_042530686.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 2(2015)	WP_045198122.1	<i>Bacillus muralis</i>	WP_057915654.1
<i>Pseudomonas</i> sp. BRG-100	WP_032876543.1	<i>Bacillus malacitensis</i>	WP_059291772.1
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	WP_052712847.1	<i>Anoxybacillus</i> sp. KU2-6(11)	WP_035048665.1
<i>Pseudomonas</i> sp. CFII68	WP_018605339.1	<i>Domibacillus enclensis</i>	WP_052698560.1
<i>Pseudomonas helleri</i>	WP_048388690.1	<i>Bacillus axarquiensis</i>	WP_059352147.1
<i>Pseudomonas</i> sp. Root569	WP_056846015.1	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	WP_059335649.1
<i>Pseudomonas</i> sp. FH1	WP_033901147.1	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	WP_049667404.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 2-92(2010)	WP_050587840.1	<i>Bacillus tequilensis</i>	WP_024714703.1
<i>Pseudomonas libanensis</i>	WP_059396815.1	<i>Bacillus</i> sp. UNC322MFChir4.1	WP_035432514.1
<i>Pseudomonas simiae</i>	WP_047543762.1	<i>Solibacillus</i>	WP_008408138.1
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	WP_014994844.1	<i>Sporosarcina koreensis</i>	WP_060206543.1
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	WP_053121146.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	WP_010860294.1
<i>Pseudomonas synxantha</i>	WP_057025332.1	<i>Lysinibacillus</i> sp. F5	WP_058845031.1
Бактерия JKG1	WP_029214447.1	<i>Paenisporosarcina</i> sp. TG-14	WP_017380005.1
<i>Gracilibacillus halophilus</i>	WP_003467031.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	WP_043925819.1
<i>Pseudomonas syringae</i>	WP_024668534.1	<i>Lysinibacillus odysseyi</i>	WP_036151007.1
Бактерия mt3	WP_054949256.1	<i>Anoxybacillus</i> sp. BCO1	WP_042894993.1
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	WP_058489589.1	<i>Viridibacillus arvi</i>	WP_053416717.1

Фиг. 14 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Группа <i>Pseudomonas syringae</i> , геномовид 7	WP_055005986.1	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	WP_029760552.1
Группа <i>Pseudomonas syringae</i> , геномовид 3	WP_057415224.1	<i>Geobacillus</i> sp. PA-3	WP_060476126.1
<i>Pseudomonas amygdali</i>	WP_005762842.1	<i>Geobacillus</i> sp. G11MC16	WP_008880976.1
<i>Azospirillum lipoferum</i>	WP_014188759.1	<i>Bacillus velezensis</i>	WP_029974105.1
<i>Bacillus aquimaris</i>	WP_052011500.1	<i>Halapricum salinum</i>	WP_049992575.1
Группа <i>Pseudomonas syringae</i>	WP_007245942.1	<i>Bacillus stratosphericus</i>	WP_039964166.1
<i>Pseudomonas caricaparayae</i>	WP_055009862.1	Bacillales	WP_014114896.1
<i>Bradyrhizobium</i>	WP_024580699.1	<i>Solibacillus silvestris</i>	WP_014823056.1
<i>Oscillochloris trichoides</i>	WP_006562625.1	<i>Bhargavaea cecembensis</i>	WP_008300106.1
<i>Bacillus enclensis</i>	WP_058298109.1	<i>Sporosarcina</i> sp. EUR3 2.2.2	WP_024534129.1
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	WP_004665562.1	<i>Bacillus</i> sp.	WP_052586469.1
<i>Bacillus</i> sp. SG-1	WP_006836445.1	<i>Bacillus xiamenensis</i>	WP_008360695.1
<i>Pseudomonas avellanae</i>	WP_005617735.1	Bacilli бактерия VT-13-104	WP_047184596.1
<i>Microbulbifer variabilis</i>	WP_020415351.1	<i>Bacillus</i> sp. DW5-4	WP_034325145.1
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	WP_054064572.1	<i>Bacillus altitudinis</i>	WP_047945217.1
<i>Bacillus vietnamensis</i>	WP_051758539.1	<i>Planomicrobium</i> sp. ES2	WP_052652109.1
<i>Bacillus</i> sp. LL01	WP_047970983.1	<i>Geobacillus subterraneus</i>	WP_063167279.1
<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	WP_007503034.1	<i>Geobacillus</i>	WP_042381875.1
<i>Bacillus marisflavi</i>	WP_048013478.1	<i>Oceanobacillus caeni</i>	WP_060668740.1
<i>Pseudomonas cichorii</i>	WP_025259793.1	<i>Lysinibacillus</i> sp. ZYM-1	WP_054612847.1
<i>Aeribacillus pallidus</i>	WP_063386559.1	<i>Lysinibacillus varians</i>	WP_025220363.1
<i>Bacillus azotoformans</i>	WP_035196603.1	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	WP_063589832.1
<i>Desmospora</i> sp. 8437	WP_040387746.1	<i>Bacillus</i> sp. BSC154	WP_041906541.1
<i>Bacillus horikoshii</i>	WP_063559773.1	<i>Terribacillus aidingensis</i>	WP_038565035.1
<i>Halobacillus halophilus</i>	WP_014644096.1	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	WP_051375075.1
<i>Bacillus humi</i>	WP_057999505.1	<i>Gracilibacillus boracitolerans</i>	WP_035724544.1

Фиг. 14 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Salimicrobium jeotgali	WP_008587369.1	Virgibacillus soli	WP_057982217.1
Jeotgalibacillus malaysiensis	WP_039810607.1	Bacillus sp. 37MA	WP_018394222.1
Geobacillus sp. Y4.1MC1	WP_013400205.1	Planomicrobium glaciei	WP_053167718.1
Pseudomonas agarici	WP_060783693.1	Bacillus cihuensis	WP_028392653.1
Bacillus sp. Leaf406	WP_056534732.1	Bacillus cereus	WP_016116829.1
Desulfovibrio desulfuricans	WP_041724102.1	Geobacillus sp. JS12	WP_063193197.1
Anaerobacillus macyae	WP_053216218.1	Kurthia massiliensis	WP_010288409.1
Pontibacillus halophilus	WP_026801400.1	Bacillus sp. Soil768D1	WP_057215430.1
Geobacillus toebii	WP_062755081.1	Bacillus sonorensis	WP_006636053.1
Bacillus sp. m3-13	WP_010195203.1	Bacillus sp. FJAT-20673	WP_063574832.1
Geobacillus thermoglucosidasius	WP_042384399.1	Lysinibacillus boronitolerans	WP_036078490.1
Pontibacillus marinus	WP_027447035.1	Bacillus sp. Leaf13	WP_056521250.1
Geobacillus sp. WCH70	WP_015864892.1	Bacillus sp. 72	WP_051927823.1
Thalassobacillus sp. TM-1	WP_062440761.1	Geobacillus sp. JF8	WP_020961008.1
Bacillus sp. CHD6a	WP_060666910.1	Bacillus butanolivorans	WP_053347927.1
Bacillaceae	WP_003248477.1	Geobacillus sp. C56-T3	WP_013144393.1
Bacillus sp. SA1-12	WP_046590138.1	Bacillus pseudomycoides	WP_006096312.1
Bacillus massiliogorillae	WP_042345107.1	Roseiflexus sp. RS-1	WP_011954829.1
Pontibacillus chungwhensis	WP_036782710.1	Bacillus sp. 95MFCvi2.1	WP_018782033.1
Thermogemmatispora carboxidivorans	WP_052888923.1	Группа Bacillus cereus	WP_040119032.1
Salinibacillus aidingensis	WP_044163325.1	Lysinibacillus fusiformis	WP_004225913.1
Bacillus sp. X1(2014)	WP_038536892.1	Bacillus mycoides	WP_041488594.1
Lentibacillus jeotgali	WP_010532310.1	Lysinibacillus sp. LK3	WP_048391047.1
Bacillus ginsengihumi	WP_035353906.1	Bacillus sp. Soil745	WP_057279191.1
Jeotgalibacillus soli Cunha et al. 2012	WP_052474929.1	Bacillus sp. FJAT-27916	WP_049669789.1
Bacillus shackletonii	WP_055738952.1	Thermomicrobium roseum	WP_012642614.1
Pontibacillus yanchengensis	WP_036821077.1	Geobacillus sp. CAMR5420	WP_033026053.1
Bacillus niacini	WP_034673537.1	Bacillus sp. 105MF	WP_018764645.1

Фиг. 14 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Bacillus sp. J37	WP_026561814.1	Bacillus manliponensis	WP_034642812.1
Bacillus vireti	WP_024027849.1	Bacillus sp. FJAT-27245	WP_053367481.1
Bacillus cibi	WP_029566209.1	Lysinibacillus sp. BF-4	WP_036142602.1
Bacillus alveayuensis	WP_052659551.1	Lysinibacillus	WP_036119793.1
Bacillus indicus	WP_029278756.1	Opitutus terrae	WP_012376455.1
Bacillus bataviensis	WP_007086491.1	Domibacillus robiginosus	WP_050181303.1
Thalassobacillus devorans	WP_028783548.1	Bacillus aminovorans	WP_063975020.1
Chloroflexus aggregans	WP_012615533.1	Bacillus sp. 1NLA3E	WP_041580669.1
Bacillus fordii	WP_018707485.1	Sporosarcina newyorkensis	WP_009497990.1
Virgibacillus sp. SK-1	WP_053218805.1	Bacillus sp. GeD10	WP_006915660.1
Bacillus smithii	WP_048623884.1	Paenisporosarcina sp. TG20	WP_019414907.1
Halobacillus kuroshimensis	WP_027956472.1	Planococcus antarcticus	WP_006831222.1
Geobacillus caldoxylosilyticus	WP_017434868.1	Bacillus sp. UNC437CL72CviS29	WP_026593876.1
Bacillus massilioanorexius	WP_019243994.1	Bacillus sp. 123MFChir2	WP_020061371.1
Geobacillus stearothermophilus	WP_043905856.1	Halobacterium sp. CBA1132	WP_058982752.1
Bacillus circulans	WP_061798785.1	Streptomyces sp. MBT76	WP_058042239.1
Ktedonobacter racemifer	WP_007913623.1	Bacillus sp. FJAT-13831	WP_017153674.1
Jeotgalibacillus alimentarius	WP_052474147.1	Bacillus gaemokensis	WP_033676253.1
Bacillus sp. FJAT-27445	WP_059171493.1	Bacilli	WP_000616738.1
Bacillus	WP_009795315.1	Sporolactobacillus laevolacticus	WP_023509936.1
Bacillus nealsonii	WP_016202883.1	Alicyclobacillus contaminans	WP_051321775.1
Sporosarcina globispora	WP_053434007.1	Bacillus cytotoxicus	WP_012095948.1
Oceanobacillus picturae	WP_036574619.1	Conexibacter woesei	WP_035127957.1
Gracilibacillus lacisalsi	WP_018934096.1	Halobacterium hubeiense	WP_059056695.1
Oceanobacillus sp. S5	WP_040979050.1	Bacillus sp. H1a	WP_025148828.1
Alicyclobacillus macrosporangiidus	WP_051662824.1	Bacillus thuringiensis	WP_023523256.1

Фиг. 14 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Bacillus sp. UNC438CL73TsuS30	WP_026572089.1	Patulibacter americanus	WP_022928512.1
Bacillus sp. ZYK	WP_017756202.1	Bacillus sp. B14905	WP_043990721.1
Bacillus psychrosaccharolyticus	WP_051387396.1	Planococcus kocurii	WP_058385831.1
Ornithinibacillus contaminans	WP_047979667.1	Planococcus sp. CAU13	WP_033543886.1
Anoxybacillus tepidamans	WP_027410481.1	Sporosarcina ureae	WP_029055120.1
Oceanobacillus manasiensis	WP_042222742.1	Geobacillus icigianus	WP_033018318.1
Bacillus methanolicus	WP_004439139.1	Sporolactobacillus terrae	WP_051577709.1
Halobacillus sp. BBL2006	WP_035548017.1	Tuberibacillus calidus	WP_027724185.1
Oceanobacillus massiliensis	WP_010647294.1	Geobacillus vulcani	WP_031407519.1
Bacillus flexus	WP_061784908.1	Bacillus coagulans	WP_035188982.1
Chloroflexus sp. Y-396-1	WP_028459931.1	Bacillus sp. LK2	WP_048374368.1
Ornithinibacillus californiensis	WP_047983652.1	Kurthia huakuii	WP_029499533.1
Halobacillus	WP_035511377.1	Halalkalibacillus halophilus	WP_027964378.1
Bacillus encimensis	WP_063383670.1	Domibacillus tundrae	WP_052728327.1
Bacillus sp. JS	WP_041521409.1	Бактерия SIT5	WP_062354774.1
Anoxybacillus flavithermus	WP_006320635.1	Planococcus sp. PAMC 21323	WP_038703416.1
Bacillus badius	WP_063441135.1	Geobacillus kaustophilus	WP_044736356.1
Bacillus rubiinfantis	WP_042354695.1	Exiguobacterium	WP_035412678.1
Desulfitibacter alkalitolerans	WP_051534294.1	Streptomyces sp. NRRL S-813	WP_051844821.1
Bacillus sp. RP1137	WP_029319903.1	Kurthia sp. JC8E	WP_010304177.1
Balneola vulgaris	WP_018127710.1	Roseiflexus castenholzii	WP_012122664.1
Bacillus aryabhatai	WP_045295385.1	Bacillus anthracis	WP_000616727.1
Bacillus niameyensis	WP_062109560.1	Bacillus sp. OxB-1	WP_041070670.1
Bacillus sp. FJAT-25547	WP_057761139.1	Halolamina rubra	WP_049981866.1
Bacillus acidiproducens	WP_051086254.1	Bacillus sp. FJAT-27997	WP_049682973.1
Bacillus thermoamylovorans	WP_034768563.1	Salinarchaeum sp. Harcht-Bsk1	WP_020447809.1

Фиг. 14 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Bacillus sp. URHB0009	WP_027322137.1	Bacillus sp. GZT	WP_062923621.1
Halobacillus sp. BAB-2008	WP_008637585.1	Sporosarcina sp. ZBG7A	WP_039044539.1
Bacillus sp. A053	WP_040082038.1	Bacillus sp. UMTAT18	WP_046199487.1
Bacillus sp. UNC41MFS5	WP_026563219.1	Halobacteriaceae archaeon SB9	WP_058581597.1
Bacillus sp. Soil531	WP_057274095.1	Halopiger djelfamassiliensis	WP_049923288.1
Bacillus siamensis	WP_016938462.1	Alicyclobacillus herbarius	WP_051343768.1
Bacillus farraginis	WP_058005647.1	Exiguobacterium indicum	WP_058704972.1
Bacillus subtilis	WP_014477756.1	Natronococcus amylolyticus	WP_005555286.1
Bacillus subterraneus	WP_044395766.1	Lysinibacillus manganicus	WP_036190256.1
Bacillus gobiensis	WP_053603894.1	Exiguobacterium sp. BMC-KP	WP_053452202.1
Paucisalibacillus sp. EB02	WP_042143024.1	Halorubrum sp. BV1	WP_049982315.1
Bacillus amyloliquefaciens	WP_047476771.1	Haloarcula vallismortis	WP_004517947.1
Bacillus sp. SIT10	WP_050616161.1	Halostagnicola sp. A56	WP_050051196.1
Bacillus sp. Root147	WP_057233096.1	Haloarcula japonica	WP_004592792.1
Bacillus koreensis	WP_053400748.1	Streptomyces sp. ATeXAB-D23	WP_018554385.1
Bacillus sp. 278922_107	WP_028411869.1	Alicyclobacillus ferrooxydans	WP_054969223.1
Pontibacillus litoralis	WP_052127216.1	Solirubrobacter sp. URHD0082	WP_051323957.1
Lysinibacillus contaminans	WP_053582362.1	Halorubrum hochstenium	WP_008580740.1
Bacillus sp. JFL15	WP_049627228.1	Haloferax mucosum	WP_008317500.1
Anoxybacillus kamchatkensis	WP_019417289.1	Haloarcula amylolytica	WP_008309243.1
Bacillus sp. FJAT-25496	WP_057772306.1	Exiguobacterium oxidotolerans	WP_029332750.1
Bacillus glycinifermentans	WP_048355295.1	Haloarcula	WP_050038036.1
Bacillus sp. FF4	WP_042460803.1	Exiguobacterium acetylicum	WP_050677396.1
Bacillus sp. SDL11	WP_060964475.1	Haloarcula sp. CBA1127	WP_058995943.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Bacillus atrophaeus	WP_010789607.1	Halopenitus sp. DYS4	WP_058366711.1
Oceanobacillus iheyensis	WP_011066719.1	Halorubrum tebenquichense	WP_006630090.1
Bacillus megaterium	WP_013085283.1	Haladaptatus paucihalophilus	WP_007978613.1
Bacillus sp. Root239	WP_057244921.1	Solirubrobacter soli	WP_028064223.1
Chloroflexus sp. MS-G	WP_031458749.1	Oscillatoriales cyanobacterium MTP1	WP_058883121.1
Anoxybacillus geothermalis	WP_044745973.1	Haloarcula marismortui	WP_011223264.1
Lysinibacillus sinduriensis	WP_036197348.1	Sporosarcina sp. D27	WP_025786354.1
Anoxybacillus	WP_009361645.1	Exiguobacterium sp. Leaf187	WP_055966688.1
Bacillus endophyticus	WP_019391067.1	Haloarcula hispanica	WP_014040312.1
Bacillus cecembensis	WP_057988977.1	Halosimplex carlsbadense	WP_006884453.1
Bacillus vallismortis	WP_061571926.1	Exiguobacterium sp. ZWU0009	WP_047395159.1
Bacillus sp. G1(2015b)	WP_058838176.1	Halorhabdus utahensis	WP_015788577.1
Bacillus sp. NSP9.1	WP_026588395.1	Planococcus halocryophilus	WP_008497280.1
Bacillus sp. FJAT-27231	WP_049663918.1	Бактерия Verrucomicrobia SCGC AAA168-F10	WP_038126170.1
Paucisalibacillus globulus	WP_026906974.1	Exiguobacterium sp. OS-77	WP_035398779.1
Ureibacillus thermosphaericus	WP_016837030.1	Halalkalicoccus jeotgali	WP_008417532.1
Virgibacillus sp. Vm-5	WP_038243188.1	Planococcus donghaensis	WP_008428950.1
Грунна Bacillus subtilis	WP_013390633.1	Halorubrum halophilum	WP_050032715.1
Chloroflexus	WP_012259490.1	Exiguobacterium sibiricum	WP_012369533.1
Bacillus sp. EGD-AK10	WP_021480367.1	Psychrobacillus sp. FJAT-21963	WP_056832867.1
Bacillus kribbensis	WP_035322454.1	Bacillus sp. FJAT-25509	WP_056473274.1
Bacillus sp. REN51N	WP_040056994.1	Halorubrum arcis	WP_007992958.1
Virgibacillus sp. CM-4	WP_021288888.1	Haloarcula sp. SL3	WP_053968146.1
Paenisporosarcina sp. HGH0030	WP_016426536.1	Haloferax mediterranei	WP_004056921.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Bacillus sp. EBO1	WP_043934015.1	Haloarcula argentinensis	WP_005534453.1
Bacillus panaciterrae	WP_028399695.1	Bacillus sp. FJAT-22090	WP_053588542.1
Bacillus sp. 171095_106	WP_028410453.1	Halolamina pelagica	WP_054583766.1
Ornithinibacillus scapharcae	WP_010097123.1	Geobacillus sp. 12AMOR1	WP_047818914.1
Bacillus nakamurai	WP_061520043.1	Microcystis aeruginosa	WP_004163819.1
Jeotgalibacillus campisalis	WP_041060570.1	Halorubrum sp. T3	WP_017343453.1
Bacillus mojavensis	WP_029441396.1	Exiguobacterium sp. NG55	WP_035387788.1
Anoxybacillus suryakundensis	WP_055440175.1	Halorubrum	WP_004598556.1
Bacillus sp. FF3	WP_042474379.1	Exiguobacterium marinum	WP_026826747.1
Bacillus sp. TH008	WP_046130688.1	Halorubrum aidingense	WP_007999743.1
Bacillus sp. AM 13(2015)	WP_059375200.1		
Bacillus pumilus	WP_044142126.1		
Bacillus sp. CMAA 1185	WP_046160765.1		
Bacillus sp. FJAT-18017	WP_053598618.1		
Bacillus firmus	WP_048011096.1		

Фиг. 14 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Pseudomonas	WP_003106950.1	Brevundimonas diminuta	WP_003165630.1
Pseudomonas aeruginosa	WP_023131684.1	Erythrobacter sp. NAP1	WP_007164103.1
Группа Pseudomonas aeruginosa	WP_009877106.1	Erwinia persicina	WP_062742761.1
Microvirgula aerodenitrificans	WP_028498980.1	Leisingera sp. ANG-M1	WP_039168607.1
Комплекс Burkholderia cepacia	WP_006484772.1	Shinella	WP_050742571.1
Burkholderia anthina	WP_059584467.1	Sphingomonas sp. KC8	WP_010125831.1
Burkholderia cenocepacia	WP_060211908.1	Pseudomonas taeanensis	WP_025166189.1
Burkholderia	WP_011547168.1	Caulobacter sp. OV484	WP_047404747.1
Burkholderia pseudomallei	WP_004549567.1	Pseudomonas sp. NBRC 111135	WP_054910491.1
Burkholderia lata	WP_011354276.1	Pseudomonas sp. Leaf15	WP_056858237.1
Burkholderia contaminans	WP_039366337.1	Ruegeria pomeroyi	WP_011047295.1
Burkholderia cepacia	WP_059525391.1	Candidatus Filomicrobium marinum	WP_046475955.1
Burkholderia thailandensis	WP_009897990.1	Ensifer sp. Br816	WP_018234899.1
Burkholderia oklahomensis	WP_010108308.1	Caulobacter	WP_056050097.1
Pseudomonas fluorescens	WP_016979925.1	Rhizobium sp. Leaf341	WP_062692519.1
Pseudomonas sp. 2-92(2010)	WP_028616070.1	Rhizobium	WP_062470505.1
Pseudomonas azotoformans	WP_061436824.1	Ensifer sojae	WP_034859346.1
Pseudomonas sp. FH1	WP_033901146.1	Ruegeria mobilis	WP_005628022.1
Pseudomonas thivervalensis	WP_053121148.1	Sedimentitalea nanhaiensis	WP_027263471.1
Pseudomonas synxantha	WP_057025331.1	Porphyrobacter cryptus	WP_027441928.1
Pseudomonas sp. CHM02	WP_025854584.1	Porphyrobacter sp. AAP60	WP_054117689.1
Pseudomonas mandelii	WP_033056094.1	Ewingella americana	WP_034789690.1
Группа Pseudomonas fluorescens	WP_043050251.1	Chromobacterium vaccinii	WP_046155509.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	WP_014994845.1	<i>Ruminococcus albus</i>	WP_043538032.1
<i>Nitrococcus mobilis</i>	WP_005004372.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	WP_042576834.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 2(2015)	WP_045198124.1	<i>Parvularcula bermudensis</i>	WP_013300785.1
<i>Pseudomonas</i> sp. PH1b	WP_025129887.1	<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	WP_021097656.1
<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 25886	WP_010169498.1	<i>Dechloromonas aromatica</i>	WP_011289796.1
<i>Pseudomonas putida</i>	WP_023535597.1	<i>Variovorax boronicumulans</i>	WP_062477800.1
<i>Pseudomonas helleri</i>	WP_048388689.1	<i>Sphingomonas</i> sp. MM-1	WP_015457563.1
<i>Pseudomonas</i> sp. Os17	WP_060839803.1	<i>Phaeobacter inhibens</i>	WP_061049393.1
<i>Pseudomonas</i> sp. ABAC61	WP_058436409.1	<i>Variovorax</i> sp. Root473	WP_056580651.1
<i>Pseudomonas protegens</i>	WP_041752761.1	<i>Silicibacter</i> sp. TrichCH4B	WP_009177420.1
<i>Pseudomonas</i> sp. St29	WP_060843902.1	<i>Phaeospirillum molischianum</i>	WP_040566020.1
<i>Vibrio</i>	WP_029223919.1	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 26793	WP_017477817.1
<i>Zymobacter palmae</i>	WP_027706238.1	<i>Pseudomonas simiae</i>	WP_047543395.1
<i>Vibrio splendidus</i>	WP_017095663.1	<i>Sinorhizobium arboris</i>	WP_027999396.1
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	WP_022598767.1	<i>Caulobacter</i> sp. AP07	WP_007669693.1
<i>Vibrio vulnificus</i>	WP_011081756.1	<i>Porphyrobacter mercurialis</i>	WP_039096260.1
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	WP_058489588.1	<i>Oceanicola</i> sp. S124	WP_010137633.1
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	WP_054061580.1	<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i>	WP_021478802.1
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	WP_012624972.1	<i>Erythrobacter gangjinensis</i>	WP_047005672.1
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	WP_063364351.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	WP_004131235.1
<i>Pseudomonas entomophila</i>	WP_011533710.1	<i>Labrenzia aggregata</i>	WP_006935802.1
<i>Pseudomonas</i> sp. KG01	WP_048731723.1	<i>Caulobacter</i> sp. K31	WP_012287297.1
<i>Pseudomonas cichorii</i>	WP_025259794.1	<i>Erythrobacter longus</i>	WP_051698842.1
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	WP_043188773.1	<i>Pseudomonas endophytica</i>	WP_055101787.1
<i>Azospirillum lipoferum</i>	WP_014188758.1	<i>Providencia burhodogranariea</i>	WP_008911142.1
<i>Pseudomonas fulva</i>	WP_042556657.1	<i>Caulobacter</i> sp. CCH5-E12	WP_062099535.1
<i>Brenneria</i> sp. EniD312	WP_009114600.1	<i>Ruegeria atlantica</i>	WP_058276921.1

Фиг. 15 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Lonsdalea quercina	WP_026739756.1	Brevundimonas aveniformis	WP_029086159.1
Azospirillum sp. B506	WP_042693433.1	Phaeobacter gallaeciensis	WP_014879244.1
Pseudomonas monteilii	WP_060393461.1	Erythrobacter atlanticus	WP_048885888.1
Pseudomonas syringae	WP_017708113.1	Ensifer sp. USDA 6670	WP_029959387.1
Группа Pseudomonas syringae	WP_005762840.1	Hellea balneolensis	WP_026940740.1
Pseudomonas amygdali	WP_005738477.1	Sinorhizobium meliloti	WP_010968657.1
Pseudomonas savastanoi	WP_019741432.1	Sinorhizobium sp. CCBAU 05631	WP_037425973.1
Группа Pseudomonas syringae, геномовид 3	WP_054091058.1	Ruegeria sp. CECT 5091	WP_058284168.1
Microbulbifer variabilis	WP_020415350.1	Ruegeria sp. ANG-R	WP_039538859.1
Tolypothrix campylonemoides	WP_041041287.1	Caulobacter vibrioides	WP_035017242.1
Nodosilinea nodulosa	WP_017298636.1	Бактерия KLH11, Rhodobacteraceae	WP_008755607.1
Leptolyngbya sp. NIES-2104	WP_059001045.1	Caulobacter segnis	WP_013078409.1
Agrobacterium tumefaciens	WP_035225456.1	Klebsiella	WP_004871378.1
Calothrix sp. PCC 7103	WP_019493169.1	Yersinia	WP_050084882.1
Cellvibrio sp. OA-2007	WP_062064078.1	Pseudomonas libanensis	WP_057012799.1
Scytonema tolypothrichoides	WP_048868701.1	Rhodobacter sp. SW2	WP_008031693.1
Pantoea sp. RIT-PI-b	WP_049853162.1	Labrenzia sp. DG1229	WP_035899651.1
Stanieria cyanosphaera	WP_015195188.1	Ruegeria halocynthiae	WP_037310730.1
Pseudomonas chlororaphis	WP_009049359.1	Pantoea	WP_045815650.1
Runella limosa	WP_028525382.1	Mannheimia varigena	WP_025216860.1
Pedobacter sp. V48	WP_048904841.1	Enterobacteriaceae	WP_049084995.1
Pedobacter sp. PACM 27299	WP_062550966.1	Pseudomonas fragi	WP_016779407.1
Pantoea rodasii	WP_039334894.1	Caulobacter sp. Root655	WP_056724929.1
Crinalium epipsammum	WP_015201559.1	Acidovorax delafieldii	WP_060977469.1
Brenneria goodwinii	WP_048636391.1	Caulobacter henricii	WP_062145109.1
Pseudomonas frederiksbergensis	WP_039591223.1	Sinorhizobium fredii	WP_037432167.1

Фиг. 15 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Snodgrassella alvi</i>	WP_037473754.1	<i>Rhizobium giardinii</i>	WP_018324075.1
<i>Pedobacter</i> sp. R20-19	WP_029287121.1	<i>Porphyrobacter</i> sp. HL-46	WP_036800189.1
<i>Pseudomonas agarici</i>	WP_017133639.1	<i>Erythrobacter marinus</i>	WP_047093931.1
<i>Bradyrhizobium</i>	WP_024580698.1	<i>Altererythrobacter marenensis</i>	WP_047806000.1
<i>Hassallia byssoidea</i>	WP_039743314.1	<i>Kordiimonas gwangyangensis</i>	WP_020399032.1
Симбионт типа E <i>Plautia stali</i>	WP_058962445.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 313	WP_017639561.1
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	WP_046062292.1	<i>Yersinia intermedia</i>	WP_005183468.1
<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	WP_008930023.1	Ensifer	WP_025425846.1
<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	WP_015179369.1	<i>Ruegeria conchae</i>	WP_010442824.1
<i>Microcoleus vaginatus</i>	WP_006635331.1	<i>Paenibacillus zanthoxyli</i>	WP_025690613.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM60	WP_008035544.1	<i>Labrenzia</i> sp. CP4	WP_062491890.1
<i>Pedobacter</i> sp. Hv1	WP_055131283.1	<i>Labrenzia</i>	WP_031269713.1
<i>Serratia plymuthica</i>	WP_006316853.1	<i>Novosphingobium barchaimii</i>	WP_058735897.1
<i>Serratia</i>	WP_037395580.1	<i>Xenophilus azovorans</i>	WP_038209862.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM80	WP_008085601.1	<i>Dysgonomonas capnocytophagoides</i>	WP_026625288.1
<i>Serratia</i> sp. C-1	WP_062789569.1	<i>Caulobacter</i> sp. Root656	WP_057183767.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 45MFCol3.1	WP_019648555.1	<i>Thermopetrobacter</i> sp. TC1	WP_038034810.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM48	WP_007992678.1	<i>Thalassospira lucentensis</i>	WP_022734083.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM18	WP_007937000.1	<i>Arthrobacter</i> sp. H14	WP_026535687.1
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 7509	WP_028954191.1	<i>Brevundimonas abyssalis</i>	WP_021697031.1
<i>Pseudomonas</i> sp. QTF5	WP_030131028.1	<i>Parvularcula oceani</i>	WP_031555700.1
Бактерия UASB14	WP_045505933.1	<i>Blastomonas</i> sp. AAP53	WP_017670274.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM79	WP_008074041.1	<i>Labrenzia alexandrii</i>	WP_055672130.1
<i>Pseudomonas</i> sp. CF161	WP_043230378.1	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	WP_048359292.1
<i>Alcanivorax</i>	WP_063521418.1	Симбионт типа D <i>Plautia stali</i>	WP_058970253.1

Фиг. 15 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Pseudomonas</i> sp. Root329	WP_056741929.1	<i>Erythrobacter</i>	WP_050600626.1
<i>Gilliamella apicola</i>	WP_034883414.1	<i>Paludibacterium yongneupense</i>	WP_051229471.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM49	WP_007993749.1	<i>Caulobacter</i> sp. Root1472	WP_056761772.1
<i>Aquabacterium parvum</i>	WP_058086343.1	<i>Ensifer adhaerens</i>	WP_053248748.1
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	WP_024893728.1	<i>Sphingomonas</i> sp. 35-24ZXX	WP_033923881.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM41(2012)	WP_008154661.1	<i>Achromobacter</i> sp. RTa	WP_043546625.1
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	WP_025213967.1	<i>Pseudorhodobacter wandonensis</i>	WP_050522986.1
<i>Leptolyngbya boryana</i>	WP_017288016.1	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	WP_039203516.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 11/12A	WP_047527806.1	<i>Sphingomonas endophytica</i>	WP_058756259.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM102	WP_007905729.1	<i>Devosia</i> sp. A16	WP_055048936.1
<i>Candidatus Solibacter usitatus</i>	WP_011686428.1	<i>Rhizobium</i> sp. Root483D2	WP_060636130.1
<i>Myxosarcina</i> sp. GI1	WP_036484294.1	<i>Ensifer</i> sp. WSM1721	WP_026622024.1
<i>Alcanivorax</i> sp. 19-m-6	WP_035233016.1	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	WP_034824240.1
<i>Pseudomonas</i> sp. GM50	WP_008008459.1	<i>Cystobacter fuscus</i>	WP_002621816.1
<i>Acaryochloris</i> sp. CCME 5410	WP_010467794.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Y57	WP_047167465.1
<i>Pseudomonas</i> sp. G5(2012)	WP_020800719.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. PC2	WP_046119906.1
<i>Acaryochloris marina</i>	WP_012162817.1	<i>Sphingomonas jaspisi</i>	WP_037503921.1
<i>Pseudoalteromonas</i>	WP_042149186.1	<i>Thalassospira</i> sp. MCCC 1A01148	WP_062953912.1
<i>Pantoea</i> sp. A4	WP_026042421.1	<i>Ensifer</i> sp. TW10	WP_026613300.1
<i>Alcanivorax jadensis</i>	WP_035250216.1	<i>Fulvimarina pelagi</i>	WP_040488894.1
Bacteria	WP_009562838.1	<i>Rhizobium</i> sp. CF097	WP_037119901.1
<i>Pseudomonas</i> sp. RIT-PI-q	WP_059404196.1	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	WP_015937239.1
<i>Serratia grimesii</i>	WP_037426347.1	<i>Devosia</i>	WP_055878182.1
<i>Scytonema millei</i>	WP_039714778.1	<i>Coccidioides immitis</i> RS	XP_001248209.2
<i>Calothrix</i> sp. 336/3	WP_035158367.1	<i>Blastomonas</i> sp. AAP25	WP_054134089.1

Фиг. 15 (продолжение)

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	WP_015152152.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Ag1	WP_046409195.1
beta proteobacterium L13	WP_017510054.1	<i>Oceanicaulis</i> sp. HL-87	WP_036514352.1
<i>Alcanivorax</i> sp. HI0083	WP_063518558.1	<i>Penicillium digitatum</i> Pd1	XP_014534104.1
<i>Pseudopedobacter saltans</i>	WP_013633880.1	<i>Maritalea myrionectae</i>	WP_027835180.1
<i>Pseudomonas gingeri</i>	WP_017124151.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. GL28	WP_058323580.1
<i>Vogesella</i> sp. EB	WP_047967847.1	<i>Erythrobacter</i> sp. SD-21	WP_006832002.1
Бактерия Clostridiales VE202-28	WP_025484850.1	Группа <i>Sinorhizobium</i> /Ensifer	WP_057248140.1
<i>Cellvibrio</i> sp. BR	WP_007642494.1	<i>Afifella pfennigii</i>	WP_051631353.1
<i>Hungatella hathewayi</i>	WP_039892287.1	<i>Croceicoccus naphthovorans</i>	WP_047820461.1
<i>Tatumella</i> sp. UCD-D_suzukii	WP_025903659.1	<i>Arthrobacter nitrophenolicus</i>	WP_035752355.1
<i>Tatumella ptyseos</i>	WP_029990876.1	<i>Sphingomonas</i>	WP_056359867.1
<i>Niabella aurantiaca</i>	WP_018629826.1	<i>Thalassospira</i>	WP_037991166.1
<i>Lachnoclostridium</i>	WP_024296203.1	<i>Anabaena cylindrica</i>	WP_015215725.1
<i>Draconibacterium sediminis</i>	WP_045033031.1	<i>Corynebacterium halotolerans</i>	WP_048742456.1
<i>Desulfovibrio frigidus</i>	WP_031479260.1	Ensifer sp. ZNC0028	WP_043613157.1
<i>Acinetobacter brisouii</i>	WP_004902992.1	<i>Brevundimonas</i> sp. Leaf363	WP_056103760.1
<i>Pseudorhodobacter aquimaris</i>	WP_050528496.1	<i>Serratia fonticola</i>	WP_024485202.1
<i>Rubrobacter aplysiniae</i>	WP_047866623.1	<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i>	WP_061923692.1
<i>Acinetobacter</i> sp. ANC 3789	WP_004749213.1	Alpha Proteobacterium JLT2015	WP_038280972.1
<i>Tatumella morbirosei</i>	WP_038017563.1	<i>Arthrobacter</i> sp. Leaf137	WP_056079511.1
<i>Altererythrobacter troitsensis</i>	WP_057882776.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Root710	WP_056378476.1
<i>Dinoroseobacter shibae</i>	WP_012177956.1	<i>Sphingomonas wittichii</i>	WP_037526704.1
<i>Loktanella vestfoldensis</i>	WP_026352351.1	<i>Corynebacterium freneyi</i>	WP_052054332.1
<i>Sphingopyxis</i>	WP_003044487.1	<i>Sphingomonas</i> sp. SRS2	WP_046195859.1
<i>Acinetobacter</i>	WP_005173592.1	<i>Porphyrobacter</i> sp.	WP_017664013.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
		AAP82	
<i>Sediminimonas qiaohouensis</i>	WP_026756407.1	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i> H97	XP_006455303.1
[<i>Clostridium clariflavum</i>	WP_014254971.1	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	XP_007330894.1
некультивированный <i>Sulfuricurvum</i> sp. RIFRC-1	WP_015653945.1	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	WP_040963667.1
<i>Lysinibacillus macroides</i>	WP_053993407.1	<i>Sphingomonas</i> sp. Leaf231	WP_056631646.1
<i>Dysgonomonas</i> sp. HGC4	WP_050708384.1	<i>Cucumibacter marinus</i>	WP_029039849.1
<i>Leisingera</i> sp. ANG-M7	WP_039183947.1	Alpha <i>Proteobacterium</i> Mf 1.05b.01	WP_029638849.1
<i>Sphingopyxis</i> sp. A083	WP_058811316.1	<i>Brevundimonas</i> sp. Leaf280	WP_055755221.1
<i>Clostridium</i> sp. DL-VIII	WP_009170495.1	<i>Sinorhizobium</i>	WP_011974380.1
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	WP_061774007.1	<i>Arthrobacter enclensis</i>	WP_058267449.1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_004280839.1	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	WP_039817058.1
<i>Leisingera</i>	WP_019294976.1	<i>Citromicrobium</i>	WP_010237878.1
<i>Pantoea anthophila</i>	WP_046102129.1	<i>Rhizobium</i> sp. OK665	WP_037105052.1
<i>Pseudorhodobacter antarcticus</i>	WP_050519835.1	<i>Rhizobium</i> sp. Root482	WP_056330571.1
<i>Kaistia granuli</i>	WP_018185327.1	<i>Litoreibacter arenae</i>	WP_021100138.1
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	WP_051003151.1	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	WP_050420370.1
<i>Aquabacterium</i> sp. NJ1	WP_052162578.1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	WP_058768510.1
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	WP_012824911.1	<i>Erythrobacter litoralis</i>	WP_011414053.1
<i>Dysgonomonas gadei</i>	WP_006801167.1	<i>Oceanicaulis alexandrii</i>	WP_022700009.1
Симбионт типа F <i>Plautia stali</i>	WP_058957646.1	<i>Phaeobacter</i>	WP_040172007.1
<i>Roseibium</i> sp. TrichSKD4	WP_009758811.1		
<i>Leisingera</i> sp. ANG-M6	WP_039194316.1	<i>Labrenzia alba</i>	WP_055675296.1
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>	WP_050629432.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	WP_045164245.1

Микроорганизм	№ доступа в Genbank	Микроорганизм	№ доступа в Genbank
Acinetobacter gernerii	WP_004870294.1	Brevundimonas naejangsanensis	WP_024353237.1
Acinetobacter sp. HR7	WP_034585714.1	Rhizobium sp. Leaf371	WP_062595152.1
Kaistia adipata	WP_029075359.1	Pseudomonas nitroreducens	WP_024762244.1
Pantoea sp. Sc1	WP_009089455.1	Sphingopyxis alaskensis	WP_041383077.1
Sphingopyxis terrae	WP_062902254.1	Phaeosporium fulvum	WP_051185933.1
Bradyrhizobium embrapense	WP_050400635.1	Raoultella ornithinolytica	WP_041145659.1
Raoultella terrigena	WP_045858268.1	Ruegeria sp. TM1040	WP_011539677.1
Sinorhizobium americanum	WP_037378402.1	Shinella sp. DD12	WP_023515461.1
Leisingera sp. ANG-Vp	WP_039134607.1		
Erythrobacter sp. JL475	WP_034954745.1		

Фиг. 15 (продолжение)