

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047810**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.13

(21) Номер заявки
202293167

(22) Дата подачи заявки
2021.06.04

(51) Int. Cl. *C12N 15/74* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12P 7/00 (2006.01)
C12P 5/00 (2006.01)

**(54) МИКРООРГАНИЗМ С НОКИНОМ В ЛОКУСЕ ГЕНА
АЦЕТОЛАКТАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ**

(31) 63/035,739

(32) 2020.06.06

(33) US

(43) 2022.12.29

(86) PCT/US2021/035926

(87) WO 2021/248015 2021.12.09

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

(72) Изобретатель:
Лин Чин (US)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) SIMPSON, S. D. et al., "Development of a Sustainable Green Chemistry Platform for Production of Acetone and Downstream Drop-in Fuel and Commodity Products directly from Biomass Syngas via a Novel Energy Conserving Route in Engineered Acetogenic Bacteria", Final Technical Report: LanzaTech, Inc., 30 March 2019, pp.1-31 pages 7, 13; and figures 2, 3
US-B2-9365868
WO-A1-2017-079724
WO-A1-2015-088643
WO-A2-2019-068011
WO-A2-2015-077290

(57) В настоящем изобретении предложен генетически сконструированный микроорганизм, содержащий нокин ДНК в локусе гена ацетолактатдекарбоксилазы. Замена гена ацетолактатдекарбоксилазы на ДНК, кодирующую один или более нативных или ненативных ферментов, дает определенные преимущества, включая стабильность ферментации и увеличение продукции нативных и ненативных продуктов из газообразных субстратов.

047810

B1

047810
B1

Перекрестная ссылка на смежные заявки

Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 63/035,739, поданной 6 июня 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Государственные права

Настоящее изобретение выполнено при государственной поддержке по заказу с соглашением о действии № DE-EE0007566, заключенным с Министерством энергетики США. Государство имеет определенные права на настоящее раскрытие.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к генетически сконструированным микроорганизмам и применению этих микроорганизмов для ферментативного получения продуктов из субстратов, содержащих диоксид углерода (CO₂), монооксид углерода (CO) и/или водород (H₂).

Предпосылки создания изобретения

Смягчение последствий грядущего изменения климата требует резкого сокращения выбросов парниковых газов (ПГ), например таких, которые образуются при сжигании горючих полезных ископаемых, таких как уголь и нефть. Несмотря на то что экологичных источников топлива и химических веществ в настоящее время недостаточно для существенного замещения нашей зависимости от ископаемого углерода, с недавних пор ферментация газов стала альтернативной платформой для биологической фиксации таких газов, как CO, CO₂ и/или H₂, с превращением их в экологичные виды топлива и химические вещества. В частности, в технологии ферментации газов может использоваться широкий диапазон видов исходного сырья, в том числе газифицированные углеродсодержащие вещества (например, твердые коммунально-бытовые отходы или отходы сельскохозяйственного производства) или промышленные отработанные газы (например, от сталелитейных заводов или нефтеперерабатывающих заводов) для получения этанола, горючего для реактивных двигателей и множества других продуктов. Сама по себе ферментация газов может заменить 30% применения сырой нефти и сократить глобальные выбросы CO₂ на 10%, но, как и в случае любой передовой технологии, необходимо решить множество технических задач, прежде чем этот потенциал будет полностью реализован.

В частности, сохраняется потребность в дополнительных микроорганизмах с улучшенной стабильностью для получения нативных и ненативных продуктов из газообразных субстратов.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен набор графиков, изображающих ферментацию для микроорганизма с нарушенным геном ацетолактатдекарбоксилазы ($\Delta budA$) и нарушенным геном первично-вторичной алкогольдегидрогеназы ($\Delta secAdh$). На верхней панели показана продукция метаболитов (этанола и ацетата). На нижней панели показаны потребление и продукция газа (CO, CO₂ и H₂).

На фиг. 2 представлен набор графиков, изображающих ферментацию для микроорганизма $\Delta budA \Delta secAdh$ с экспрессией ацетонового пути ($thIA$, $ctfAB$, adc) на плазмиде. Ацетоновый путь находится под контролем промотора P_{fer} . На верхней панели показана продукция метаболитов (этанола, ацетата и ацетона). На нижней панели показаны потребление и продукция газа (CO, CO₂ и H₂).

На фиг. 3 представлен набор графиков, изображающих ферментацию для микроорганизма $\Delta secAdh$ с нокином ацетонового пути ($thIA$, $ctfAB$, adc) в локусе гена ацетолактатдекарбоксилазы ($budA$). Ацетоновый путь находится под контролем промотора P_{budA} и промотора P_{fer} . На верхней панели показана продукция метаболитов (этанола, ацетата, ацетона). На нижней панели показаны потребление и продукция газа (CO, CO₂ и H₂).

На фиг. 4 представлен набор графиков, изображающих ферментацию для микроорганизма с нокином ацетонового пути ($thIA$, $ctfAB$, adc) в локусе гена бифункциональной альдегид-алкогольдегидрогеназы ($adhE1+adhE2$) и гена функциональной первично-вторичной алкогольдегидрогеназы ($secAdh$). Первично-вторичная алкогольдегидрогеназа ($secAdh$) превращает ацетон в изопропанол, так что данный штамм продуцирует изопропанол, а не ацетон. Ацетоновый путь находится под контролем промотора $P_{adhE1/E2}$ и промотора P_{fer} . На верхней панели показана продукция метаболитов (этанола, ацетата, ацетона и изопропанола). На нижней панели показаны потребление и продукция газа (CO, CO₂ и H₂).

Подробное описание

Ацетолактатдекарбоксилаза является ключевым этапом в образовании 2,3-бутандиола (2,3-BDO) (Körke, Appl Env Microbiol, 80: 3394-3405, 2014), и было продемонстрировано, что нокаут этого фермента приводит к прекращению продукции 2,3-BDO (WO 2013/115659). В отношении направления потока в сторону других гетерологичных продуктов, таких как ацетон, можно было бы ожидать, что нокаут ацетолактатдекарбоксилазы увеличит продукцию этих гетерологичных продуктов.

Однако авторы изобретения обнаружили, что это не обязательно так. В частности, авторы изобретения обнаружили, что нокин генов, ответственных за продукцию гетерологичных продуктов, в локус ацетолактатдекарбоксилазы является важным фактором для достижения устойчивой ферментации и высоких титров продуктов.

Предложен генетически сконструированный микроорганизм, содержащий нокин ДНК в локусе гена ацетолактатдекарбоксилазы. В одном варианте осуществления ДНК заменяет кодирующий участок гена

ацетолактатдекарбоксилазы либо полностью, либо частично. В одном варианте осуществления ДНК не заменяет промотор ацетолактатдекарбоксилазы.

В одном варианте осуществления ацетолактатдекарбоксилаза имеет активность, определяемую ЕС 4.1.1.5, т.е. (S)-2-гидрокси-2-метил-3-оксобутаноат \leftrightarrow (R)-2-ацетонин + CO₂. В одном варианте осуществления ацетолактатдекарбоксилаза представляет собой budA. В одном варианте осуществления budA содержит SEQ ID NO: 3.

После выполнения нокина микроорганизм обычно не имеет функционального гена ацетолактатдекарбоксилазы, позволяющего микроорганизму экспрессировать ацетолактатдекарбоксилазу, и не продуцирует такие продукты, как 2,3-бутандиол.

В одном варианте осуществления нокин-ДНК кодирует один или более ферментов. В одном варианте осуществления этот (эти) фермент(ы) является (являются) ненативным(и) для микроорганизма, т.е. не присутствует(ют) в микроорганизме в естественных условиях. В одном варианте осуществления этот (эти) фермент(ы) является (являются) нативным(и) для микроорганизма, т.е. присутствует(ют) в микроорганизме в естественных условиях, и в геноме микроорганизма просто добавляют еще одну копию фермента(ов).

В одном варианте осуществления фермент(ы), кодируемый (кодируемые) нокин-ДНК, находится (находятся) под контролем промотора ацетолактатдекарбоксилазы, например P_{budA}. В одном варианте осуществления ДНК содержит промотор, такой как промотор P_{fer}. В одном варианте осуществления фермент(ы) находится (находятся) под контролем как промотора ацетолактатдекарбоксилазы, так и по меньшей мере одного другого промотора. В одном варианте осуществления фермент(ы) находится (находятся) под контролем как P_{budA}, так и P_{fer}.

В одном варианте осуществления ацетоновый путь вводится как нокин в локус гена ацетолактатдекарбоксилазы. Ацетоновый путь может содержать тиолазу, КоА-трансферазу и декарбоксилазу. В одном варианте осуществления декарбоксилаза представляет собой ацетоацетатдекарбоксилазу или альфа-кетоизовалератдекарбоксилазу. Например, ацетоновый путь может содержать thIA, ctfAB, и adc или thIA, ctfAB и kivd. Первично-вторичная алкогольдегидрогеназа, если она имеется, например, secAdh, будет преобразовывать ацетон в изопропанол. Введение прерывающей мутации (например, нокаутной мутации) в ген, кодирующий этот фермент, приведет к продукции ацетона, тогда как экспрессия этого фермента приведет к продукции изопропанола. Соответственно, в зависимости от генетического фона микроорганизма-хозяина введение ацетонового пути приводит к продукции либо ацетона, либо изопропанола. Конструирование микроорганизмов для продукции ацетона и изопропанола описано в WO 2012/115527. Конструирование микроорганизмов с нокаутом активности первично-вторичной алкогольдегидрогеназы описано в WO 2015/085015.

В одном варианте осуществления микроорганизм содержит ацетоновый путь и также содержит прерывающую мутацию в гене первично-вторичной алкогольдегидрогеназы, так что микроорганизм продуцирует ацетон. В одном варианте осуществления микроорганизм содержит ацетоновый путь и также содержит функциональную первично-вторичную алкогольдегидрогеназу, так что микроорганизм продуцирует изопропанол.

Фактически нокин-ДНК может кодировать по существу любой фермент или ферментный путь. Например, фермент(ы), кодируемый (кодируемые) нокин-ДНК, может (могут) обеспечивать продукцию 1-бутанола, бутирата, бутена, бутадиена, метилэтилкетона, этилена, ацетона, изопропанола, липидов, 3-гидроксипропионата, терпенов, изопрена, жирных кислот, 2-бутанола, 1,2-пропандиола, 1-пропанола, 1-гексанола, 1-октанола, хоризматных производных, 3-гидроксипропионата, 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомасляной кислоты, изобутилена, адипиновой кислоты, 1,3-гександиола, 3-метил-2-бутанола, 2-бутен-1-ола, изовалерата, изоамилового спирта или моноэтиленгликоля.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой C1-фиксирующий микроорганизм. В другом варианте осуществления микроорганизм представляет собой микроорганизм Вуда - Льюнгаля. В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой бактерию. В одном варианте осуществления микроорганизм относится к роду, выбранному из Acetobacterium, Alkalibaculum, Blautia, Butyrivacterium, Clostridium, Eubacterium, Moorella, Oxobacter, Sporomusa и Thermoanaerobacter.

Дополнительно предложен способ получения продукта, включающий культивирование микроорганизма в присутствии газообразного субстрата. В одном варианте осуществления газообразный субстрат содержит источник C1-углерода, содержащий CO, CO₂ и/или H₂. В одном варианте осуществления газообразный субстрат содержит синтез-газ или промышленный отработанный газ. В одном варианте осуществления продукт представляет собой 1-бутанол, бутират, бутен, бутадиев, метилэтилкетон, этилен, ацетон, изопропанол, липиды, 3-гидроксипропионат, терпены, изопрен, жирные кислоты, 2-бутанол, 1,2-пропандиол, 1-пропанол, 1-гексанол, 1-октанол, хоризматные производные, 3-гидроксипропионат, 1,3-бутандиол, 2-гидроксиизобутират или 2-гидроксиизомасляную кислоту, изобутилен, адипиновую кислоту, 1,3-гександиол, 3-метил-2-бутанол, 2-бутен-1-ол, изовалерат, изоамиловый спирт или моноэтиленгликоль.

Определения и предпосылки создания изобретения

Если не указано иное, следующие термины, применяемые в данном описании, имеют следующие определения.

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

Подразумевается, что термин "не встречающийся в естественных условиях", применяемый в отношении микроорганизма, означает, что микроорганизм содержит по меньшей мере одну генетическую модификацию, не обнаруживаемую в естественных условиях в штамме базового вида, в том числе в штаммах дикого типа базового вида. Микроорганизмы, не встречающиеся в естественных условиях, как правило, созданы в лаборатории или исследовательском центре.

Термины "генетическая модификация", "генетическое изменение" или "генная инженерия" в широком смысле обозначают воздействие на геном или нуклеиновые кислоты микроорганизма руками человека. Аналогичным образом, термин "генетически модифицированный", "генетически измененный" или "генетически сконструированный" обозначает микроорганизм, содержащий такую генетическую модификацию, генетическое изменение или генетически сконструированный элемент. Эти термины можно применять для дифференциации созданного в лаборатории микроорганизма от микроорганизма, встречающегося в естественных условиях. К способам генетической модификации относится, например, экспрессия гетерологичного гена, вставка или делеция гена или промотора, мутация нуклеиновой кислоты, измененная экспрессия или инактивация гена, ферментная инженерия, направленная эволюция, конструирование на основе существующих знаний, способы случайного мутагенеза, генная перестановка и оптимизация кодонов.

Метаболическая инженерия микроорганизмов, таких как Clostridia, может значительно расширять их способность к продукции многих важных горючих веществ и молекул химических соединений, отличающихся от нативных метаболитов, таких как этанол. Однако до недавнего времени Clostridia считались генетически неподатливыми и поэтому в целом неподходящими для интенсивных исследований в сфере метаболической инженерии. В последние годы был разработан ряд различных способов конструирования генома для Clostridia, включая способы на основе интронов (ClosTron) (Kuehne, Strain Eng: Methods and Protocols, 389-407, 2011), способы аллельного обмена (ACE) (Heap, Nucl Acids Res, 40: e59, 2012; Ng, PLoS One, 8: e56051, 2013), Triple Cross (Liew, Frontiers Microbiol, 7:694, 2016), способы, опосредованные I-SceI (Zhang, Journal Microbiol Methods, 108: 49-60, 2015), MazF (Al-Hinai, Appl Environ Microbiol, 78: 8112-8121, 2012) или другие (Argyros, Appl Environ Microbiol, 77: 8288-8294, 2011), Cre-Lox (Ueki, mBio, 5: e01636-01614, 2014) и CRISPR/Cas9 (Nagaraju, Biotechnol Biofuels, 9: 219, 2016). Однако по-прежнему очень важной задачей остается возможность итеративного внесения более чем нескольких генетических изменений по причине медленной и трудоемкой реализации цикла и ограничений на возможность перенесения таких генетических методик на другие виды. Более того, метаболизм C1 у Clostridia еще недостаточно изучен, чтобы можно было надежно прогнозировать модификации, которые будут максимально увеличивать поглощение, конверсию C1 и изменения углерода/энергии/окислительно-восстановительного потенциала при синтезе продукта. Соответственно, введение целевых сигнальных путей в Clostridia остается кропотливым и трудоемким процессом.

Термин "рекомбинантный" указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм является продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. По существу термин "рекомбинантный" обозначает нуклеиновую кислоту, белок или микроорганизм, который содержит или закодирован генетическим материалом, полученным из множества источников, например, из двух или более разных штаммов или видов микроорганизмов.

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

Термин "эндогенный" обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который присутствует или экспрессируется в микроорганизме дикого типа или родителем микроорганизме, из которого получен микроорганизм по изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который нативно

присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по изобретению. В одном варианте осуществления экспрессией эндогенного гена можно управлять с помощью экзогенного регуляторного элемента, такого как экзогенный промотор.

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

Термин "гетерологичный" обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который не присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по изобретению. Например, гетерологичный ген или фермент может быть получен из другого штамма или вида и введен в микроорганизм по изобретению или экспрессирован в нем. Гетерологичный ген или фермент может быть введен в микроорганизм по изобретению или экспрессирован в нем в форме, в которой он встречается в других штаммах или видах. Альтернативно гетерологичный ген или фермент может быть некоторым образом модифицирован, например, посредством оптимизации его кодонов для экспрессии в микроорганизме по изобретению или посредством инженерии с изменением его функции, например с изменением направления активности фермента или изменением субстратной специфичности.

Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" применяются взаимозаменяемо. Они могут обозначать полимерную форму нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов, или их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены не имеющие ограничительного характера примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определяемые при анализе сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (киРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная РНК с любой последовательностью, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или более модифицированных нуклеотидов, например, метилированных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов. При необходимости перед или после сборки полимера в нуклеотидной структуре могут быть выполнены модификации. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, посредством конъюгации с метящим компонентом.

В настоящем документе термин "экспрессия" обозначает процесс, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт), и/или процесс, посредством которого транскрибированная мРНК последовательно транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и закодированные полипептиды могут совместно называться "генными продуктами".

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" в настоящем документе применяются взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться кислотами, не относящимися к аминокислотам. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, это может быть образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция, такая как конъюгация с метящим компонентом. В настоящем документе к термину "аминокислота" относятся природные и/или не встречающиеся в природе или синтетические аминокислоты, в том числе глицин и D- или L-оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

Термин "ферментативная активность" или просто "активность" в широком смысле обозначает ферментную активность, включая, без ограничений, активность фермента, количество фермента или доступность фермента для катализования реакции. Таким образом, к термину "увеличение" ферментативной активности относится увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или повышение доступности фермента для катализования реакции. Аналогичным образом, к термину "уменьшение" ферментативной активности относится уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента для катализования реакции.

Термин "мутированный" обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который был модифицирован в микроорганизме по изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или родительским микроорганизмом, из которого получен микроорганизм по изобретению. В одном варианте осуществления мутация может представлять собой делецию, вставку или замену в гене, кодирующем фермент. В другом варианте осуществления мутация может представлять собой делецию, вставку или замену одной или более аминокислот в ферменте.

В частности, термин "прерывающая мутация" обозначает мутацию, которая уменьшает или устраняет (т.е. "прерывает") экспрессию или активность гена или фермента. Прерывающая мутация может частично деактивировать, полностью деактивировать или удалить ген или фермент. Прерывающая мутация может представлять собой любую мутацию, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, получаемого с помощью фермента. Прерывающая мутация может представлять собой нокаут-мутацию (КО). Прерывание также может представлять собой нокаун-мутацию (KD), снижающую, но не полностью устраняющую экспрессию или активность гена, белка или фермента. Несмотря на то что КО-мутации по существу эффективны для увеличения выхода продукта, иногда они приводят к ухудшениям в виде дефектов роста или генетических нестабильностей, которые перевешивают преимущества, в особенности для продуктов, не связанных с ростом. К прерывающей мутации может относиться, например, мутация в гене, кодирующем фермент, мутация в генетическом регуляторном элементе, вовлеченном в экспрессию гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, уменьшающий или ингибирующий активность фермента, или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, мРНК, CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Прерывающая мутация может быть внесена с применением любого известного в данной области способа.

Введение прерывающей мутации приводит к получению микроорганизма по изобретению, который продуцирует нецелевой продукт или по существу нецелевой продукт, или сниженное количество целевого продукта по сравнению с родительским микроорганизмом, из которого получен микроорганизм по изобретению. Например, микроорганизм по изобретению может не продуцировать целевой продукт или продуцировать по меньшей мере на примерно 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% меньше целевого продукта, чем родительский микроорганизм. Например, микроорганизм по изобретению может продуцировать менее примерно 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 или 1,0 г/л целевого продукта.

Термин "нокин" относится к способу генетического конструирования, который включает замену ДНК в генетическом локусе или вставку новой ДНК в генетический локус. Часто нокин замещает ген одним или более другими генами. Например, ген ацетолактатдекарбоксилазы (*budA*) может быть полностью или частично заменен одним или более другими генами. В одном варианте осуществления заменяют только кодирующий участок гена. В другом варианте осуществления заменяют весь оперон гена, включая любые промоторные области.

Термин "оптимизация кодонов" обозначает мутацию нуклеиновой кислоты, например гена, для оптимизированной или улучшенной трансляции нуклеиновой кислоты у конкретного штамма или вида. Оптимизация кодонов может приводить к увеличенным значениям скорости трансляции или к более высокой точности трансляции. В предпочтительном варианте осуществления гены по изобретению содержат оптимизацию кодонов для экспрессии в *Clostridium*, в частности в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления гены по изобретению подвергают оптимизации кодонов для экспрессии в *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, депонированном в DSMZ под регистрационным номером DSM23693.

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

К термину "варианты" относятся нуклеиновые кислоты и белки, в которых последовательность отличается от последовательности базовой нуклеиновой кислоты и белка, например, последовательности базовой нуклеиновой кислоты и белка, раскрытой на предшествующем уровне техники или приведенной в качестве примера в настоящем документе. Изобретение может быть реализовано на практике с применением вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по существу ту же функцию, что и базовая нуклеиновая кислота или белок. Например, вариант белка может выполнять по существу ту же функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и базовый белок. Вариант гена может кодировать тот же или по существу тот же белок, что и базовый ген. Вариант промотора может обладать по существу такой же способностью стимулировать экспрессию одного или более генов, что и базовый промотор.

Такие нуклеиновые кислоты или белки в настоящем документе могут называться "функционально эквивалентными вариантами". В качестве примера, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и т.п. Гомологичные гены из других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. К ним относятся гомологичные гены у таких видов, как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробная информация о которых находится в свободном доступе на таких вебсайтах, как Genbank или NCBI. К функционально эквивалентным вариантам также относятся нуклеиновые кислоты, последовательность которых изменяется в результате оптимиза-

ции кодонов для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно имеет идентичность последовательности нуклеиновой кислоты (процент гомологии) с базовой нуклеиновой кислотой по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно имеет аминокислотную идентичность (процент гомологии) с базовым белком по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с применением любого способа, известного в данной области.

Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм по изобретению с применением любого известного в данной области способа. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде чистых нуклеиновых кислот или могут быть составлены смеси с одним или более агентами, такими как липосомы. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК или их комбинации, по мере необходимости. В определенных вариантах осуществления могут применяться ингибиторы рестрикции. Дополнительные векторы могут включать плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм по изобретению с применением плазмиды. Например, преобразование (в том числе трансдукция или трансфекция) может быть достигнуто посредством электропорации, ультразвуковой обработки, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, химической или естественной компетенции, трансформации протопластов, профаговой индукции или конъюгации. В определенных вариантах осуществления с активными системами рестрикционных ферментов может существовать необходимость в метилировании нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

Более того, нуклеиновые кислоты могут быть разработаны так, что они содержат регуляторный элемент, например промотор, для увеличения или управления экспрессией конкретной нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой конститутивный промотор или индуцируемый промотор. В идеале промотор представляет собой промотор пути Вуда - Льюнгаля, промотор ферредоксина, промотор пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона комплекса Rnf, промотор оперона АТФ-синтазы или промотор оперона фосфотрансацетилазы/ацетаткиназы.

Термин "микроорганизм" обозначает микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или грибок. Микроорганизм по изобретению, как правило, представляет собой бактерию. Следует понимать, что в настоящем документе термин "микроорганизм" охватывает значение термина "бактерия".

Термин "родительский микроорганизм" обозначает микроорганизм, применяемый для создания микроорганизма по изобретению. Родительский микроорганизм может представлять собой микроорганизм, встречающийся в естественных условиях (т.е. микроорганизм дикого типа), или микроорганизм, который был ранее модифицирован (т.е. мутантный или рекомбинантный микроорганизм). Микроорганизм по изобретению может быть модифицирован с возможностью экспрессии или сверхэкспрессии одного или более ферментов, которые не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в родительском микроорганизме. Аналогичным образом, микроорганизм по изобретению может быть модифицирован так, что он содержит один или более генов, которые не содержались в родительском микроорганизме. Микроорганизм по изобретению также может быть модифицирован так, чтобы не экспрессировать или экспрессировать меньшие количества одного или более ферментов, которые экспрессировались в родительском микроорганизме. В одном варианте осуществления родительский микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В предпочтительном варианте осуществления родительский микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который был депонирован 7 июня 2010 г. в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ)), расположенной по адресу Inhoffenstraße 7B, D-38124 Braunschweig, Германия, в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и имеет регистрационный номер DSM23693. Этот штамм описан в международной заявке на патент № PCT/NZ 2011/000144, опубликованной как WO 2012/015317.

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

Микроорганизм по изобретению можно дополнительно классифицировать на основании функциональных характеристик. Например, микроорганизм по изобретению может представлять собой C1-фиксирующий микроорганизм, анаэроб, ацетоген, этанологен, карбоксидотроф и/или метанотроф или

может быть получен из них. В табл. 1 представлен иллюстративный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

	Вуд — Льюндал	C1-	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Автотроф	Карбоксидотроф
<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, а не из газа

² Не проводили исследования того, можно ли вырастить *Clostridium magnum* на CO

³ Сообщали, что один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, производит этанол из газа

⁴ Не проводили исследования того, можно ли вырастить *Sporomusa ovata* на CO

⁵ Не проводили исследования того, можно ли вырастить *Sporomusa silvacetica* на CO

⁶ Не проводили исследования того, можно ли вырастить *Sporomusa sphaeroides* на CO

"Метаболический путь Вуда - Льюнгаля" относится к пути Вуда - Льюнгаля для фиксации углерода, описанному, например, в Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008. Термины "микроорганизмы Вуда - Льюнгаля" относятся, как и следовало ожидать, к микроорганизмам, использующим путь Вуда - Льюнгаля. По существу микроорганизм по изобретению содержит нативный путь Вуда - Льюнгаля. В настоящем документе путь Вуда - Льюнгаля может представлять собой нативный немодифицированный путь Вуда - Льюнгаля или может представлять собой путь Вуда - Льюнгаля с некоторой степенью генетической модификации (например, сверхэкспрессией, гетерологичной экспрессией, нокаутом и т.д.) при условии, что он продолжает использоваться для преобразования CO, CO₂ и/или H₂ в ацетил-КоА.

Термин "C1" обозначает молекулу, содержащую один атом углерода, например, CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. Термин "C1-оксигенат" обозначает молекулу, содержащую один атом углерода, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. Термин "источник C1-углерода" обозначает молекулу, содержащую один атом углерода, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма по изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать одно или более из CO, CO₂, CH₄, CH₃OH, или CH₂O₂. Предпочтительно источник C1-углерода содержит одно или оба из CO и CO₂. Термин "C1-фиксирующий микроорганизм" обозначает микроорганизм, способный продуцировать один или более продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм по изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. В предпочтительном варианте осуществления микроорганизм по изобретению получают из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в табл. 1.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Если содержание кислорода превышает определенный порог, анаэроб может отреагировать отрицательно или даже погибнуть. Однако некоторые анаэробы способны переносить низкие уровни кислорода (например, 0,00001-5% кислорода). Как правило, микроорганизм по изобретению представляет собой анаэроб. В предпочтительном варианте осуществления микроорганизм по изобретению получают из анаэроба, приведенного в табл. 1.

Термин "ацетогены" обозначает облигатно-анаэробные бактерии, которые используют путь Вуда - Льюнгаля в качестве основного механизма для сохранения энергии и синтеза ацетил-КоА продуктов и производных от ацетил-КоА продуктов, например, ацетата (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). В частности, ацетогены используют путь Вуда - Льюнгаля в качестве (1) механизма для восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO₂, (2) терминального электроноакцепторного энергосберегающего процесса, (3) механизма для фиксации (ассимиляции) CO₂ при синтезе клеточного углерода (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все ацетогены, встречающиеся в естественных условиях, являются C1-фиксирующими анаэробными автотрофными и неметанотрофными. Как правило, микроорганизм по изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте осуществления микроорганизм по изобретению получают из ацетогена, приведенного в табл. 1.

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

"Автотроф" представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют источники неорганического углерода, например, CO и/или CO₂. Как правило, микроорганизм по изобретению представляет собой автотроф. В предпочтительном варианте осуществления микроорганизм по изобретению получают из автотрофа, приведенного в табл. 1.

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

"Метанотроф" представляет собой микроорганизм, способный потреблять метан в качестве единственного источника углерода и энергии. В определенных вариантах осуществления микроорганизм по изобретению представляет собой метанотроф или получен из метанотрофа. В других вариантах осуществления микроорганизм по изобретению не является метанотрофом или не получен из метанотрофа.

В более широком смысле микроорганизм по изобретению может быть получен из микроорганизма любого рода или вида, приведенного в табл. 1. Например, микроорганизм может быть представителем рода, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*. В частности, микроорганизм может быть получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostrid-*

ium formicoaceticum, Clostridium ljungdahlii, Clostridium magnum, Clostridium ragsdalei, Clostridium scatologenes, Eubacterium limosum, Moorella thermoautotrophica, Moorella thermoacetica, Oxobacter pfnennigii, Sporomusa ovata, Sporomusa silvacetica, Sporomusa sphaeroides и Thermoanaerobacter kivui.

В предпочтительном варианте осуществления микроорганизм по изобретению получают из кластера Clostridia, включающего виды Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii и Clostridium ragsdalei. Эти виды были впервые описаны и охарактеризованы в 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).

Эти три вида имеют множество сходств. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими анаэробными ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода Clostridium. Эти виды обладают аналогичными генотипами и фенотипами, способами сохранения энергии и ферментативным метаболизмом. Более того, эти виды объединены в кластер гомологичной группы I кластридиальной рРНК, содержащий 16S рРНК ДНК, которая идентична более чем на 99%, содержание G+C в ДНК составляет примерно 22 мол.%-30 мол.%, они грамположительны, характеризуются подобной морфологией и размером (размер логарифмически растущих клеток находится в интервале между 0,5-0,7×3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальный рост при температуре 30°C-37°C), характеризуются подобными диапазонами pH примерно 4-7,5 (при оптимальном значении pH примерно 5,5-6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию посредством комплекса Rnf. Кроме того, как было показано, у этих видов происходит восстановление карбоновых кислот с образованием их соответствующих спиртов (Perez, Biotechnol Bioeng, 110:1066-1077, 2012). Важно отметить, что все эти виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на CO-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации и при определенных условиях образуют небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты.

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

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

Микроорганизм по изобретению также может быть получен из 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), LZ1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693) (WO 2012/015317). Изоляты и мутанты Clostridium ljungdahlii включают ATCC 49587 (Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (US 5,593,886), C-01 (ATCC 55988) (US 6,368,819), 0-52 (ATCC 55989) (US 6,368,819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using Clostridium ljungdahlii, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). К изолятам и мутантам Clostridium ragsdalei относится PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Термин "субстрат" обозначает источник углерода и/или источник энергии для микроорганизма по изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например CO, CO₂ и/или CH₄. Предпочтительно субстрат содержит источник C1-углерода в виде CO или CO+CO₂. Субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, такие как H₂, N₂ или электроны.

По существу субстрат содержит по меньшей мере некоторое количество CO, например, примерно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% CO. Субстрат может содержать CO в диапазоне, например, приблизительно 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% CO. Предпочтительно субстрат содержит примерно 40-70 мол.% CO (например, газ со сталелитейных заводов или доменный газ), примерно 20-30 мол.% CO (например, газ из кислородного конвертера) или примерно 15-45 мол.% CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах осуществления субстрат может содержать относительно низкое количество CO, например, примерно 1-10 мол.% или 1-20 мол.% CO. Микроорганизм по изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть CO в субстрате в продукт. В некоторых вариантах осуществления субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол.% CO).

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

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

Хотя, как правило, субстрат является газообразным, он также может быть представлен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO -содержащим газом, с применением генератора микропузырьковой дисперсии. В качестве еще одного примера субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

Субстрат и/или источник $C1$ -углерода может представлять собой отработанный газ, полученный в виде побочного продукта промышленного процесса или поступающий из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей или процесса газификации биомассы. В определенных вариантах осуществления промышленный процесс выбран из группы, состоящей из черной металлургии, например, сталелитейного производства, цветной металлургии, нефтепереработки, газификации угля, производства электроэнергии, производства чистого углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В этих вариантах осуществления субстрат и/или источник $C1$ -углерода можно улавливать из промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу, применяя любой подходящий способ.

Субстрат и/или источник $C1$ -углерода может представлять собой синтез-газ, например, синтез-газ, полученный при газификации угля или из остатков нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте осуществления синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

Композиция субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может снижать эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от композиции субстрата может быть желательна обработка, очистка или фильтрация субстрата для удаления любых нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или частицы пыли, и/или для увеличения концентрации желательных компонентов.

В определенных вариантах осуществления ферментацию проводят в отсутствие углеводных субстратов, таких как сахар, крахмал, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза.

Микроорганизм по изобретению может быть культивирован с потоком газа с получением одного или более продуктов. Например, микроорганизм по изобретению может продуцировать или может быть сконструирован с возможностью продуцирования этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), 1-бутанола (WO 2008/115080, WO 2012/053905 и WO 2017/066498), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342 и WO 2016/094334), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиина (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанола) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), терпенов, в том числе изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/036152), 1-пропанола (WO 2017/066498), 1-гексанола (WO 2017/066498), 1-октанола (WO 2017/066498), хоризматных производных (WO 2016/191625), 3-гидроксибутирата (WO 2017/066498), 1,3-бутандиола (WO 2017/066498), 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомаляной кислоты (WO 2017/066498), изобутилена (WO 2017/066498), адипиновой кислоты (WO 2017/066498), 1,3-гександиола (WO 2017/066498), 3-метил-2-бутанола (WO 2017/066498), 2-бутен-1-ола (WO 2017/066498), изовалерата (WO 2017/066498), изоамилового спирта (WO 2017/066498) и моноэтиленгликоля (WO 2019/126400). В определенных вариантах осуществления микробную биомассу саму по себе можно рассматривать в качестве продукта. Эти продукты можно дополнительно подвергать преобразованию с получением по меньшей мере одного компонента дизельного топлива, реактивного топлива и/или бензина. Кроме того, микробную биомассу можно подвергать последующей переработке с получением белка одноклеточных (SCP).

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

Термин "селективность" обозначает отношение объемов продуцирования целевого продукта к продуцированию всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом. Микроорганизм по изобретению может быть сконструирован с возможностью получения продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В одном варианте осуществления целевой продукт состав-

ляет по меньшей мере примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по изобретению. В одном варианте осуществления целевой продукт составляет по меньшей мере 10% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по изобретению, в результате чего микроорганизм по изобретению характеризуется селективностью по целевому продукту, составляющей по меньшей мере 10%. В другом варианте осуществления целевой продукт составляет по меньшей мере 30% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по изобретению, так что микроорганизм по изобретению характеризуется селективностью по целевому продукту, составляющей по меньшей мере 30%.

Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин "биореактор" включает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или более сосудов, башен или трубопроводов, таких как проточный реактор с непрерывным перемешиванием (CSTR), реактор с иммобилизованными клетками (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажная колонна, газлифтный ферментер, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, приемлемое для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах осуществления биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Субстрат можно подавать в один или оба из этих реакторов. В настоящем документе термины "культивирование" и "ферментация" применяются взаимозаменяемо. Эти термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

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

Желательно, чтобы культивирование/ферментация проводились в соответствующих условиях для продуцирования целевого продукта. Как правило, культивирование/ферментацию проводят в анаэробных условиях. Условия реакции, которые следует учитывать, включают давление (или парциальное давление), температуру, скорость газового потока, скорость потока жидкости, pH среды, восстановительно-окислительный потенциал среды, скорость перемешивания (при применении проточного реактора с непрерывным перемешиванием), уровень посевного материала, максимальные концентрации газового субстрата, обеспечивающие, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, а также максимальные концентрации продукта для предотвращения ингибирования продукта.

Один вариант осуществления представляет собой генетически сконструированный микроорганизм, содержащий нокин-ДНК в локусе гена ацетолактатдекарбоксилазы.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем ДНК заменяет собой кодирующий участок гена ацетолактатдекарбоксилазы.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем ДНК не заменяет промотор ацетолактатдекарбоксилазы.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм не продуцирует 2,3-бутандиол.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем ДНК кодирует один или более ферментов.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем один или более ферментов являются ненативными для микроорганизма.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем один или более ферментов являются нативными для микроорганизма.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем один или более ферментов находятся под контролем промотора ацетолактатдекарбоксилазы.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем ДНК содержит промотор.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем один или более ферментов находятся под контролем как промотора ацетолактатдекарбоксилазы, так и по меньшей мере одного другого промотора.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем один или более ферментов включают тиолазу, КоА-трансферазу и декарбоксилазу, выбранную из ацетоацетатдекарбоксилазы или альфа-кетоизовалератдекарбоксилазы.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм продуцирует один или более из ацетона и изопропанола.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм дополнительно содержит прерывающую мутацию в гене первично-вторичной алкогольдегидрогеназы.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем один или более ферментов обеспечивают продукцию 1-бутанола, бутирата, бутена, бутадиена, метилэтилкетона, этилена, ацетона, изопропанола, липидов, 3-гидроксипропионата, терпенов, изопрена, жирных кислот, 2-бутанола, 1,2-пропандиола, 1-пропанола, 1-гексанола, 1-октанола, хоризматных производных, 3-гидроксибутирата, 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомасляной кислоты, изобутилена, адипиновой кислоты, 1,3-гександиола, 3-метил-2-бутанола, 2-бутен-1-ола, изовалерата, изоамилового спирта или моноэтиленгликоля.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм представляет собой C1-

фиксирующий микроорганизм.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм представляет собой микроорганизм Вуда - Льюнгадала.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм представляет собой бактерию.

Микроорганизм по варианту осуществления, причем микроорганизм является представителем рода, выбранного из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyrifacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*.

Один вариант осуществления представляет собой способ получения продукта, включающий культивирование микроорганизма по п.1 в присутствии газообразного субстрата.

Способ по варианту осуществления, в котором газообразный субстрат содержит источник C1-углерода, содержащий CO, CO₂ и/или H₂.

Способ по варианту осуществления, причем газообразный субстрат содержит синтез-газ или промышленный отработанный газ.

Способ по варианту осуществления, причем продукт представляет собой 1-бутанол, бутират, бутен, бутадиев, метилэтилкетон, этилен, ацетон, изопропанол, липиды, 3-гидроксипропионат, терпены, изопрен, жирные кислоты, 2-бутанол, 1,2-пропандиол, 1-пропанол, 1-гексанол, 1-октанол, хоризматные производные, 3-гидроксипропионат, 1,3-бутандиол, 2-гидроксиизобутират или 2-гидроксиизомаляновую кислоту, изобутилен, адипиновую кислоту, 1,3-гександиол, 3-метил-2-бутанол, 2-бутен-1-ол, изовалерат, изоамиловый спирт или моноэтиленгликоль.

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, разумеется, никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие его сущность.

Пример 1.

В этом примере описан микроорганизм Δ*budA*Δ*secAdh*.

Ацетолактатдекарбоксилаза является ключевым этапом в образовании 2,3-бутандиола (2,3-BDO) (Körke, Appl Env Microbiol, 80: 3394-3405, 2014), и было продемонстрировано, что нокаут этого фермента приводит к прекращению продукции 2,3-BDO (WO 2013/115659). В отношении направления потока в сторону других гетерологичных продуктов, таких как ацетон, можно было ожидать, что нокаут соответствующего гена *budA* увеличит продукцию.

Нокаут *budA* в штамме *C. Autoethanogenum*, который уже содержал нокаут гена первично-вторичной алкогольдегидрогеназы (Δ*secAdh*) (WO 2015/085015), позволил получить штамм Δ*budA*Δ*secAdh*. Нокаут *budA* проводили так, как описано ранее (WO 2013/115659).

Отдельные колонии выделяли и повторно засеивали штрихами на подходящие свежие селекционные планшеты, а затем подвергали скринингу на события двойного кроссовера. Для событий двойного кроссовера с правильным размером ПЦР-продукта проводили повторный штриховой посев для проверки утраты плазмиды. Правильные колонии собирали в жидкую среду и готовили замороженные маточные растворы. Генотип подтверждали посредством полногеномного секвенирования, а фенотип проверяли путем исследований роста и прогонов в проточном реакторе с непрерывным перемешиванием (CSTR). Как показано на фиг. 1, наблюдали колебания продукции метаболитов и потребления/продукции газа.

Пример 2.

В этом примере описан микроорганизм Δ*budA*Δ*secAdh*, экспрессирующий ацетоновый путь (*thIA*, *ctfAB*, *adc*) из плазмиды.

Микроорганизм Δ*budA*Δ*secAdh* из примера 1 дополнительно модифицировали введением плазмиды, содержащей ацетоновый путь (*thIA*, *ctfAB*, *adc*). Этот штамм продуцирует меньше ацетона, чем родительский штамм Δ*secAdh*, таким же путем и в тех же условиях культивирования, но без нокаута *budA*. Это неожиданно, поскольку можно было ожидать, что нокаут *budA* перенаправит поток углерода от 2,3-BDO к другим метаболитам, таким как ацетон и/или этанол.

Более того, этот штамм плохо рос или не демонстрировал стабильной продукции ацетона в CSTR с газовой смесью: 50% CO 10% H₂, 30% CO₂, остальное -N₂ (фиг. 2). Опять же, при росте наблюдали колебательный характер: пики и спады в продукции, потреблении CO и водорода в координации со спадами и пиками продукции ацетата и CO₂.

Пример 3.

В этом примере описан микроорганизм Δ*secAdh* с нокином ацетонового пути (*thIA*, *ctfAB*, *adc*) в локусе гена ацетолактатдекарбоксилазы (*budA*).

Плазмиду KI/KO для нокина ацетонового пути в локус *budA* конструировали с использованием плазмиды *budA* KO в качестве основы, и ацетоновый путь вставляли между 5'- и 3'-гомологичными плечами *budA* KO плазмиды *budA* KO. Ацетоновый путь содержал *thIA*, *ctfAB* и *adc* под контролем промотора P_{fer}. Полная плазида KI/KO была собрана с применением набора GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit (ThermoFisher Scientific). Правильные плазмиды KI/KO отбирали ПЦР-скринингом и подтверждали секвенированием.

Процесс получения KI-мутанта был такой же, как описано ранее при конструировании штамма бу-

dA KO, с получением штамма Δ budA Δ secAdh с введенным в локус budA ацетоновым путем. Проводили ПЦР-скрининг и колонии с правильным размером ПЦР-продукта выращивали, выделяли геномную ДНК и подвергали полногеномному секвенированию ДНК для подтверждения генотипа.

Штамм культивировали в CSTR с газовой смесью: 50% CO 10% H₂, 30% CO₂, остальное - N₂. Штамм рос хорошо и давал высокие уровни ацетона (фиг. 3).

Пример 4.

В этом сравнительном примере описан микроорганизм с функциональной первично-вторичной алкогольдегидрогеназой (secAdh) и нокином ацетонового пути (thIA, ctfAB, adc) в локусе гена бифункциональной альдегид-алкогольдегидрогеназы (adhE1+adhE2). Первично-вторичная алкогольдегидрогеназа (secAdh) превращает ацетон в изопропанол, так что данный штамм продуцирует изопропанол, а не ацетон.

Ацетоновый путь вставляли в локус adhE1+adhE2, используя стадии, аналогичные описанным выше. Гомологические плечи амплифицировали посредством ПЦР и генотип подтверждали посредством секвенирования.

Штамм плохо рос в CSTR и не имел хорошей продукции изопропанола или этанола (фиг. 4). Потребовалось примерно 6 дней в реакторе, чтобы получить достаточную биомассу клеток для достижения заметной продукции этанола и изопропанола. Ферментация не была стабильной в течение двух недель эксперимента. Соответственно, нокин в локусе adhE1+adhE2 не дает те же преимущества, что и нокин в локусе budA.

Пример 5.

В этом примере описана интеграция других генов или путей в локус budA.

Уже были сконструированы микроорганизмы Вуда - Льюнгаля с возможностью продукции разнообразных ненативных продуктов, в том числе 1-бутанола (WO 2008/115080, WO 2012/053905 и WO 2017/066498), бутирата (WO 2008/115080), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанола) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), терпенов, в том числе изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/036152), 1-пропанола (WO 2017/066498), 1-гексанола (WO 2017/066498), 1-октанола (WO 2017/066498), хоризматных производных (WO 2016/191625), 3-гидроксибутирата (WO 2017/066498), 1,3-бутандиола (WO 2017/066498), 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомасляной кислоты (WO 2017/066498), изобутилена (WO 2017/066498), адипиновой кислоты (WO 2017/066498), 1,3-гександиола (WO 2017/066498), 3-метил-2-бутанола (WO 2017/066498), 2-бутен-1-ола (WO 2017/066498), изовалерата (WO 2017/066498), изоамилового спирта (WO 2017/066498) и моноэтиленгликоля (WO 2019/126400). Любой из этих генов или путей может быть введен путем нокина в локус budA для получения штамма с улучшенными характеристиками.

В одном варианте осуществления нокин-ДНК кодирует 3-гидроксибутиратный путь, содержащий, например, thIA и hbd. В одном варианте осуществления нокин-ДНК кодирует альтернативный 3-гидроксибутиратный путь, содержащий, например, thIA, ctfAB и hbd. В одном варианте осуществления нокин-ДНК кодирует бутаноловый путь, содержащий, например, thIA, hbd, bcd и etfAB. В одном варианте осуществления нокин-ДНК содержит мевалонатный путь, содержащий, например, thIA, HMGS и HMGR. Эти пути могут находиться под контролем одного или более промоторов, например, P_{budA} и/или P_{fer}.

Все ссылки, в том числе публикации, патентные заявки и патенты, указанные в настоящем документе, настоящим включены в него путем ссылки в той же мере, как если бы было отдельно и конкретно указано, что каждая ссылка полностью включена и изложена в настоящем документе путем ссылки. Упоминание какого-либо предшествующего уровня техники в данном описании не является и не должно восприниматься как подтверждение того, что такой предшествующий уровень техники составляет часть общедоступных сведений в области науки в любой стране.

Применение терминов в единственном числе в контексте описания изобретения (в особенности в контексте приведенной ниже формулы изобретения) должно толковаться как распространяющееся как на единственное, так и на множественное число, если в настоящем документе не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Если не указано иное, термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "вмещающий" следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е. имеющие значение "включающий, без ограничений"). Термин "по существу состоящий из" ограничивает объем композиции, процесса или способа указанными материалами или этапами, или тем, что не оказывает существенного влияния на основные и новые характеристики композиции, процесса или способа. Следует понимать, что применение альтернативного варианта (например, "или") означает одну, обе или любую их комбинацию альтернативных вариантов. Если не указано иное, в настоящем документе термин "примерно" означает $\pm 20\%$ указанного диапазона, значения или структуры.

Указания диапазонов значений в настоящем документе используют только как более короткий способ указания по отдельности каждой конкретной величины в рамках диапазона, если в документе не указано иное, при котором каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно и конкретно указано в настоящем документе. Например, если не указано иное, любой диапазон концен-

траций, диапазон процентов, диапазон соотношений, диапазон целых чисел, диапазон размеров или диапазон толщины следует понимать как содержащий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, если это уместно, его долей (например, одной десятой и одной сотой целого числа).

Все описанные в настоящем документе способы можно выполнять в любом приемлемом порядке, если в настоящем документе не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Применение любого или всех примеров или вводного слова перед примером (такого как "например") в настоящем документе предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки, содержащиеся в описании, не следует толковать как указывающие на наличие какого-либо незаявленного признака, являющегося существенным для реализации изобретения на практике.

В настоящем документе описаны предпочтительные варианты осуществления. Специалисты в данной области могут ознакомиться с вариациями этих предпочтительных вариантов осуществления после прочтения приведенного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие вариации, если это целесообразно, а также авторы изобретения предполагают, что изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, согласно действующему законодательству. Более того, изобретение охватывает любую комбинацию вышеописанных элементов во всех их возможных вариациях, если иное не указано в настоящем документе или если это явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически сконструированный С1-фиксирующий микроорганизм, содержащий нокин ДНК в локусе гена ацетолактатдекарбоксилазы, причем указанная ДНК кодирует один или более ферментов, причем указанные один или более ферментов содержат тиолазу, КоА-трансферазу и декарбоксилазу, выбранную из ацетоацетатдекарбоксилазы или альфа-кетоизовалератдекарбоксилазы.

2. Микроорганизм по п.1, причем ДНК заменяет кодирующий участок гена ацетолактатдекарбоксилазы.

3. Микроорганизм по п.1, причем ДНК не заменяет промотор ацетолактатдекарбоксилазы.

4. Микроорганизм по п.1, не продуцирующий 2,3-бутандиол.

5. Микроорганизм по п.1, причем указанные один или более ферментов являются ненативными для микроорганизма.

6. Микроорганизм по п.1, причем указанные один или более ферментов являются нативными для микроорганизма.

7. Микроорганизм по п.1, причем указанные один или более ферментов находятся под контролем промотора ацетолактатдекарбоксилазы.

8. Микроорганизм по п.1, причем указанная ДНК содержит промотор.

9. Микроорганизм по п.1, причем указанные один или более ферментов находятся под контролем как промотора ацетолактатдекарбоксилазы, так и по меньшей мере одного другого промотора.

10. Микроорганизм по п.1, причем микроорганизм продуцирует ацетон и/или изопропанол.

11. Микроорганизм по п.1, дополнительно содержащий прерывающую мутацию в гене первично-вторичной алкогольдегидрогеназы.

12. Микроорганизм по п.1, причем указанные один или более ферментов обеспечивают продукцию 1-бутанола, бутирата, бутена, бутадиена, метилэтилкетона, этилена, ацетона, изопропанола, липидов, 3-гидроксипропионата, терпенов, изопрена, жирных кислот, 2-бутанола, 1,2-пропандиола, 1-пропанола, 1-гексанола, 1-октанола, хоризматных производных, 3-гидроксибутирата, 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомасляной кислоты, изобутилена, адипиновой кислоты, 1,3-гександиола, 3-метил-2-бутанола, 2-бутен-1-ола, изовалерата, изоамилового спирта или моноэтиленгликоля.

13. Микроорганизм по п.1, представляющий собой микроорганизм Вуда-Льюнгдала.

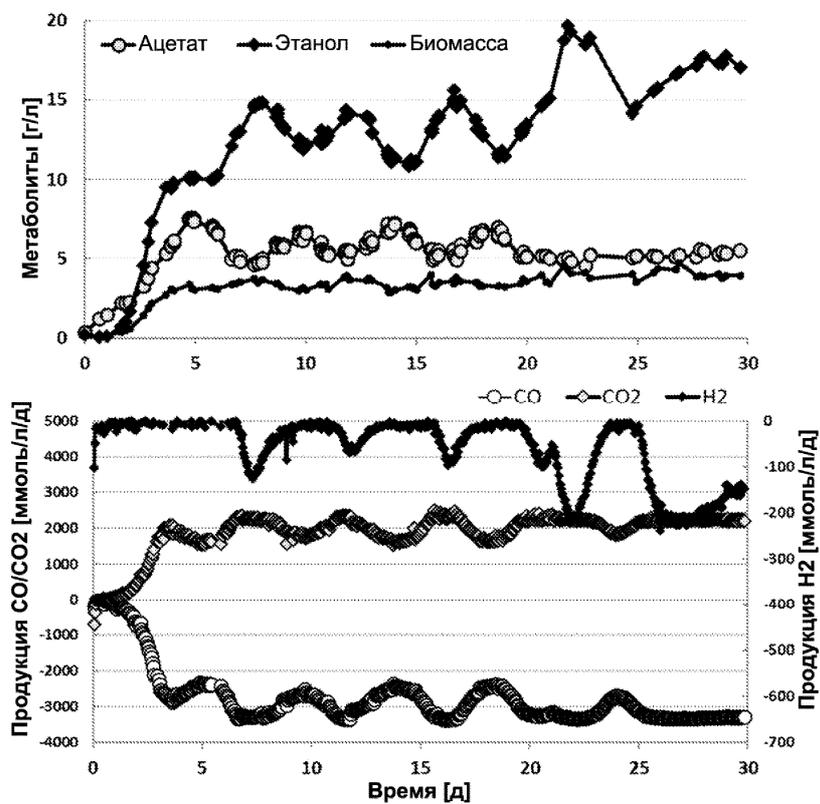
14. Микроорганизм по п.1, представляющий собой бактерию.

15. Микроорганизм по п.1, являющийся представителем рода, выбранного из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyrivacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*.

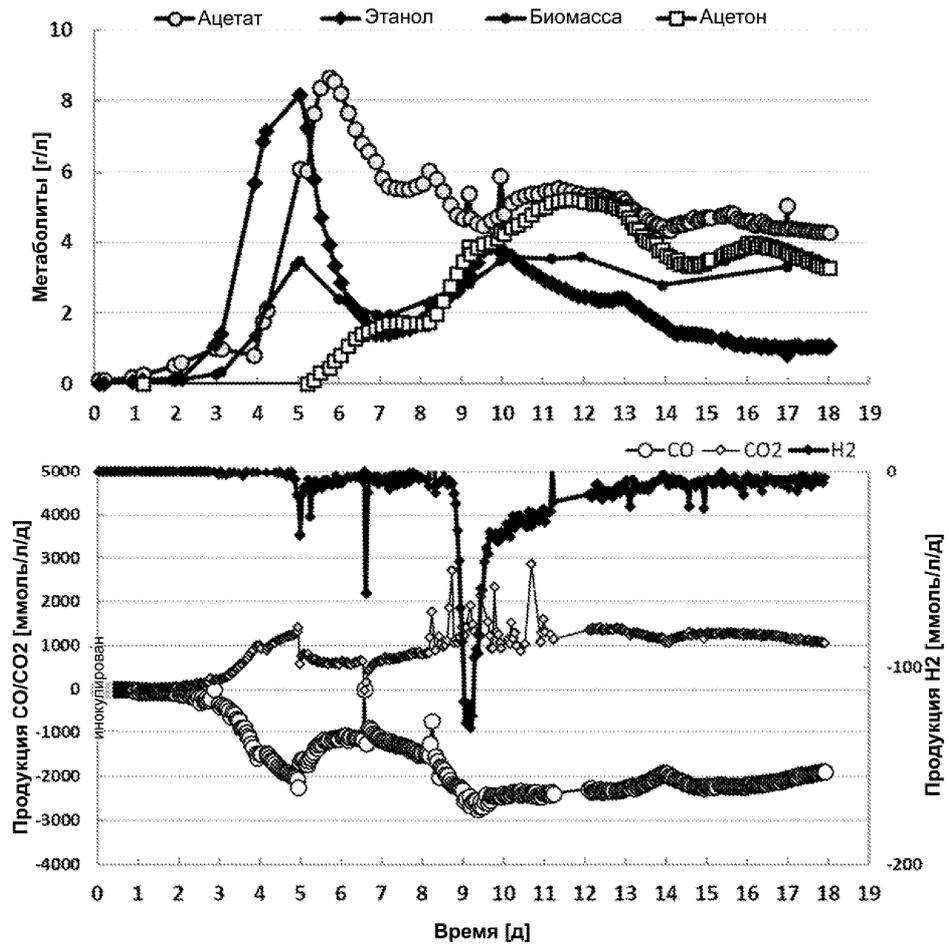
16. Способ получения продукта, представляющего собой 1-бутанол, бутират, бутен, бутадиен, метилэтилкетон, этилен, ацетон, изопропанол, липиды, 3-гидроксипропионат, терпены, изопрен, жирные кислоты, 2-бутанол, 1,2-пропандиол, 1-пропанол, 1-гексанол, 1-октанол, хоризматные производные, 3-гидроксибутират, 1,3-бутандиол, 2-гидроксиизобутират, 2-гидроксиизомасляную кислоту, изобутилен, адипиновую кислоту, 1,3-гександиол, 3-метил-2-бутанол, 2-бутен-1-ол, изовалерат, изоамиловый спирт или моноэтиленгликоль, включающий культивирование микроорганизма по п.1 в присутствии газообразного субстрата.

17. Способ по п.16, причем газообразный субстрат содержит источник С1-углерода, содержащий СО, СО₂ и/или Н₂.

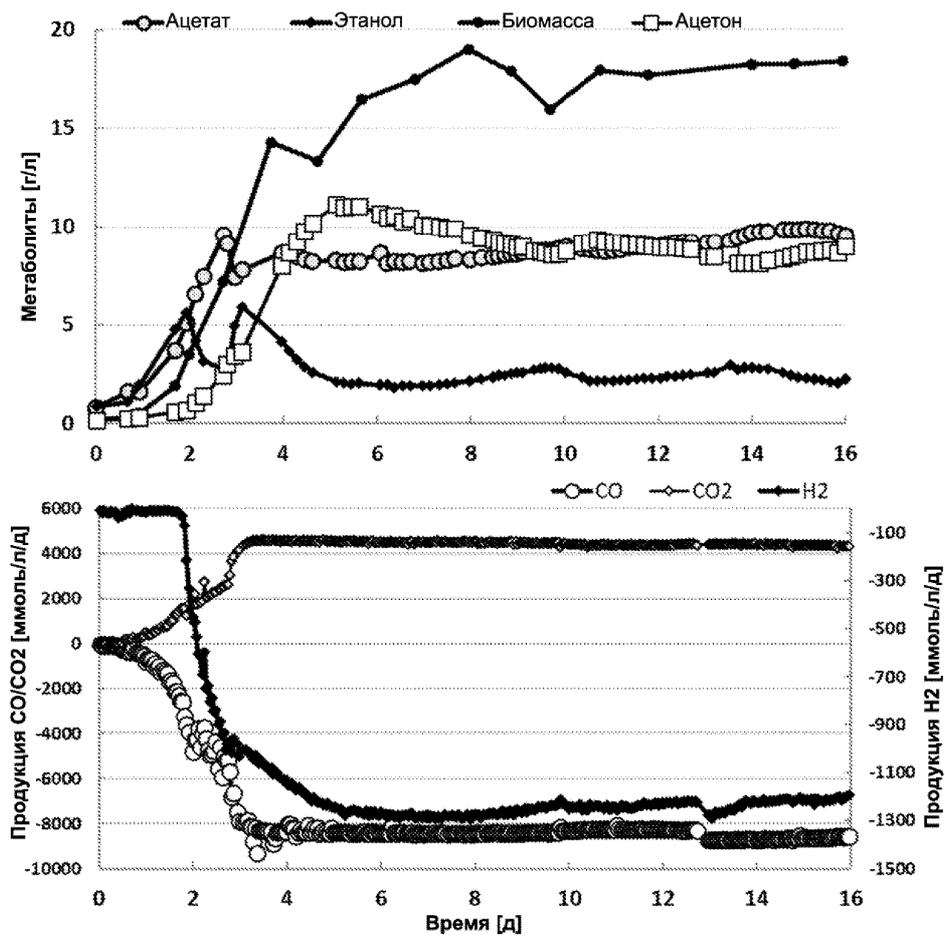
18. Способ по п.16, причем газообразный субстрат содержит синтез-газ или промышленный отработанный газ.



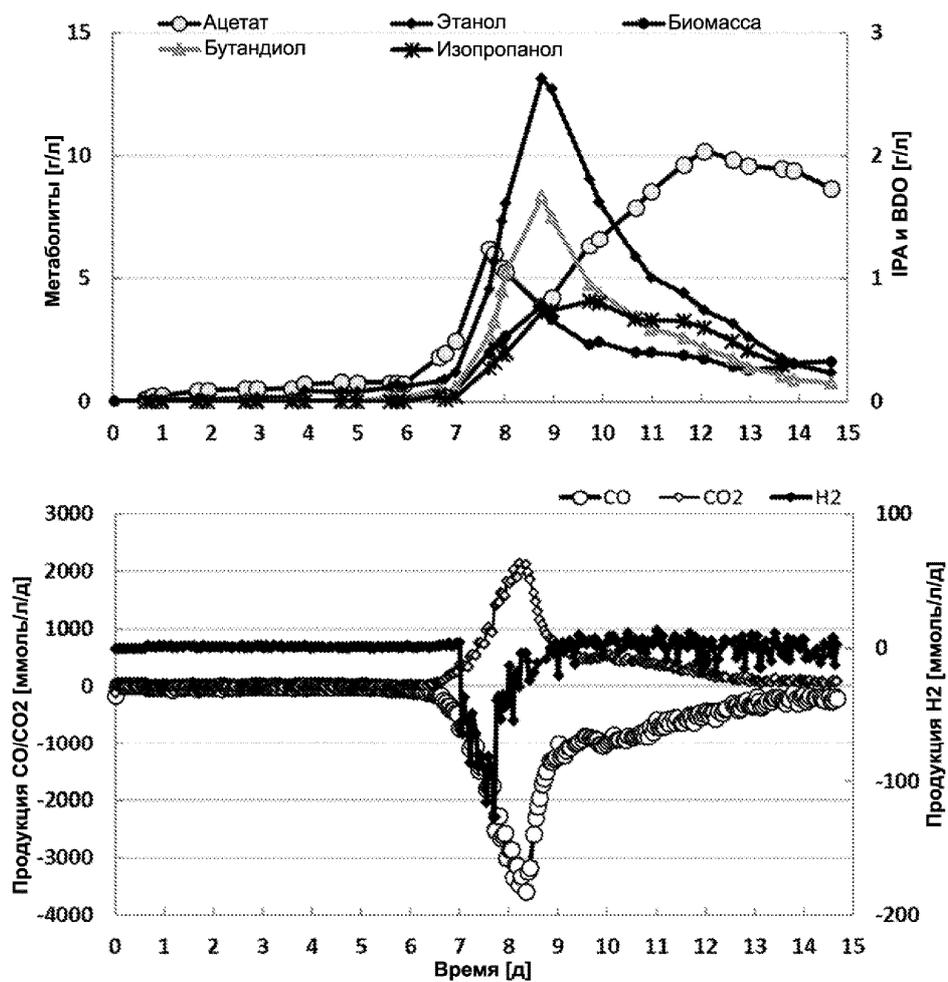
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

