

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490670 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.15

(22) Дата подачи заявки  
2022.09.07

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)  
C07K 14/33 (2006.01)  
C12P 7/06 (2006.01)  
C12P 7/26 (2006.01)  
C12P 7/40 (2006.01)  
C12R 1/145 (2006.01)

(54) УВЕЛИЧЕНИЕ РОСТА CO<sub>2</sub>-ФИКСИРУЮЩЕЙ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

(31) 21195239.5

(32) 2021.09.07

(33) EP

(86) PCT/EP2022/074870

(87) WO 2023/036823 2023.03.16

(71) Заявитель:  
ДАНМАРКС ТЕКНИСКЕ  
УНИВЕРСИТЕТ (DK)

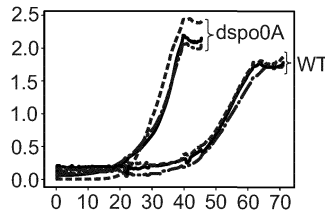
(72) Изобретатель:

Нильсен Алекс Тофтгор, Йенсен  
Торбьерн Эльшей, Аксельсен Амалие  
Мелтон, Редл Стефани, Брендум  
Себастиан Свен (DK)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены способы увеличения роста бактерий вида *Moorella*, генетически модифицированные бактерии, полученные такими способами, и применение таких бактерий для метаболизации углеродсодержащего субстрата, необязательно, при выработке биохимического продукта.



A1

202490670

202490670

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580658EA/032

### УВЕЛИЧЕНИЕ РОСТА СО<sub>2</sub>-ФИКСИРУЮЩЕЙ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

Область Техники

Настоящее изобретение относится к применению термофильных бактерий для фиксации СО<sub>2</sub> и производства биохимических веществ, а также к способам увеличения роста таких бактерий путем генетической модификации, приводящей к повышению эффективности фиксации СО<sub>2</sub>.

Уровень техники

Масса химических веществ в масштабах миллионов тонн производится неэкологично путем крекинга ископаемого топлива. В то же время человечество ежегодно выбрасывает в атмосферу более 40 гигатонн СО<sub>2</sub>, что приводит к изменению климата и угрожающим последствиям повышения температуры. Появляются технологии, позволяющие улавливать промышленные выбросы СО<sub>2</sub> и превращать углерод в ценность. Однако эффективность и осуществимость ограничивают реализацию. Традиционные технологии улавливания СО<sub>2</sub> включают фильтры, посадку деревьев или выращивание водорослей. Фильтры требуют дорогих катализаторов, которые чувствительны к примесям в газе СО<sub>2</sub>, в то время как посадка деревьев и выращивание водорослей имеют чрезвычайно низкую эффективность использования площади.

Для разработки процессов, удовлетворяющих этим ограничениям, большое значение имеет применение бактерий, в частности, бактерий, работающих при высоких температурах. Высокая температура культивирования снижает риск контаминации нежелательными микроорганизмами. Для ферментации обычно требуется большое количество охлаждающей воды. На ферментации с использованием термофильных бактерий это требование не распространяется. В целом, процессы термофильной ферментации обладают характеристиками, которые приводят к значительному снижению капитальных и эксплуатационных затрат по сравнению с другими процессами производства на основе биологического сырья.

Ацетогенные бактерии - это группа бактерий, растущих с СО<sub>2</sub> (или СО) в качестве единственного источника углерода. Рост ацетогенных бактерий напрямую связан с фиксацией СО<sub>2</sub>. Один из организмов, *Moorella thermoacetica*, обладает свойствами, которые делают его интересным для фиксации СО<sub>2</sub> с промышленной точки зрения. Хотя фиксация СО<sub>2</sub> в этом организме очень эффективна, скорость роста ограничена. Штаммы с более высокой скоростью роста будут очень полезны для повышения эффективности фиксации СО<sub>2</sub>. В промышленном производстве будут наблюдаться колебания подачи газа, а также градиенты в биореакторе. Известно, что *M. thermoacetica* либо погибает, либо образует споры, если питательные вещества или субстрат ограничены. Это приведет к тому, что субкультуры станут неактивными, что значительно снизит общую эффективность. Развитие клеток, способных оставаться жизнеспособными в течение более длительного периода или в более стрессовых условиях и быстрее восстанавливаться

(когда питательные вещества или субстрат становятся доступными), повысит эффективность процесса. WO 2011/019717 A1 (Mascoma Корп.) относится к векторам, кодирующим селективируемые маркеры, и их использованию, например, для замены генов-мишеней, таких как, например, *spo0A*, такими маркерами в термофильных бактериальных клетках-хозяевах. WO 2020/157487 A2 (Унив. Ноттингема) относится к генетической конструкции, предназначенной для использования в контроле экспрессии гена, например, *Spo0A*, в спорообразующей клетке.

Гомолог белка А споруляции стадии 0 (*Spo0A*) представляет собой белок, участвующий в регуляции бактериальной споруляции. *Spo0A* связывается с ДНК и контролирует экспрессию многих генов (Molle et al., Mol. Microbiol.;50:1683-1701 2003). Он активирует каскад споруляции у различных родов, включая *Bacilli* и *Clostridia*. Сообщалось, что делеция гена *spo0A* в *Bacillus subtilis* предотвращает споруляцию (Spigelman et al., J. Bacteriol.; 172:5011-5019, 1990).

Сообщалось, что регулятор транскрипции НТН-типа SinR (SinR) действует и как отрицательный, и как положительный регулятор процессов развития, которые индуцируются в конце вегетативного роста в ответ на истощение питательных веществ. Например, он действует как репрессор *Spo0A*. Тетрамеры SinR действуют как репрессоры транскрипции матричных генов во время вегетативного роста, тогда как во время стационарной фазы мономеры SinR образуют комплекс либо с SinI, либо с SlrR. SinI является антирепрессором и может изолировать SinR, тогда как комплексы SlrR-SinR вызывают репрессию матричных оперонов и вместо этого репрессируют гены, необходимые для роста планктона (Kearns et al., Mol. Microbiol.;55:739-749 2005, Chai et al., Mol. Microbiol.;74:876-887 2009, Chai et al., Genes Dev.;24:754-765 2010).

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что рост бактерий вида *Moorella* может быть увеличен за счет генетических модификаций генов, кодирующих SinR и *Spo0A*. Соответственно, изобретение в целом относится к способам усиления роста бактерий вида *Moorella*, тем самым повышая их эффективность фиксации CO<sub>2</sub> и биохимического производства.

Итак, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения скорости роста бактерии, принадлежащей к виду *Moorella*, включающему введение в бактерию одной или более генетических модификаций для снижения или отмены экспрессии и/или активности гомолога белка А споруляции стадии 0 (*Spo0A*) в бактерии.

В некоторых вариантах осуществления одна или более генетических модификаций включают генетическую модификацию, которая снижает или устраняет экспрессию белка *Spo0A* в бактерии.

В некоторых вариантах осуществления ген *spo0A* удален.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение в бактерию одной или более генетических модификаций для экспрессии варианта SinR в бактерии, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, предпочтительно, где указанная аминокислота представляет собой F, I, Y или W, более предпочтительно, где указанная аминокислота представляет собой F, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения продолжительности лаг-фазы и/или увеличения скорости роста бактерии, принадлежащей к виду *Moorella*, включающему введение в бактерию одной или более генетических модификаций для экспрессии варианта регулятора транскрипции SinR (SinR) НТН-типа в бактерии, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от валина (V), в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой фенилаланин (F), изолейцин (I), тирозин (Y) или триптофан (W).

В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления первого и второго аспектов вида *Moorella* выбраны из (a) *Moorella thermoacetica*; (b) *Moorella thermoautotropica*; (c) бактериального штамма, имеющего среднюю нуклеотидную идентичность на основе показателя выравнивания MUMmer (ANIm), по меньшей мере, примерно 96,5% по сравнению со штаммом *M. thermoacetica* DSM 512<sup>T</sup>; (d) бактериального штамма, имеющего среднюю нуклеотидную идентичность на основе показателя выравнивания MUMmer (ANIm), по меньшей мере, примерно 96,5% по сравнению со штаммом *M. thermoacetica* DSM 2955<sup>T</sup>; и комбинации a) и (b); (a) и (c); (a) и (d); (a), (b) и (c), или всех (a) - (d).

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированной бактерии, полученной или получаемой способом согласно вариантам осуществления первого или второго аспекта.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к бактерии, принадлежащей к *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия была генетически модифицирована для снижения или устранения экспрессии и/или активности Spo0A в бактерии, где экспрессия и/или активность снижены относительно его экспрессии и/или активности в *M. thermoacetica* дикого типа, и /или *M. thermoautotropica*.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к бактерии, принадлежащей к видам *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия была генетически модифицирована так, чтобы она содержала трансген, кодирующий вариант SinR, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID

NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, и где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2. Необязательно, бактерия представляет собой штамм *M. thermoacetica* ATCC 39073 или штамм, полученный из него, такой как штамм *M. thermoacetica* 39073-НН.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к бактерии, принадлежащей к видам *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия

(а) включает вариант SinR, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержащий аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2, и

(б) имеет сниженную или устраненную экспрессию и/или активность Spo0A, причем экспрессия и/или активность снижена относительно его экспрессии и/или активности в *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica* дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления четвертого и шестого аспектов ген *spo0A* удален.

В некоторых вариантах осуществления пятого и шестого аспектов аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой F.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к применению бактерии согласно любому из аспектов 3-6 для метаболизма углеродсодержащего субстрата, необязательно, при производстве биохимического вещества.

В некоторых вариантах осуществления:

- i) углеродсодержащим субстратом является CO и/или CO<sub>2</sub>,
- ii) биохимическое вещество выбрано из C1-C4спиртов, C1-C4кетонов, C1-C4альдегидов, C1-C4карбоновых кислот и любых их смесей, или
- iii) обоим i), и ii).

В некоторых вариантах осуществления аспектов с первого по седьмой бактерия представляет собой штамм *M. thermoacetica* ATCC 39073 или штамм, полученный из него, такой как штамм *M. thermoacetica* 39073-НН.

Подписи к чертежам

Фиг. 1: Схематическая иллюстрация кривой роста бактериальной культуры, определенной путем измерения оптической плотности (OD). Рост бактериальной культуры можно разделить на четыре фазы: лаг-фазу, лог-фазу, стационарную фазу и фазу смерти.

Фиг. 2: Плазмидная карта плазмид, нокаутных по *spo0A*.

Фиг. 3: Кривые роста штаммов WT и  $\Delta spo0A$  в зависимости от времени в часах (ч).

A; показаны отдельные измерения культивирований в трех экземплярах.

B; кривые среднего роста, светлые модели показывают стандартное отклонение.

С; то же, что В, но оптическая плотность в логарифмическом масштабе.

Фиг. 4: Структурный анализ комплекса SinR-SinI из *Bacillus*.

А; Комплекс SinR-SinI из *Bacillus* (ID PDB: 1b0n). Домен НТН из SinR показан без каких-либо рисунков, домен олигомеризации показан рисунком с кружками, а SinI - рисунком с пентамером.

В; схема рисунка, как в А, с боковыми цепями Т60 и L61, показанными в виде палочек, имеющих рисунок из маленьких сплошных треугольников.

С; Увеличение L61 и визуализация мутации L-F. Предлагаемая структура фенилаланина показана в виде серых палочек. Видимые диски и рисунки указывают на попарное перекрытие атомных ван-дер-ваальсовых радиусов. Короткие линии или маленькие диски показаны, когда атомы почти соприкасаются или слегка перекрываются. Большие диски с крестиками указывают на значительное перекрытие Ван-дер-Ваальса. Все остальное находится между этими крайними вариантами.

Д; Увеличение Т60 и визуализация мутации Т-F. Слева: водородные связи между Т60 в SinR и E14 в SinI. В центре: мутация Т на F, с фенилаланином в наиболее распространенном ротамере. Справа: мутация Т на F, при этом фенилаланин находится в наиболее благоприятном ротамере. Диск и рисунки как указано в С.

Подробное описание изобретения

Определения

Используемый в настоящем описании термин «вид *Moorella*» относится к любому члену группы видов, классифицированных как принадлежащие к бактериальному роду *Moorella*, принадлежащему типу Firmicutes. Виды *Moorella* обычно термофильны, анаэробны и образуют эндоспоры и могут быть выделены, например, из горячих источников. Неограничивающий список видов *Moorella* можно найти в Национальном центре биотехнологической информации (World-Wide Web (www), адрес [ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=44260](http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=44260); по состоянию на 1 июля 2021 г., включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме) и в других местах настоящего документа.

Особенно предпочтительными являются ацетогенные (ферментирующие газ) виды *Moorella thermoacetica* (*M. thermoacetica*), виды, ранее известные как *Clostridium thermoaceticum*, и *Moorella thermoautotropica* (*M. thermoautotropica*), а также любые и все производные от них штаммы, включая штаммы, выделенные в лабораторных условиях или выделенные из природных источников. Хотя *M. thermoacetica* и *M. thermoautotropica* часто рассматривают как два разных вида, геномные сравнения показали, что штаммы *M. thermoautotropica* могут быть переклассифицированы как штаммы *M. thermoacetica* (Redl et al., Front. Microbiol.;10:3070 2020). Следовательно, используемый в настоящем описании термин *M. thermoacetica* может относиться как к штаммам бактерий, обычно классифицируемых как *M. thermoacetica*, так и к штаммам бактерий, которые с помощью генетического анализа могут быть классифицированы как штаммы *M. thermoacetica*, такие как штаммы *M. thermoautotropica*. Ниже описан метод определения принадлежности

бактериального штамма к виду *M. thermoacetica*. Неограничивающие примеры штаммов *M. thermoacetica* включают *M. thermoacetica* ATCC 39073, *M. Thermoacetica* ATCC39073-НН (номер доступа в Genbank CP031054, предпочтительно версия CP031054. 1) и *M. Thermoacetica* Y72. Используемый в настоящем описании термин «*M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica* дикого типа» относится к любому встречающемуся в природе штамму *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*. Например, обычно геном *M. thermoacetica* дикого типа содержит ген *spo0A*, ген, кодирующий белок SinR (предпочтительно с валином в положении аминокислоты, соответствующем 198 в SEQ ID NO: 2), или и то, и другое.

Используемый в настоящем описании термин «SinR» или «регулятор транскрипции SinR НТН-типа» включает все варианты SinR, без ограничения вариантами, кодируемыми бактериями вида *Moorella*. Примером варианта SinR, кодируемого *Moorella thermoacetica*, является белок с UniProt ID: A0A5B7YPR1 (SEQ ID NO: 2), см. Таблицу 1. В настоящем описании термин «SinR» относится к белку, который содержит по меньшей мере 80%, например, 85%, например, 90%, например, 91%, например, 92%, например, 93%, например, 94% например, 95%, например, 96%, например, 97%, например, 98% и например, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, перед любыми генетическими модификациями в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, модифицируемая клетка вида *Moorella* содержит нативный белок SinR, причем этот белок предпочтительно содержит валин в положении аминокислоты, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, SinR *M. thermoacetica* кодируется геном с тегом локуса Европейского нуклеотидного архива (ENA) MothHH\_01753 (SEQ ID NO: 1), см. Таблицу 1.

Используемый в настоящем описании термин «Spo0A» или «гомолог белка A споруляции стадии 0» относится к эндогенному белку соответствующего вида *Moorella*. Примером Spo0A является *M. thermoacetica* Spo0A с идентификатором UniProt ID: A0A5B7YPG0 (SEQ ID NO: 4), см. Таблицу 1. Другим примером Spo0A является *M. thermoacetica* Spo0A с идентификатором UniProt: A0A1D7XBE2. В настоящем описании термин «Spo0A» относится к белку, который содержит по меньшей мере 80%, например 85%, например 90%, например 91%, например 92%, например 93%, например 94%, например, 95%, например, 96%, например, 97%, например, 98% и например, 99%, идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно Spo0A *M. thermoacetica* кодируется геном с тегом локуса ENA MothHH\_01617 (SEQ ID NO: 3), см. Таблицу 1.

Термин «ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует клеточную функцию, такую как белок, необязательно включая регуляторные последовательности, предшествующие (5'-некодирующие последовательности) и следующие (3'-некодирующие последовательности) за кодирующей последовательностью. «Трансген» представляет собой ген, нативный или гетерологичный, который был введен в клетку с помощью метода генной инженерии, например, путем трансформации. Названия

генов здесь выделены курсивом с первой буквы в нижнем регистре (например, *spo0A*), тогда как названия белков выделены обычным текстом с заглавной первой буквой (например, Spo0A).

Таблица 1: Spo0A и SinR у *Moorella thermoacetica*

Название гена -тег локуса ENA, геномная локализация	Название белка - ссылка UniProtKB	Последовательности*
<i>sinR_1</i> - MothNH_01753, область CP031054: 1679119..1680021	Транскрипционный регулятор НТН-типа SinR - A0A5B7YPR1(A0A5B7YPR1_MO OTH)	Ген:903 п.о. (SEQ ID NO: 1) Белок: 300 ак. (SEQ ID NO: 2)
<i>spo0A</i> - MothNH_01617, область CP031054: 1565989..1566744	Гомолог А белка споруляции стадии 0 - A0A5B7YPG0 (A0A5B7YPG0_MOOTH)	Ген: 756 п.о. (SEQ ID NO: 3) Белок: 251 ак. (SEQ ID NO: 4)

\*п.о.=пары оснований, ак.=аминокислоты

В настоящем описании «генетическая модификация» относится к внесению генетически наследуемого изменения в геном клетки-хозяина. Примеры изменений включают мутации в генах и регуляторных последовательностях, мутации в кодирующих и некодирующих последовательностях ДНК. «Мутации» включают делеции, замены и вставки нуклеиновых кислот или фрагментов нуклеиновых кислот в геном.

«Вариант» родительского или эталонного белка включает одну или более мутаций, таких как аминокислотные замены, вставки и делеции, по сравнению с родительским или эталонным белком. Обычно вариант имеет высокую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью родительского или эталонного белка, например, по меньшей мере примерно 70%, например, по меньшей мере, примерно 80%, например, по меньшей мере, 84%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере примерно 90%, например, по меньшей мере примерно 93%, например, по меньшей мере примерно 95%, например, по меньшей мере примерно 96%, например, по меньшей мере примерно 97%, например, по меньшей мере примерно 98%, например по меньшей мере примерно 99%, по меньшей мере по функционально или каталитически активной части, необязательно по всей длине.

Если не указано иное, термин «идентичность последовательности», используемый в настоящем описании для аминокислотных последовательностей, определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей одинаковой длины в соответствии со следующей формулой:  $(N_{ref}-N_{dif}) \cdot 100 / N_{ref}$ , где  $N_{ref}$  представляет собой количество остатков в одной из двух последовательностей, а  $N_{dif}$  представляет собой количество остатков, которые не идентичны в двух последовательностях, когда они выровнены по всей своей длине и в одном направлении. Следовательно, аминокислотная последовательность GSTDYTQNWA (SEQ ID NO: 19) будет иметь идентичность



последовательности 80% с последовательностью GSTDYQAWA (SEQ ID NO: 20;  $n_{dif}=2$  и  $n_{ref}=10$ ).

Идентичность последовательности можно определить обычными методами, например, Smith and Waterman (Adv. Appl. Math.;2:482 1981), методом «поиска сходства» Пирсона и Липмана (Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 85:2444 1988), используя алгоритм CLUSTAL W Thompson et al. (Nucleic Acids Res.;22:467380 1994), посредством компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group) или алгоритмом Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol.;48:443-453 1970), как это реализовано в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., Trends Genet.;16:276-277 2000), например, как представлено на веб-сайте Европейского института биоинформатики ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Алгоритм BLAST (Altschule et al., Mol. Biol.;215:403-410 1990), для которого программное обеспечение можно получить через Национальный центр биотехнологической информации ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). При использовании любого из упомянутых алгоритмов могут использоваться параметры по умолчанию для длины «окна», штрафа за пробел и т. д.

Остаток в одной аминокислотной последовательности, который «соответствует» конкретному эталонному остатку в эталонной аминокислотной последовательности, представляет собой остаток, который выравнивается с эталонным остатком, например, как определено с помощью программного обеспечения для выравнивания последовательностей, описанного в предыдущем абзаце.

Термин «экспрессия», используемый в настоящем описании, относится к процессу, в котором ген транскрибируется в мРНК и может необязательно включать последующую трансляцию мРНК в аминокислотную последовательность, т. е. в белок или полипептид.

В настоящем описании термин «пониженная экспрессия» гена в клетке-хозяине означает, что уровни мРНК или белка, кодируемого геном, значительно снижаются в клетке-хозяине, обычно по меньшей мере на 25%, например по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 75%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, по сравнению с контролем. Обычно, когда пониженная экспрессия достигается путем генетической модификации клетки-хозяина, контролем является немодифицированная клетка-хозяин.

Под «устраненной экспрессией» гена в клетке-хозяине подразумевается, что мРНК или белок, кодируемый этим геном, по существу отсутствует, отсутствует или не детектируется в клетке-хозяине.

Термин «нокдаун», используемый в настоящем описании, относится к любому из ряда методов, приводящих к снижению экспрессии гена в клетке-хозяине, например, к введению мутации в промоторе.

Термин «нокаут», используемый в настоящем описании, относится к любому из ряда методов, приводящих к прекращению экспрессии гена в клетке-хозяине, например, введение мутации или удаление гена. Термин «делеция», используемый в настоящем

описании, относится к частичному или полному удалению кодирующей последовательности гена, что приводит либо к прекращению экспрессии этого гена, либо к экспрессии нефункционального генного продукта.

Термин «активность» или «функция», используемый в настоящем описании и относящийся к активности или функции белка, может, если не указано иное, означать любую активность или функцию этого белка, такую как каталитическая активность, связывающая активность, репрессорная активность и т. д.

В настоящем описании «пониженная активность» белка в клетке-хозяине означает, что одна или более специфических активностей этого белка значительно снижены в клетке-хозяине, обычно по меньшей мере на 25%, например, по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 75%, например, по меньшей мере, на 90%, например, по меньшей мере, на 95% по сравнению с контролем. Обычно, когда пониженная экспрессия достигается путем генетической модификации клетки-хозяина, контролем является немодифицированная клетка-хозяин. Под «устраненной активностью» белка в клетке-хозяине подразумевается, что одна или более специфических активностей этого белка по существу отсутствуют, отсутствуют или не детектируются в клетке-хозяине.

Генетические модификации, приводящие к снижению или устранению активности целевого белка, могут включать мутацию или делецию в кодирующей последовательности этого белка, что приводит к экспрессии нефункционального или менее функционального белка. Кроме того, генетические модификации, приводящие к пониженной или устраненной экспрессии и/или активности целевого гена, как используется в настоящем описании, могут быть косвенными, что означает, что они не являются генетическими модификациями самого гена. Такие генетические модификации могут, например, включать введение последовательности нуклеиновой кислоты, которая снижает экспрессию целевого гена, например, репрессора, который ингибирует экспрессию целевого гена.

Стандартные методы рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования, полезные для реализации вариантов осуществления настоящего изобретения, хорошо известны в данной области и описаны, например, Sambrook J., Fritsch E.F. и Maniatis T. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, and by Silhavy, T. J. , Bannan, M. L. , и Enquist, L. W. (1984). *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York. Методы целевого редактирования генома, такие как удаление целевого гена в бактериальном геноме, включают системы на основе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR), такие как CRISPR-Cas9.

Термин «Скорость роста» бактерии, используемый в настоящем описании, представляет собой меру, отражающую количество делений клеток в единицу времени. Его можно рассчитать на основе измерений оптической плотности (OD) бактериальной культуры при длине волны 600 нм, где скорость роста может быть выражена как изменение OD за единицу времени, например, в час.

В настоящем описании термин «лаг-фаза», относящийся к лаг-фазе бактерии, означает первую из четырех фаз роста бактерий: лаг-фазу, логарифмическую фазу, стационарную фазу и фазу гибели. Лаг-фаза - это фаза, на которой бактерии обычно адаптируются к новым внешним условиям, прежде чем они начнут размножаться (входят в лог-фазу). Неограничивающие примеры новых внешних условий включают инокуляцию в новую среду и добавление питательных веществ к существующей культуре, например, источника углерода. Во время лаг-фазы деление клеток обычно слабое или отсутствует вообще.

В настоящем описании термин «метаболизация» означает потребление субстрата в одном или более метаболических процессах, необязательно катализируемых одним или более ферментами.

Термин «субстрат», используемый в настоящем описании, относится к молекуле, на которую действует фермент с образованием продукта, преобразуя в процессе субстрат. При использовании в отношении пути биосинтеза термин «субстрат» относится к молекуле(ам), на которую действует первый фермент указанного пути. «Углеродсодержащий субстрат» представляет собой субстрат, содержащий по меньшей мере один атом углерода, такой как CO или CO<sub>2</sub>.

Используемый в настоящем описании термин «биохимический продукт» означает молекулу, которая может быть получена биологическим процессом. В контексте настоящего изобретения бактерии видов *Moorella* можно использовать для производства биохимических продуктов либо за счет действия их природных эндогенных ферментов, либо после генетической модификации; такой как вставка одного или более трансгенов, кодирующих специфические ферменты, подходящие для производства представляющего интерес биохимического продукта.

#### Конкретные варианты осуществления изобретения

Как описано в Примере 1, скорость роста *M. thermoacetica* увеличивалась за счет делеции гена, кодирующего Spo0A (Пример 1; Фигура 3 и Таблица 3).

Регуляция экспрессии генов, контролирующая скорость клеточного роста, сложна и тонко настроена, обычно с участием многих генов/белков. Однако в данном случае удаление единственного гена, кодирующего Spo0A, увеличивало скорость роста *M. thermoacetica*. Кроме того, ген был удален путем замены его геном, кодирующим белок устойчивости к антибиотикам, под контролем промотора гена домашнего хозяйства. Такие изменения обычно замедляют рост модифицированных организмов, но в этом случае наблюдался противоположный эффект. Более того, вопреки тому, что указывалось в предыдущих отчетах (см. «Уровень техники»), в *M. thermoacetica* удаление *spo0A* не приводило к уменьшению споруляции. Эти данные позволяют предположить, что повышенная скорость роста, которая наблюдалась после удаления *spo0A* у *M. thermoacetica*, не была связана со снижением метаболической нагрузки, связанной с каскадом споруляции, поскольку каскад все еще функционировал.

Как описано в Примере 2, мутация aV198F в SinR уменьшала продолжительность

лаг-фазы (приводила к более быстрому выходу из состояния покоя) *M. thermoacetica* при инокуляции в свежую среду после более длительного периода инкубации (Пример 2). Более того, было обнаружено, что мутация V198, такая как V198F у SinR *M. thermoacetica*, может влиять на стабильность белка, его аффинность к антирепрессору SinI и/или его способность к олигомеризации (см. Пример 2, Фигуру 4 и Таблицы 4 и 5).

Таким образом, авторы настоящего изобретения определили способы усиления роста (путем увеличения скорости роста и/или уменьшения продолжительности лаг-фазы) бактерий *M. thermoacetica*. У *M. thermoacetica* существует прямая связь между ростом и фиксацией CO<sub>2</sub>. Настоящее изобретение, в котором предложены штаммы с усиленным ростом, тем самым обеспечивает штаммы с усиленной фиксацией CO<sub>2</sub>. Более того, эти штаммы могут быть модифицированы так, чтобы они содержали один или более ферментов для выработки интересующего биохимического продукта, что приводит к увеличению выработки такого биохимического продукта.

Помимо увеличения фиксации CO<sub>2</sub> и биохимической выработки, преимущества использования способов согласно настоящему изобретению для этих целей включают следующее:

- Высокая температура культивирования *M. thermoacetica* имеет некоторые преимущества, как было также описано в разделе «Уровень техники», в том числе: пониженный риск контаминации, более высокие показатели конверсии, отсутствие необходимости в охлаждающей воде и значительно более низкие капитальные и эксплуатационные затраты по сравнению с другими биотехнологическими производственными процессами.

- Клетки, которые способны быстрее восстанавливаться после нахождения в стрессовой ситуации, очень выгодны для использования в биореакторах, поскольку это допускает большую степень колебаний и градиентов (питательных веществ, pH и субстрата) в биореакторе.

- В некоторых вариантах осуществления не требуется сверхэкспрессия генов или оперонов, что будет представлять собой повышенную метаболическую нагрузку. Эти сконструированные штаммы будут поддерживать высокую метаболическую активность на протяжении всего процесса ферментации.

#### Методы

Некоторые аспекты изобретения относятся к способам усиления роста бактерий видов *Moorella* путем введения генетических модификаций в бактерии для воздействия на экспрессию и/или активность Spo0A или для экспрессии мутированного варианта SinR.

Рост бактерий вида *Moorella* можно ускорить либо за счет увеличения скорости роста бактерий (количества делений клеток в единицу времени), либо за счет уменьшения продолжительности лаг-фазы (время, которое требуется до того, как бактерии начнут размножаться после того, как они приспособились к новым внешним условиям), или сочетанием того и другого. Оба способа ускорения роста также увеличивают фиксацию CO<sub>2</sub> и, возможно, выработку интересующего биохимического продукта.

### Измерения роста бактерий

Рост бактерий легко измерить стандартными методами, включая измерение оптической плотности (OD) при длине волны 600 нм, как используется в Примерах. Непрерывные измерения можно использовать для построения графика, по которому можно определить продолжительность лаг-фазы, а также скорость роста. Чтобы определить продолжительность лаг-фазы, следует отслеживать OD бактериальной культуры (как меру количества клеток) с момента, когда клетки подвергаются воздействию новых внешних условий, например, путем инокуляции в новую среду, до тех пор, пока клетки не войдут в фазу экспоненциального роста (логарифмическая фаза). Для расчета темпов роста график представлен в логарифмическом масштабе (см. Фигуру 1). Скорость роста ( $\mu$ ) можно рассчитать по двум точкам данных, полученным из линейной части графика (экспоненциальная фаза или логарифмическая фаза): значение OD в момент времени 1 ( $t_1, OD_1$ ) и значение OD в момент времени 2 ( $t_2, OD_2$ ), где  $t_2 > t_1$ . Тогда темп роста можно рассчитать по формуле I:

$$\mu = \frac{(\log_{10} OD_2 - \log_{10} OD_1) 2.303}{t_2 - t_1} \quad (I)$$

### Генетические модификации

#### Spo0A:

В одном аспекте изобретение относится к способу увеличения скорости роста бактерии, принадлежащей к виду *Moorella*, включающему введение в бактерию одной или более генетических модификаций для снижения или устранения экспрессии и/или активности гомолога белка А споруляции стадии 0 (Spo0A) в бактерии.

Экспрессия и активность Spo0A в такой бактерии может быть определена специалистом в данной области техники с использованием стандартных методов. Для определения уровня экспрессии мРНК или белка Spo0A можно использовать такие методы, как количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) и вестерн-блоттинг. Для количественной оценки активности Spo0A в бактерии сначала необходимо решить, какую активность следует оценивать количественно. Являясь регулятором споруляции, Spo0A связывается с ДНК и контролирует экспрессию многих генов (Molle et al., Mol. Microbiol.;50:1683-1701 2003). Следовательно, активность Spo0A можно тестировать путем оценки экспрессии ряда генов, включая такие гены, как *abrB*, *spoIIA*, *spoIIG* и *spoIIE*, например, с помощью генного микрочипа или с использованием системы репортерных генов, содержащей известные мотивы связывания Spo0A.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия Spo0A в такой бактерии снижена по сравнению с контролем, таким как, например, уровень экспрессии Spo0A в бактерии до введения генетических модификаций, уровень экспрессии в эталонной бактериальной клетке, или контрольное значение, например, из учебника или литературы. В дополнительных вариантах осуществления экспрессия Spo0A снижается по меньшей мере на 25%, например, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере на 75%,

например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, в бактерии. Экспрессию *Spo0A* можно, например, снизить путем нокдауна гена *spo0A*, например, путем введения мутации в его промотор или в область инициации трансляции, например, в сайт связывания рибосомы, с помощью CRISPR-интерференции (CRISPRi), которая представляет собой метод CRISPR, использующий каталитически неактивный фермент Cas, путем контакта бактериальной клетки с антисмысловыми последовательностями, которые препятствуют транскрипции или трансляции гена, или путем удаления гена, кодирующего фактор транскрипции, который активирует транскрипцию *spo0A*, или путем введения последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует репрессор, ингибирующий транскрипцию *spo0A*.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия *Spo0A* устраняется. Под этим подразумевается, что мРНК *Spo0A*, белок *Spo0A* или оба по существу отсутствуют, отсутствуют или не детектируются в бактерии. Экспрессию *Spo0A* можно, например, устранить путем нокаута гена *spo0A*, например, путем мутации гена, например, путем введения преждевременного стоп-кодона в кодирующую последовательность или путем удаления гена (который, как используется в настоящем описании, может означать либо частичное, либо полное удаление кодирующей последовательности гена). В некоторых вариантах осуществления изобретения *spo0A* может быть нокаутирован с использованием таких технологий, как рекомбинация, опосредованная лямбда Red, трансдукция фага P1, рекомбинация одноцепочечных олигонуклеотидов/технологии MAGE (см., например, Datsenko and Wanner, 2000; Thomason et al., 2007; Wang et al., 2009) и технологии на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления *spo0A* можно нокаутировать путем трансформации бактерии нокаутным вектором и использования гомологичной рекомбинации для замены гена в хромосоме, как описано в Примере 1. В некоторых вариантах осуществления экспрессию *Spo0A* можно устранить путем мутации или удаления промотора гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессию *Spo0A* можно устранить с помощью каталитически неактивного варианта CRISPR или, например, путем экспрессии антисмысловой РНК, которая ингибирует экспрессию или трансляцию *Spo0A*. Здесь представлены примеры белков *Spo0A* и генов, кодирующих их, у конкретных видов *Moorella*. Эндогенный ген, кодирующий белок *Spo0A* у других видов *Moorella*, включая каждый вид *Moorella*, конкретно описанный в настоящем документе, можно идентифицировать с использованием способов, известных в данной области техники, например, на основе гомологии генов.

Введение вектора в бактериальную клетку-хозяин может быть осуществлено, например, путем трансформации протопластов (см., например, Chang and Cohen, Mol. Gen. Genet.; 168:111-115, 1979), с использованием компетентных клеток (см., например, Young and Spizizen, J. Bacteriol.; 81:823-829, 1961 или Dubnau and Davidoff-Abelson, J. Mol. Biol.; 56:209-221, 1971, электропорации (см., например, Shigekawa and Dower, Biotechniques; 6:742-751, 1988) или конъюгации (см., например, Koehler and Thome, J. Bacteriol.; 169:5771-5278 1987).

В некоторых вариантах осуществления активность Spo0A снижена. В дополнительных вариантах осуществления активность Spo0A в бактерии снижается по меньшей мере на 25%, например, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере на 75%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%. В некоторых вариантах осуществления активность Spo0A устранена. Под этим подразумевается, что одна или более специфических активностей Spo0A по существу отсутствуют, отсутствуют или не детектируются у бактерии. Активность Spo0A можно, например, снизить или устранить путем введения мутации или делеции в кодирующей последовательности *spo0A*, что приводит к экспрессии нефункционального или менее функционального белка.

#### SinR:

В одном аспекте изобретение относится к способу уменьшения продолжительности лаг-фазы и/или увеличения скорости роста бактерии, принадлежащей к виду *Moorella*, включающему введение в бактерию одной или более генетических модификаций для экспрессии варианта регулятора транскрипции SinR (SinR) НТН-типа в бактерии, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от валина (V), в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой M. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой V. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой Y. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой C. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой W. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой P. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой E. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID

NO: 2 представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой K. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой N. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой D. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой S.

В предпочтительных вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой F.

В некоторых вариантах осуществления вариант SinR имеет по меньшей мере 91% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, например, 92%, например, 93%, например, 94%, например, 95%, например, 96%, например, 97%, например, 98% и например, 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий вариант SinR, вводят в бактериальную клетку путем трансформации, необязательно с использованием технологии, описанной в других местах настоящего документа. После введения ген, кодирующий вариант SinR, может сохраняться в виде хромосомного интегранта или в самореплицирующемся внехромосомном векторе.

Необязательно, эндогенный ген *sinR* может быть нокаутирован, например, в соответствии со способами, известными в данной области техники, или способом, описанным в других местах настоящего документа.

Необязательно, эндогенный ген *sinR* можно оставить немодифицированным. Предпочтительно эндогенный ген *sinR* содержит валин в положении аминокислоты, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно для трансформации бактериальной клетки-хозяина выбирают подходящий промотор для контроля экспрессии варианта SinR. Промотор может быть нативным или гетерологичным бактериальной клетке-хозяину, т. е. он может происходить из того же вида, что и клетка-хозяин, или он может происходить из вида, отличного от клетки-хозяина, соответственно. Промотор может быть конститутивным или индуцируемым. Конститутивные промоторы обеспечивают непрерывную экспрессию белка, тогда как индуцируемые промоторы обеспечивают условную экспрессию белка. Используя индуцируемые промоторы, экспрессию белка можно поставить в зависимость от присутствия конкретной молекулы, присутствия или отсутствия света или определенной температуры. Промоторы, которые можно использовать для контроля экспрессии белка в бактериях видов *Moorella*, включают конститутивный промотор PG3PD, который получен из *M. thermoacetica* и обычно контролирует экспрессию



глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Другие подходящие промоторы известны или могут быть идентифицированы специалистом с использованием хорошо известных методов.

В некоторых вариантах осуществления вариант SinR, содержащий аминокислоту, отличную от валина (V), в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, может быть создан путем введения одной или более мутаций в ген, кодирующий SinR на бактериальной хромосоме, методом сайт-направленного мутагенеза. Этого можно, например, достичь с помощью методов на основе гомологичной рекомбинации.

Трансформацию можно подтвердить с помощью методов, хорошо известных в данной области. Такие методы включают, например, полногеномное секвенирование, нозерн-блоттинг или ПЦР-амплификацию ДНК или мРНК, иммуноблоттинг для экспрессии генных продуктов или другие подходящие аналитические методы для проверки присутствия или экспрессии введенной последовательности нуклеиновой кислоты. Уровни экспрессии могут быть дополнительно оптимизированы для получения достаточной экспрессии с использованием способов, хорошо известных в данной области.

#### Spo0A+SinR:

В некоторых аспектах настоящего изобретения генетические модификации, относящиеся к Spo0A, и генетические модификации, относящиеся к SinR, которые были описаны выше, комбинируются в одной и той же клетке. Таким образом, бактерии видов *Moorella* по настоящему изобретению могут, например, содержать как вариант SinR, как описано в настоящем документе, так и не иметь гена spo0A из-за делеции. Любые и все аспекты и варианты осуществления, относящиеся к различным генетическим модификациям, описанным в настоящем документе, могут быть объединены в любых и всех возможных комбинациях.

В одном аспекте изобретение относится к бактерии, принадлежащей к видам *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия

(a) включает вариант SinR, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержащий аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2, и

(b) имеет сниженную или устраненную экспрессию и/или активность Spo0A, причем экспрессия и/или активность снижена относительно его экспрессии и/или активности в *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica* дикого типа.

В предпочтительном варианте осуществления ген spo0A удален, а аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой F.

#### Генетически модифицированные бактерии

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к бактериям вида *Moorella*, которые были генетически модифицированы для воздействия на экспрессию и/или активность Spo0A и/или для экспрессии мутированного варианта SinR в бактериях.

Генетические модификации бактерий могут быть получены с помощью методов, хорошо известных в данной области техники и описанных в настоящем документе в других местах.

В одном аспекте генетически модифицированная бактерия может представлять собой любую бактерию, принадлежащую к роду *Moorella*. Виды могут быть выбраны из любого из видов, но не ограничиваются ими: *Moorella thermoacetica*, *Moorella glicerini*, *Moorella humiferrea*, *Moorella mulderi*, *Moorella perchromatireducens*, *Moorella stamsii*, *Moorella thermoautotropica*, *Moorella* sp. 215559/E30-SF1&2, *Moorella* sp. 60\_41, *Moorella* sp. AIP 246. 00, *Moorella* sp. AIP 247. 00, *Moorella* sp. AIP 248. 00, *Moorella* sp. AIP 383. 98, *Moorella* sp. AIP 384. 98, *Moorella* sp. AIP 515. 00, *Moorella* sp. auto11, *Moorella* sp. auto39, *Moorella* sp. auto54, *Moorella* sp. auto59, *Moorella* sp. CF4, *Moorella* sp. CF5, *Moorella* sp. E306M, *Moorella* sp. E308F, *Moorella* sp. F21, *Moorella* sp. Nama-1, *Moorella* sp. HUC22-1, *Moorella* sp. UBA4076, *Moorella* sp. обогащенный клон R19, *Moorella* sp. обогащенный клон R2, *Moorella* sp. обогащенный клон R65, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон B1-B-65, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон B11-B-11, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон B13-B-103, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон B13-B-72, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон DGGE-band1, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон TERIBC1, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон TERIBC2, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон TERIBC3, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон TERIBC4, *Moorella* sp. обогащенный культуральный клон TERIBC5 и некультивированный *Moorella* sp. (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (адрес World-Wide Web (www) [ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=44260](http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=44260); по состоянию на 1 июля 2021 г.).

В других аспектах генетически модифицированная бактерия может представлять собой любую бактерию, классифицируемую как принадлежащую к виду *Moorella thermoacetica* и/или *Moorella thermoautotropica*. Штамм *M. thermoacetica* может быть выбран, помимо прочего, из *M. thermoacetica* ATCC 39073 и *M. thermoacetica* Y72, а также штаммов, полученных из любого из них, таких как, например, штамм *M. thermoacetica* 39073-НН. Классификация *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica* может быть основана на таких ресурсах, как браузер таксономии NCBI (см. ссылку выше), и/или она может быть основана на генетическом анализе.

Способы оценки принадлежности двух бактериальных штаммов к одному или разным видам известны в данной области и включают анализ средней нуклеотидной идентичности (ANI). Особым типом анализа ANI является анализ ANI на основе выравнивания MUMmer (ANIm). Вкратце, геном целевого штамма выравнивается с геномом эталонного штамма и идентифицируются соответствующие области. Процент нуклеотидной идентичности совпадающих областей рассчитывают как среднее значение всех совпадающих областей. Когда сравнение двух бактериальных штаммов дает результат ANIm по меньшей мере 96,5%, они могут быть классифицированы как

принадлежащие к одному и тому же виду (Richter et al., PNAS; 106:19126-19131 2009, включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме).

Использование генетически модифицированных бактерий.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к использованию генетически модифицированных бактерий согласно аспектам изобретения для метаболизации углеродсодержащего субстрата, необязательно, при выработке биохимического продукта.

В предпочтительных вариантах осуществления углеродсодержащим субстратом является CO и/или CO<sub>2</sub>. Соответственно, генетически модифицированные бактерии, описанные в настоящем документе, можно с успехом использовать в способах фиксации парниковых газов, таких как CO<sub>2</sub>, что может принести пользу окружающей среде.

Углеродсодержащие субстраты

Бактерии видов *Moorella* естественным образом способны расти, используя H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> или CO в качестве единственного источника углерода. Следовательно, для использования генетически модифицированных бактерий согласно изобретению для метаболизации CO и CO<sub>2</sub> не требуется никакой дополнительной генетической модификации.

Бактерии видов *Moorella* также естественным образом растут на других углеродсодержащих субстратах, включая ксилозу, фруктозу, метанол, глюкозу, арабинозу, маннозу, рамнозу и пируват.

Биохимические продукты

В вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированные бактерии согласно изобретению используются в выработке биохимических продуктов.

Биохимический продукт может быть выбран, например, из C1-C4спиртов, C1-C4кетонов, C1-C4альдегидов, C1-C4карбоновых кислот и любых их смесей. В некоторых вариантах осуществления биохимический продукт выбран из ацетата, ацетона, бутанона и этанола.

Для производства выбранного биохимического продукта генетически модифицированными бактериями согласно изобретению бактерии могут быть дополнительно генетически модифицированы путем введения в них одного или более ферментов, полезных для выработки выбранного биохимического продукта. Обычно производство биохимического продукта требует действия более чем одного фермента; это часто требует последовательного действия ряда ферментов, составляющих определенный путь биосинтеза. Фермент может быть любым охарактеризованным и секвенированным ферментом любого вида, о котором сообщалось в литературе, при условии, что он обеспечивает целевую активность. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой сверхэкспрессируемый ген, который является нативным для бактерии. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой функционально активный фрагмент или вариант фермента, который является гетерологичным или нативным для бактерии. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантный путь биосинтеза включает нокдаун или нокаут одного или более генов,

обычно с целью избежать конкурирующих реакций, снижающих выход целевого биохимического продукта. Чтобы функционировать в термофильной клетке-хозяине, фермент должен быть достаточно термостабильным. Однако он не обязательно должен быть получен из термофильного организма.

Введение ферментов в бактерии может происходить путем трансформации бактерий одним или более векторами, каждый из которых кодирует один или более ферментов под контролем промотора, который, как было описано выше для экспрессии варианта SinR, обеспечивает экспрессию генов на подходящем уровне, чтобы введение генов не приводило к перерасходу субстратов или энергии в клетке-хозяине. Трансформация может быть выполнена, как описано в других местах настоящего документа. Событие трансформации, заключающееся во введении в клетку ферментов для выработки выбранного биохимического продукта, может необязательно сочетаться с введением любых других векторов, соответствующих изобретению, таких как нокаутный вектор для *Spo0A* и/или вектор, кодирующий вариант SinR, если применимо. Некоторые гены могут быть объединены в одном векторе.

Ниже приведены четыре (предпочтительных) примера биохимических продуктов, которые могут быть получены согласно изобретению, а также ферментов, подходящих для их производства. Биохимические продукты или пути биосинтеза не следует рассматривать как ограничивающие, а просто как примеры.

Ацетат:

Будучи ацетогенами, бактерии видов *Moorella*, в том числе *M. thermoacetica*, естественным образом вырабатывают ацетат.

Ацетон:

Выработка ацетона у бактерий вида *Moorella*, а точнее у *M. thermoacetica*, может быть обеспечена путем введения в бактерии следующих ферментов: тиолазы (Thl), ацетатацетоацетил-КоА-трансферазы (CtfAB) и ацетоацетатдекарбоксилазы (Adc). См. номер доступа Genbank MW436696 для примера синтетического оперона, полезного для производства ацетона у *M. thermoacetica* (Zeldes et al., *Biotechnol. Bioeng.*;115:2951-2961 2018, Kato et al., *AMB Expr.*;11:59 2021). Специфический оперон включает гены, кодирующие Thl от *Caldanaerobacter subterraneus*, CtfAB от *Thermosiphon melanesiensis* и Adc от *Clostridium acetobutylicum*.

Бутанон:

Выработка бутанона у бактерий вида *Moorella*, а точнее у *M. thermoacetica*, может быть обеспечена путем введения в бактерии ферментов, катализирующих производство 2,3-бутандиола, и ферментов, превращающих полученный 2,3-бутандиол в бутанон. 2,3-бутандиол может быть получен путем превращения пирувата в ацетолактат, который затем превращается в 2,3-бутандиол через ацетоин, реакция, которая катализируется ферментами ацетолактатсинтазой (Als), ацетолактатдекарбоксилазой (Aldc) и 2,3-бутандиолдегидрогеназой (Bdh). Превращение 2,3-бутандиола в бутанон может затем происходить под действием диолгидратазы (pduC, pduD и pduE), изначально

обнаруженной в таких штаммах, как *Lactobacillus reuteri* (Ghiaci et al., Plos One;9(7):e102774 2014). Второй способ получения бутанона заключается в слиянии пропионил-КоА с ацетил-КоА с образованием 3-кетовалерил-КоА с помощью смешанных  $\beta$ -кетотиолаз, а затем превращение 3-кетовалерил-КоА в бутанон под действием ацетоацетил-КоА:ацетат/бутират:КоА-трансферазы (CftAB) и ацетоацетатдекарбоксилазы (Adc), обычно экспрессируемых в АВЕ-продуцирующих *Clostridia* (Srirangan et al., Biotechnology;82:2574-2584, 2016).

Этанол:

Выработка этанола бактериями вида *Moorella*, а точнее, *M. thermoacetica*, может быть обеспечена либо с помощью бифункционального фермента альдегид/алкогольдегидрогеназы (AdhE), превращающего ацетил-КоА в этанол, либо путем восстановления ацетата до ацетальдегида и далее до этанола посредством фермента альдегид:ферредоксиноксидоредуктазы (AOP) и алкогольдегидрогеназы (Liew et al., Metab. Eng.;40:104-114 2017).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

#### ПРИМЕР 1

Удаление *Spo0A* увеличивает скорость роста *M. thermoacetica*.

Была сконструирована кольцевая нокаутная плаزمида для удаления гена *spo0A* у *M. thermoacetica* путем гомологичной рекомбинации.

Основа плазмиды представляла собой рК18, содержащую репликон рМВ1 *E. coli*, который не является функциональным у *M. thermoacetica*, и мезофильный маркер устойчивости к канамицину. Две гомологичные области размером по 1 т.п.н. выше и ниже *spo0A* *M. thermoacetica* фланкировали термофильный маркер устойчивости *kanR* под контролем нативного конститутивного промотора PG3PD *M. thermoacetica* (карта плазмиды показана на Фиг. 2). Плазмиду конструировали путем амплификации фрагментов с помощью ПЦР (с полимеразой высокой точности) с праймерами, перечисленными в Таблице 2. Фрагменты собирали методом Гибсона (New England Biolabs). После того как плаزمида была сконструирована и проверена секвенированием, плазмиду переносили в штамм для наращивания, также обеспечивающий подходящее метилирование ДНК.

Таблица 2: Список праймеров, использованных в этом эксперименте

SEQ ID NO	Название	Последовательность праймера
5	Spo0A_UP_fo	ACGCTATAGGGGTCTTCTTG
6	Spo0A_up_re	AAAAGTTTTGGTTATCCTACACAAAATACC
7	PG3PD_prom_fo_gib	TATTTTGTGTAGGATAACCAAACTTTTGGAC GGTAAGGACGGTTGCCAAGTACCGGG

8	PG3PD_prom_re	TGATATTCTCATTTTAGCCATTATGTA CTCCTCCTTATATTTATTGTAAC
9	KanR_fo	TTACAATAAATATAAGGAGGAGTACATAATGG CTAAAATGAGAATATCAC
10	KanR_re_gib	TTTCCCCCTCTAACCTCCTACAGTTGCGGATGT ACTTCAGAAAAG
11	Spo0A_DN_fo	AGGAGGTTAGAGGGGGAAAC
12	Spo0A_DN_re	TTAAAACCAGGGCCTTCTCC
13	pK18_backbone_fo	GGAGAAGGCCCTGGTTTAAACAGTCGACCTGC AGGCATGCAAGCTTGG
14	pK18_backbone_re	AAGAAGACCCCTATAGCGTAGAGGATCCCCGG GTACCG
15	Spo0A_DN_ext_250b p	AAGCCGATAGAAAAGAAATCCCC
16	Spo0A_UP_ext_250bp	AATGTACTCTACGGTGGCC
17	Kan_Seqfo	AGCAATCTGCTCATGAGTGAG
18	Kan_Seq RE	TGAAAGAGCCTGATGCACTC

*M. thermoacetica* ATCC 39073 культивировали во флаконах с сывороткой емкостью 100 мл (заполненных на 50%), закрытых бутилкаучуковыми пробками (флаконы и пробки: Ochs, Германия) в соответствии с ранее опубликованными методами (Daniel et al., J. Bacteriol.;172:4464-4471 1990, Redl et al., Front. Microbiol.;10 [3070] 2020). Однако среду модифицировали путем замены буферной системы на 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES) и использования фруктозы в качестве источника углерода (конечная концентрация 60 мМ). Среда имела следующий состав (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,4);  $\text{NaCl}$  (0,4); MES (20); дрожжевой экстракт (0,5); В среду добавляли 1% раствор микроэлементов. Раствор микроэлементов готовили с использованием нитрилтриуксусной кислоты 2 г/л; pH довели до 6 с помощью KOH и с добавлением следующих соединений (в мг/л):  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1000);  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (800);  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (200);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (200);  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20);  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20);  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  (20);  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (20). pH культуральной среды довели до 6,5, промывали  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (80:20) и автоклавировали при 140°C в течение 40 мин. После автоклавирования добавляли следующие исходные растворы:  $\text{CaCl}_2$  (конечная концентрация 50 мг/л),  $\text{MgCl}_2$  (конечная концентрация 330 мг/л), витаминный раствор (1%), цистеин-HCl (конечная концентрация 1 мМ). Витаминный раствор содержал следующее (мг/л): биотин (2); фолиевая кислота (2); пиридоксин-HCl (10); тиамин-HCl (5); рибофлавин (5); никотиновая кислота (5); D-(+)-пантотенат кальция (5); витамин B12 (0, 5); п-аминобензойная кислота

(5); тиоктовая кислота (5). Перед инокуляцией среду предварительно нагревали. Штаммы культивировали при 60°C и перемешивали. Твердая среда содержала 1% Гельзан™, CaCl<sub>2</sub> (100 мг/л), MgCl<sub>2</sub> (660 мг/л), среду стерилизовали при 120 °C в течение 20 мин.

Перед электропорацией клетки выращивали до экспоненциальной фазы, собирали центрифугированием и дважды промывали в буферах (5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/270 mM сахарозы). Примерно 1 мкг плазмидной ДНК трансформировали в клетки электропорацией. Условия электропорации были следующими: 1,5 кВ, 500 Ом с использованием Bio-Rad Gene Pulser™ и кюветы с зазором 0,2 см (Продукт компании Bio-Rad Laboratories, Inc.). См. Kita et al. (J. Biosci. Bioeng.;115:347-352 2013) для более подробной информации. Восстановление после электропорации проводили в среде, как описано выше, но с повышенной концентрацией дрожжевого экстракта (10 г/л). Выделение проводили в течение ночи, после чего 100 мкл культуры (в различных разведениях) высевали на твердую среду с 400 мкг/мл канамицина. Инкубацию проводили в анаэробных условиях при температуре 60°C в течение 4-7 дней до появления колоний на чашках. Колонии тестировали на интеграцию с помощью ПЦР с использованием 4 наборов праймеров (spo0A\_up\_ext\_250bp - spo0A\_dn\_ext\_250bp, spo0A\_up\_ext\_250bp - Kan\_Seq re, Kan\_Seqfo - spo0A\_dn\_ext\_250bp и Kan\_Seq re - Spo0A\_UP\_fo (ext-ext, ext-int, int-ext и int-int, соответственно). Положительные колонии культивировали в жидкой среде с 100 мкг/мл канамицина.

Для дальнейшей проверки трансформации из культуры извлекли гДНК и секвенировали весь геном. Таким образом, было подтверждено, что ген *spo0A* был заменен кассетой *kanR*.

Культивирование штаммов WT и Δ*spo0A* проводили в среде, как описано ранее. После входа в стационарную фазу роста образцы отбирали и исследовали визуально под микроскопом (Leica DM5000). Было ясно, что обе культуры удивительным образом образовывали споры. Это было дополнительно подтверждено окрашиванием спор малахитовым зеленым. Малахитовый зеленый 0,5% (мас./об.) водного раствора добавляли на предметное стекло микроскопа с фиксированными бактериальными клетками. Предметное стекло помещали в кипящую воду, чтобы малахитовый зеленый проник в споры. После охлаждения (до комнатной температуры) излишки красителя смывали водой. Окрашенные споры идентифицировали с помощью микроскопа (Leica DM5000). В обеих культурах наблюдались явно окрашенные в зеленый цвет споры.

Для дальнейшего изучения эффекта делеции оба штамма культивировали (в трех экземплярах) с онлайн-мониторингом оптической плотности культуры при длине волны 600 нм. Кривые роста показаны на Фиг. 3. Неожиданно фенотип *M. Thermoacetica* Δ*spo0A* был охарактеризован как имеющий значительно более высокую скорость роста (более короткое время удвоения), как видно на Фигуре и в скоростях роста, представленных в Таблице 3.

Таблица 3: Скорость роста штаммов

Штамм	Скорость роста
$\Delta spo0A$	$0,157 \pm 0,016 \text{ ч}^{-1}$
WT	$0,104 \pm 0,006 \text{ ч}^{-1}$

Оценка значимости с помощью t-критерия (с доверительным интервалом 0,05) показала, что  $\Delta spo0A$  растет значительно быстрее, чем дикий тип.

#### ПРИМЕР 2

Изменение в аминокислотной последовательности SinR *M. thermoacetica*

Было проведено исследование эволюции *M. thermoacetica* 39073-НН с целью создания штаммов, менее склонных к споруляции. Культуру культивировали в среде (такой же, как описано в Примере 1) с использованием 2,5 г/л дрожжевого экстракта и инкубировали при 60°C. Чтобы применить давление отбора, культуру повторно инокулировали в свежую среду, как только она достигала стационарной фазы (обычно через 4 дня), используя 2% инокулята. Этот подход продолжался до тех пор, пока культура не эволюционировала примерно в 2500 поколений (14 переносов).

Характеризацию культуры, выращенной в среде и в условиях, использованных в ходе эволюции, проводили с помощью микроскопии, окрашивания спор малахитовым зеленым (см. описание в Примере 1) и образования биомассы (измерениями оптической плотности). Эволюционировавшая культура не имела нарушения споруляции, а образование биомассы было сходным с таковым у неэволюционировавшего штамма. При хранении культуры в инкубаторе в течение более длительного периода и рекультивации штамма было обнаружено, что штамм неожиданно стал метаболически активным сразу после нахождения в состоянии покоя в течение более 25 дней, в отличие от дикого типа, который имел значительную лаг-фазу; обычно через 1-3 дня после пребывания в состоянии покоя.

Для оценки генетических изменений, произошедших в ходе эволюции, культуру в различных разведениях (чтобы обеспечить рост одиночных колоний) высевали на плотную среду и инкубировали в анаэробных условиях в течение 7 дней при температуре 60°C. Шесть одиночных колоний собирали и культивировали в жидкой среде. После 2 дней инкубации клетки центрифугировали и геномную ДНК экстрагировали из отдельных культур с использованием набора для очистки геномной ДНК Wizard® (Promega, Мэдисон, Висконсин, США), а экстрагированную ДНК растворяли в 10 mM Tris-Cl. pH 8,5. Количественную оценку ДНК проводили с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit с флуориметром Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). ДНК использовали для создания библиотек секвенирования Illumina. Секвенирование проводили с использованием системы MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов), как рекомендовано производителем (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США), что привело к считыванию парных концов 2×300 п.о. Доминантные мутации были идентифицированы путем сопоставления с эталонной последовательностью генома. Единственной мутацией, связанной с состоянием



клетки, была мутация V198F в гене, кодирующем SinR.

Эволюционировавший штамм имел ненарушенную споруляцию, однако дикий тип (несущий SinR\_198V) был наиболее склонен к образованию спор, а морфология клеток была более округлой вместо отчетливых палочек. Эволюционировавший штамм с 198F имел более отчетливую морфологию палочковидной формы и был склонен к агрегации. При использовании в качестве инокулята на свежую среду культура с SinR\_198F имела значительно более короткую лаг-фазу.

Анализ структуры белка SinR *M. thermoacetica* показывает, что он напоминает SinR *Bacillus*, хотя эти два белка не идентичны. Выравнивание последовательностей третьего домена НТН из SinR у *M. thermoacetica* и SinR из *Bacillus subtilis* с использованием двух разных алгоритмов выравнивания. Безотносительно к теории, это предполагает, что V198 у *M. thermoacetica* может быть эквивалентен либо T60, либо L61 у *B. subtilis*. SinR в *B. subtilis* имеет определенную кристаллическую структуру, что позволяет проводить дальнейший анализ изменений связывания с другими белками или олигомеризации. Проверка структуры комплекса SinR-SinI из *B. subtilis*, как олигомеризации SinR, так и связывания SinI (связывание SinI имитирует взаимодействие олигомеризации (Bai et al., *Genes Dev.*; 7:139-148, 1993, Lewis et al., *J. Mol. Biol.*;283:907-912 1998)), показывает, что T60 и L61 находятся в интерфазе между НТН-доменом и доменом олигомеризации (Фиг. 4). Боковая цепь L61 обращена внутрь мотива спираль-поворот-спираль, и ее мутация в Phe (F) приводит к стерическим столкновениям и, вероятно, к дестабилизации белка (Фиг. 4C). Боковая цепь T60 обращена к домену олигомеризации и образует две водородные связи с E14 из SinI (Фиг. 4Г, слева). Мутация T60 в F вероятно устранит способность образования водородных связей и приведет к стерическим столкновениям между SinR и SinI, что, скорее всего, приведет к снижению аффинности (Фиг. 4D, посередине и слева).

Структурный анализ показал, что L61 обращен к ядру белка SinR, и поэтому ожидается, что мутация в L61 дестабилизирует SinR. T60 сталкивается с интерфазой взаимодействия SinI, и поэтому ожидается, что мутация в этом остатке повлияет на аффинность взаимодействия SinR-SinI. Чтобы подтвердить эти гипотезы и идентифицировать другие мутации, которые, по прогнозам, будут иметь аналогичный эффект либо на стабильность белка SinR, либо на аффинность взаимодействия SinI, были применены два разных биоинформатических инструмента: (i) Сервер PremPS (Chen et al., *PLOS Comp. Biol.*;16:e1008543 2020) использовался для расчета прогнозируемого влияния на стабильность белка SinR, и (ii) сервер mCSM-PPI2 (Rodrigues et al., *Nucleic Acids Res.*;47:W338-W344 2019) использовался для расчета прогнозируемого влияния на аффинность взаимодействия SinI. В обоих случаях были спрогнозированы эффекты всех возможных мутаций как в T60, так и в L61.

Биоинформационные прогнозы мутации в L61 (Таблица 4) предполагают, что мутация в этом положении оказывает большое влияние на стабильность белка, тогда как влияние на аффинность взаимодействия SinI менее выражено. Это согласуется со структурным анализом, показывающим, что L61 обращен к ядру белка и не является

частью сайта взаимодействия SinI. На основании этих наблюдений ожидается, что основным фактором, вносящим вклад в любые фенотипические эффекты, наблюдаемые при мутации L61, является стабильность белка. Анализ отдельных мутаций в L61 показывает, что все мутации, по прогнозам, будут дестабилизирующими, при этом L61F будет наименее дестабилизирующей (прогнозируемая  $\Delta\Delta G_{\text{стабильность}}$  (ккал/моль)=0,15), а L61S является наиболее дестабилизирующей (прогнозируемая  $\Delta\Delta G_{\text{стабильность}}$  (ккал/моль)=2,77). Если, как предполагалось предыдущим выравниванием последовательностей, V198 SinR у *M. thermoacetica* гомологичен L61 у *Bacillus*, можно ожидать, что мутация V198 на любую аминокислоту дестабилизирует SinR *M. thermoacetica* и, следовательно, будет иметь фенотипический эффект, аналогичный наблюдаемому для V198F.

Вопреки тому, что было спрогнозировано для L61, было спрогнозировано, что мутация в T60 будет иметь большое влияние на аффинность взаимодействия между SinR и SinI, тогда как влияние на стабильность белка было спрогнозировано менее выраженным (Таблица 5). Этого и следовало ожидать из структурного анализа, поскольку T60 находится в интерфазе взаимодействия SinR-SinI и обращен к поверхности SinR. Учитывая эти результаты, ожидается, что первичный фенотипический эффект мутации в T60 будет обусловлен изменениями аффинности к SinI. Оценка отдельных мутаций показывает, что две мутации, T60D и T60E, по прогнозам, будут увеличивать аффинность к SinI. Это легко объяснить при рассмотрении смоделированных мутантных структур, где и аспарат, и глутамат образуют несколько новых полярных и водородных связей с SinI. Предполагается, что оставшаяся часть мутаций (все остальные аминокислоты, кроме аспартата и глутамата) уменьшит аффинность к SinI. Это хорошо согласуется со структурным анализом, в котором было обнаружено, что боковая цепь T60 образует две водородные связи с E14 из SinI. Мутация T60 удаляет способность водородных связей, уменьшая аффинность между SinR и SinI. Если, как предполагалось предыдущим выравниванием последовательностей, V198 SinR у *M. thermoacetica* гомологичен T60 у *Bacillus*, можно ожидать, что мутация V198 на любую аминокислоту, за исключением аспартата и глутамата, уменьшит аффинность взаимодействия SinR-SinI и, следовательно, будет иметь фенотипический эффект аналогичен наблюдаемому для V198F.

Таблица 4: Прогнозируемое влияние на характеристики белка при сайт-насыщенном мутагенезе L61 в SinR *Bacillus*

Мутация	Прогнозируемая $\Delta\Delta G_{\text{стабильность}}$ (ккал/моль)	Прогнозируемое влияние на стабильность белка SinR	Прогнозируемая $\Delta\Delta G_{\text{аффинность}}$ (ккал/моль)	Прогнозируемое влияние на аффинность для SinI/R

<b>Стабилизирующие мутации в SinR</b>				
Нет				
<b>Умеренно дестабилизирующие (&lt;1 ккал/моль) мутации в SinR</b>				
L61F	0,15	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее	0,69	Увеличение
<b>Дестабилизирующие (&lt;1 ккал/моль) мутации в SinR</b>				
L61H	1,17	Дестабилизирующее	0,5	Увеличение
L61M	1,18	Дестабилизирующее	-0,77	Уменьшение
L61V	1,37	Дестабилизирующее	-0,79	Уменьшение
L61Y	1,47	Дестабилизирующее	0,17	Увеличение
L61C	1,75	Дестабилизирующее	-0,77	Уменьшение
L61W	1,78	Дестабилизирующее	0,01	Нейтральное
L61T	2,41	Дестабилизирующее	-0,58	Уменьшение
L61A	2,53	Дестабилизирующее	-0,85	Уменьшение
L61P	2,67	Дестабилизирующее	-0,81	Уменьшение
L61R	2,68	Дестабилизирующее	-0,59	Уменьшение
L61E	2,7	Дестабилизирующее	-0,68	Уменьшение
L61H	2,7	Дестабилизирующее	-0,50	Уменьшение
L61K	2,71	Дестабилизирующее	-0,60	Уменьшение
L61N	2,72	Дестабилизирующее	-0,52	Уменьшение
L61Q	2,73	Дестабилизирующее	-0,64	Уменьшение
L61D	2,74	Дестабилизирующее	-0,56	Уменьшение
L61G	2,75	Дестабилизирующее	-0,87	Уменьшение
L61S	2,77	Дестабилизирующее	-0,548	Уменьшение

Таблица 5: Прогнозируемое влияние на характеристики белка при сайт-насыщенном мутагенезе T60 в SinR *Bacillus*

Мутация	Прогнозируемая $\Delta\Delta G^{\text{аффинность}}$ (ккал/моль)	Прогнозируемое влияние на аффинность для SinI/R	Прогнозируемая $\Delta\Delta G^{\text{стабильность}}$ (ккал/моль)	Прогнозируемое влияние на стабильность белка SinR
<b>Мутации, увеличивающие аффинность для SinI/R</b>				
T60D	1,32	Увеличение	0,12	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60E	0,23	Увеличение	0,07	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее

<b>Мутации, уменьшающие аффинность для SinI/R</b>				
T60N	-1,132	Уменьшение	0,53	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60W	-0,588	Уменьшение	0,25	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60K	-1,182	Уменьшение	0,58	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60P	-1,21	Уменьшение	0,69	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60F	-0,84	Уменьшение	-0,35	Нейтральное/Mildly stabilising
T60Y	-0,58	Уменьшение	-0,93	Нейтральное/Mildly stabilising
T60C	-1,261	Уменьшение	0,48	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60H	-0,623	Уменьшение	0,46	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60Q	-1,184	Уменьшение	0,33	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60G	-1,067	Уменьшение	0,75	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60L	-1,067	Уменьшение	0,2	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60I	-0,966	Уменьшение	0,19	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60M	-1,136	Уменьшение	0,16	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60K	-1,381	Уменьшение	0,58	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60A	-0,446	Уменьшение	0,52	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60V	-0,503	Уменьшение	0,17	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее
T60S	-1,143	Уменьшение	0,28	Нейтральное/Умеренно дестабилизирующее

## Список литературы

- Alsaker, K. V., Spitzer, T. R., and Papoutsakis, E. T. (2004). Transcriptional analysis of *spo0A* overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress. *J. Bacteriol.* 186(7):1959-71. doi: 10.1128/JB.186.7.1959-1971.2004.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I., and Smith, I. (1993). SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Devel.* 7(1):139-148. doi: 10.1101/gad.7.1.139
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., and Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: the principal factor in the «metabolic burden» associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 35:668-681.
- Beste, D. J. V., Espasa, M., Bonde, B., Kierzek, A. M., Stewart, G. R., McFadden, J. (2009). The genetic requirements for fast and slow growth in *Mycobacteria*. *PLoS ONE* 4(4): e5349. doi: 10.1371/journal.pone.0005349
- Brown, D. P., Ganova-Raeva, L., Green, B. D., Wilkinson, S. R., Young, M., and Youngman, P. (1994). Characterization of Spo0A homologues in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a probable DNA-binding domain. *Mol. Microbiol.* 14:411-426. doi: 10.1111/J.1365-2958.1994.TB02176.X
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., and Losick, R. (2008). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 67(2):254-263. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x
- Chai, Y., Kolter, R., and Losick, R. (2009). Paralogous anti-repressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 74:876-887. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06900.x
- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R., and Losick, R. (2010). An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 24:754-765. doi: 10.1101/gad.1915010
- Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E. H., and Wren, B. W. (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. *PLoS One.* 7:e50527.
- Diallo, M., Kengen, S. W. M., and López-Contreras, A. M. (2021). Sporulation in solventogenic and acetogenic clostridia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105:3533-3557.
- Fischer, E., and Sauer, U. (2005). Large-scale *in vivo* flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism. *Nat. Genet.* 37(6):636-640. issn: 10614036. doi: 10.1038/ng1555
- Harris, L. M., Welker, N. E., and Papoutsakis, E. T. (2002). Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* 184(13):3586-3597. doi: 10.1128/JB.184.13.3586
- Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S., and Papoutsakis, E. T. (2008). The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol.* 9(7). issn: 14747596. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-r114
- Karlin, S., Mrazek, J., Campbell, A., and Kaiser, D. (2001). Characterizations of highly expressed genes of our fast-growing bacteria. *J. Bacteriol.* 183:5025-5040. doi:

10.1128/jb.183.17.5025-5040.2001

Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R., and Losick, R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 55:739-749. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04440.x

Kiriukhin, M., and Tyurin, M. (2013). Expression of amplified synthetic ethanol pathway integrated using Tn7-tool and powered at the expense of eliminated pta, ack, spo0A and spo0J during continuous syngas or CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> blend fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 114:1033-1045. doi: 10.1111/jam.12123

Lewis, R. J., Brannigan, J. A., Offen, W. A., Smith, I., and Wilkinson, A. J. (1998). An evolutionary link between sporulation and prophage induction in the structure of a repressor:anti-repressor complex. *J. Mol. Biol.* 283(5):907-912. doi: 10.1006/jmbi.1998.2163

Milton, M. E., Draughn, G. L., Bobay, B. G., Stowe, S. D., Olson, A. L., Feldmann, E. A., Thompson, R. J., Myers, K. H., Santoro, M. T., Kearns, D. B., and Cavanagh, J. (2020). The solution structures and interaction of SinR and SinI: Elucidating the mechanism of action of the master regulator switch for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 432(2):343-357. doi: 10.1016/j.jmb.2019.08.019

Molle, V., Fujita, M., Jensen, S. T., Eichenberger, P., González-Pastor, J. E., Liu, J. S., and Losick, R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 50(5):1683-1701. issn: 0950382X. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x

Pettit, L. J., Browne, H. P., Yu, L., Smits, W. K., Fagan, R. P., Barquist, L., et al. (2014). Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism. *BMC Genomics.* 15:160.

Redl, S., Poehlein, A., Esser, C., Bengelsdorf, F. R., Jensen, T. Ø., Jendresen, C. B., Tindall, B. J., Daniel, R., Dürre, P., and Nielsen, A. T. (2020). Genome-based comparison of all species of the genus *Moorella*, and status of the species *Moorella thermoacetica* and *Moorella thermoautotrophica*. *Front. Microbiol.* 10:3070.

Sandoval, N.R., Venkataramanan, K.P., Groth, T.S., and Papoutsakis, E. T. (2015). Whole-genome sequence of an evolved *Clostridium pasteurianum* strain reveals Spo0A deficiency responsible for increased butanol production and superior growth. *Biotechnol. Biofuels* 8:227. doi: 10.1186/s13068-015-0408-7

Seo, S., Wang, Y., Lu, T., Jin, Y., and Blaschek, H. P. (2016). Characterization of a *Clostridium beijerinckii* spo0A mutant and its application for butyl butyrate production. *Biotechnol. Bioengineer.* 114:106-112. doi: 10.1002/BIT.26057

Shi, L., Derouiche, A., Pandit, S., Rahimi, S., Kalantari, A., Futo, M., Ravikumar, V., Jers, C., Mokkaṭpati, V. R. S. S., Vlahoviček, K., and Mijakovic, I. (2020). Evolutionary analysis of the *Bacillus subtilis* genome reveals new genes involved in sporulation. *Mol. Biol. Evol.* 37(6):1667-1678. doi: 10.1093/molbev/msaa035

Smith, M. A., and Bidochka, M. J. (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can. J. Microbiol.* 44:351-355.

Spigelman, G., Hoy, B. V., Perego, M., Day, J., Trach, K., and Hoch, J. A. (1990)

Structural alterations in the *Bacillus subtilis* SpoOA regulatory protein which suppress mutations at several *spo0* loci. J. Bacteriol. 172(9):5011-5019. doi: 0021-9193/90/095011-09\$02.00/0

van der Veen, D., Lo, J., Brown, S.D., Tschaplinski, T. J., Martin, M., Engle, N. L., van den Berg, R. A., Argyros, A. D., Caiazza, N. C., Guss, A. M., and Lynd, L. R. (2013). Characterization of *Clostridium thermocellum* strains with disrupted fermentation end-product pathways. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 40:725-734. doi: 10.1007/s10295-013-1275-5

Zingaro, K. A., and Papoutsakis, E. T. (2012). Toward a semisynthetic stress response system to engineer microbial solvent tolerance. mBio. 3(5):e00308-12. doi:10.1128/mBio.00308-12

WO 2009/137778 A2 (Univ. Northwestern)

WO 2010/052499A1 (TMO Renewables Ltd.)

WO 2010/098679 A1 (Lanzatech New Zealand Ltd.)

WO 2011/019717 A1 (Mascoma Corp.)

WO 2020/157487 A2 (Univ. of Nottingham)

DATABASE UniProt [Online] 24 January 2006 (2006-01-24), «SubName: Full=Transcriptional regulator, XRE family {EC0:00003131EMBL:ABC19929.1}», XP55887769, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q2R110. Database accession no. Q2R110

DATABASE EMBL [Online] 12 June 2019 (2019-06-12), «Moorella thermoacetica HTH-type transcriptional regulator SinR ID -QDA00892; SV 1; linear; genomic DNA; STD; PRO; 903 BP.», XP55887763, retrieved from EBI accession no. EMBL:QDA00892

DATABASE UniProt [Online] 1 October 1996 (1996-10-01), «RecName: Full=Stage 0 sporulation protein A homolog;», XP55887802, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P52941. Database accession no. P52941

Каждая ссылка, указанная ниже или описанная где-либо в настоящем документе, включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения скорости роста бактерии, принадлежащей к виду *Moorella*, включающий введение в бактерию одной или более генетических модификаций для уменьшения или устранения экспрессии и/или активности гомолога белка А споруляции стадии 0 (Spo0A) в бактерии.

2. Способ по п. 1, где одна или более генетических модификаций включает генетическую модификацию, которая снижает или устраняет экспрессию белка Spo0A в бактерии.

3. Способ по любому из пп. 1 и 2, где ген *spo0A* удален.

4. Способ по любому из пп. 1-3, дополнительно включающий введение в бактерию одной или более генетических модификаций для экспрессии варианта SinR в бактерии, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, предпочтительно, где указанная аминокислота представляет собой F, I, Y или W, более предпочтительно, где указанная аминокислота представляет собой F, и где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2.

5. Способ уменьшения продолжительности лаг-фазы и/или увеличения скорости роста бактерии, принадлежащей к виду *Moorella*, включающий введение в бактерию одной или более генетических модификаций для экспрессии варианта транскрипционного регулятора SinR НТН-типа (SinR) в бактерии, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от валина (V), в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2.

6. Способ по любому из пп. 4 и 5, где аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой фенилаланин (F), изолейцин (I), тирозин (Y) или триптофан (W).

7. Способ по п. 6, где аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой F.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где вид *Moorella* выбран из

(a) *Moorella thermoacetica*;

(b) *Moorella thermoautotrophica*;

(c) бактериального штамма, имеющего среднюю нуклеотидную идентичность на основе показателя выравнивания MUMmer (ANI<sub>m</sub>), по меньшей мере, примерно 96,5% по сравнению со штаммом *M. thermoacetica* DSM 512<sup>T</sup>;

(d) бактериального штамма, имеющего среднюю нуклеотидную идентичность на основе показателя выравнивания MUMmer (ANI<sub>m</sub>), по меньшей мере, примерно 96,5% по сравнению со штаммом *M. thermoacetica* DSM 2955<sup>T</sup>; и



(e) комбинации (a) и (b); (a) и (c); (a) и (d); (a), (b) и (c), или всех (a) - (d).

9. Генетически модифицированная бактерия, полученная или получаемая способом по любому из пп. 1-8.

10. Бактерия, принадлежащая к видам *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия была генетически модифицирована для снижения или устранения экспрессии и/или активности Spo0A в бактерии, где экспрессия и/или активность снижены относительно его экспрессии и/или активности у *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica* дикого типа.

11. Бактерия, принадлежащая к видам *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия была генетически модифицирована для включения трансгена, кодирующего вариант SinR, где вариант SinR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержит аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, и где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2.

12. Бактерия, принадлежащая к видам *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica*, где бактерия

(a) включает вариант SinR, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержащий аминокислоту, отличную от V, в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, где вариант SinR предусматривает уменьшенную продолжительность лаг-фазы и/или повышенную скорость роста бактерии по сравнению с SEQ ID NO: 2, и

(b) имеет сниженную или устраненную экспрессию и/или активность Spo0A, где экспрессия и/или активность снижены относительно его экспрессии и/или активности в *M. thermoacetica* и/или *M. thermoautotropica* дикого типа.

13. Бактерия по любому из пп. 10 и 12, где ген *spo0A* удален.

14. Бактерия по любому из пп. 11 и 12, где аминокислота в положении, соответствующем положению 198 в SEQ ID NO: 2, представляет собой F.

15. Применение бактерии по любому из пп. 9-14 для метаболизации углеродсодержащего субстрата, необязательно при выработке биохимического продукта.

16. Применение по п. 15, где

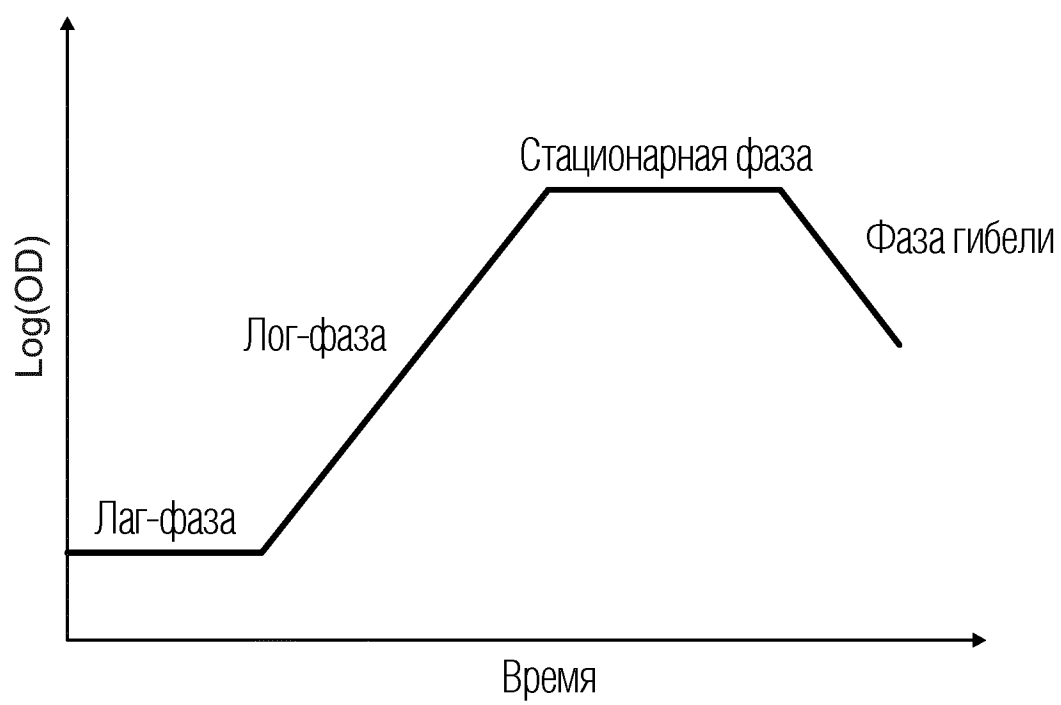
i) углеродсодержащим субстратом является CO и/или CO<sub>2</sub>,

ii) биохимический продукт выбран из C1-C4спирта, C1-C4кетона, C1-C4альдегида, C1-C4карбоновой кислоты и любой их смеси, или

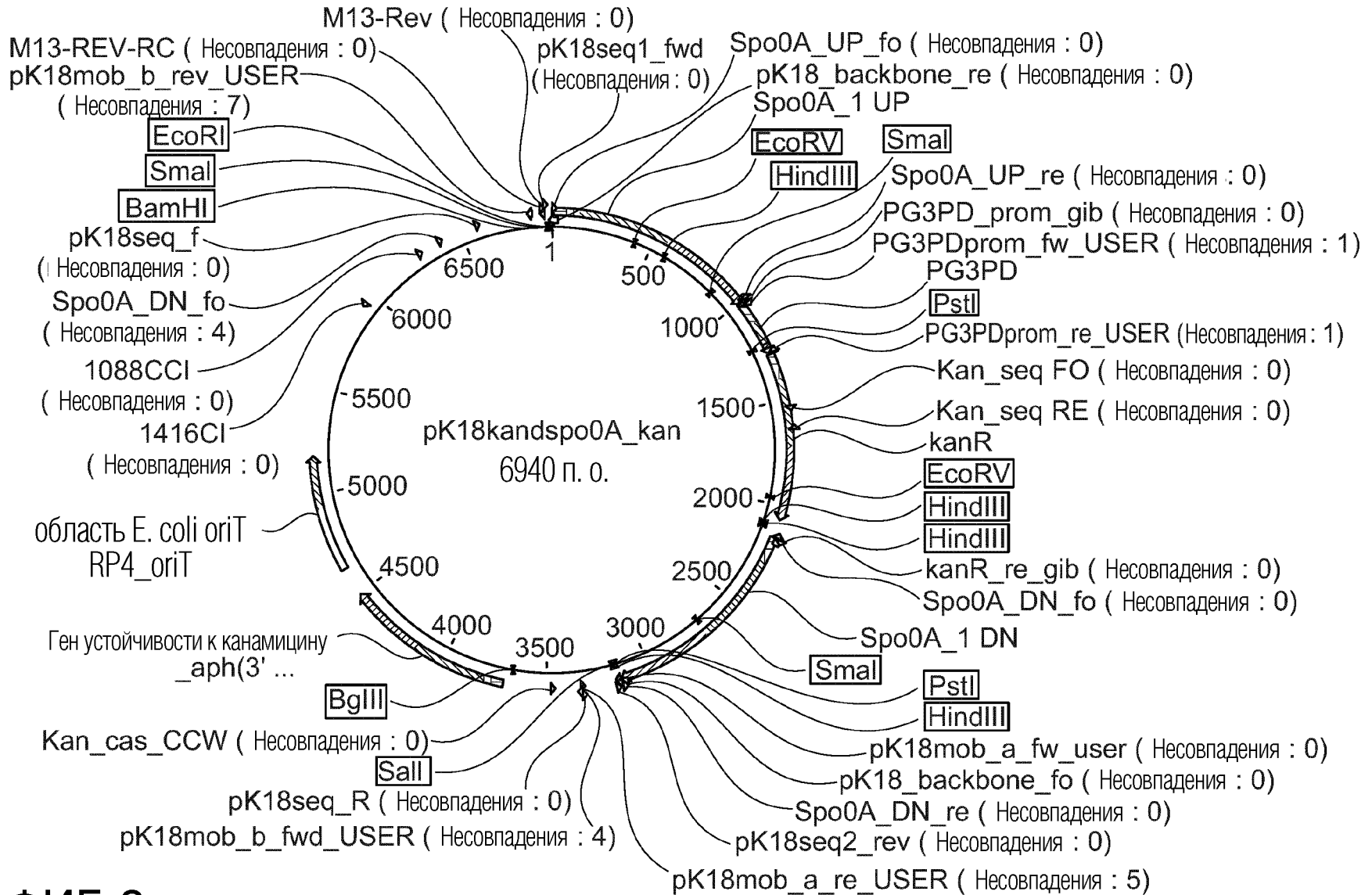
iii) обоих i) и ii).

17. Способ по любому из пп. 1-8, бактерия по любому из пп. 9-14 или применение по любому из пп. 15 и 16, где бактерия представляет собой штамм *M. thermoacetica* ATCC 39073 или штамм полученный из него, такой как штамм *M. thermoacetica* 39073-НН.

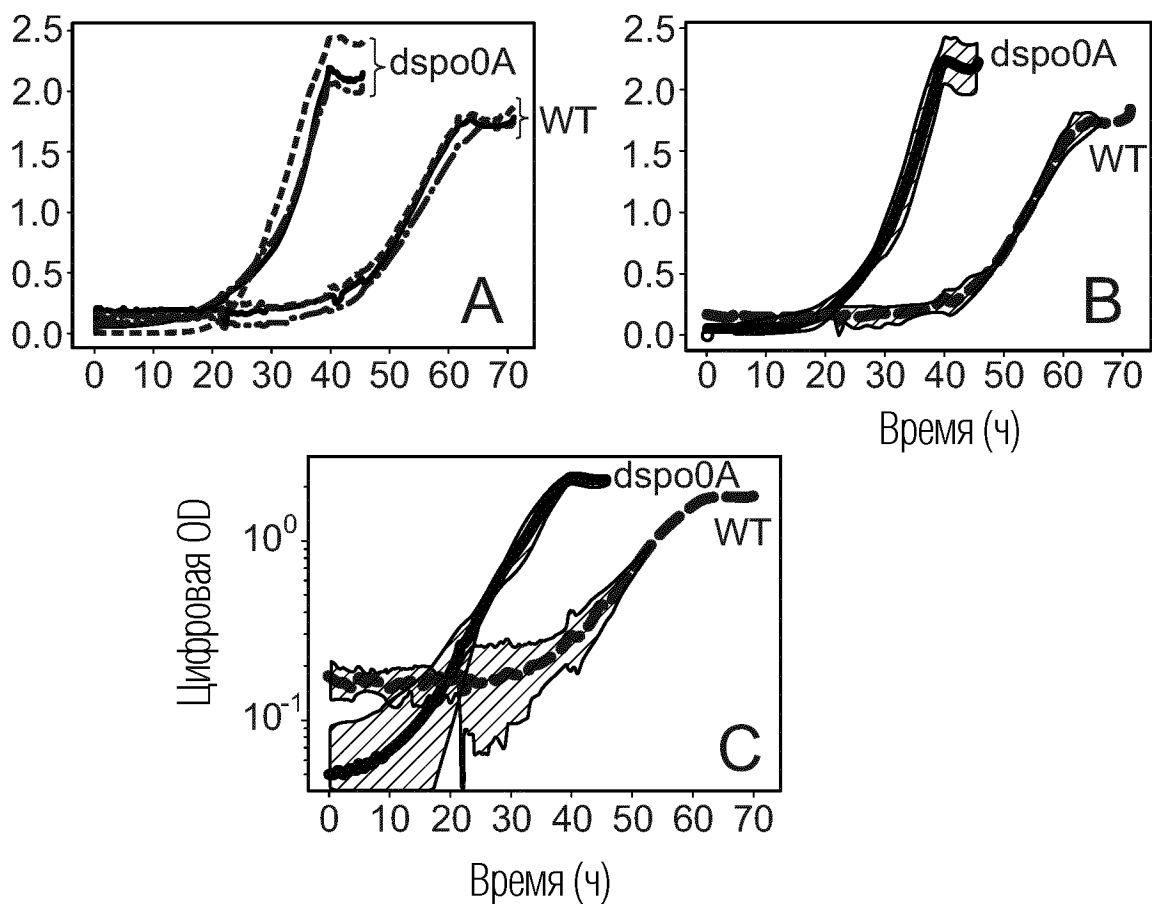
По доверенности



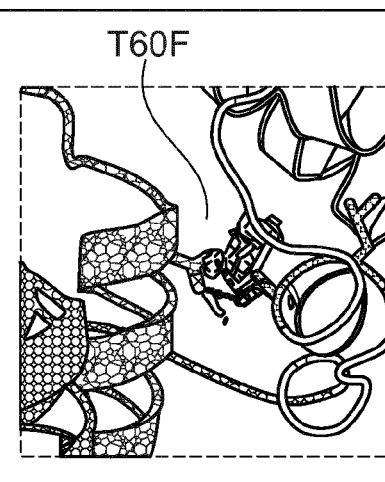
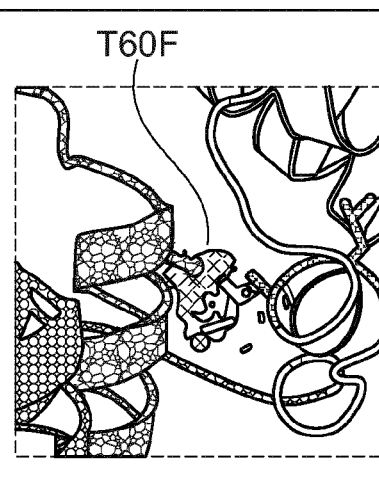
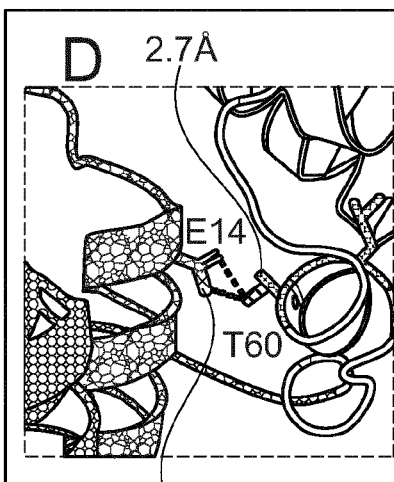
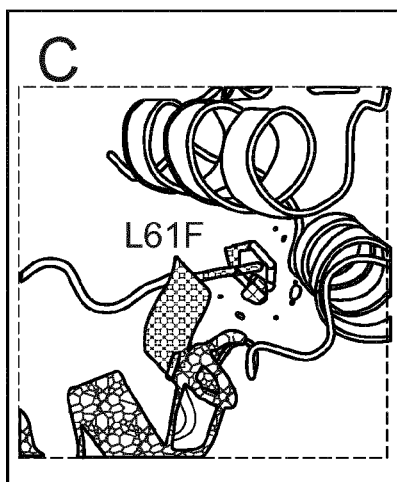
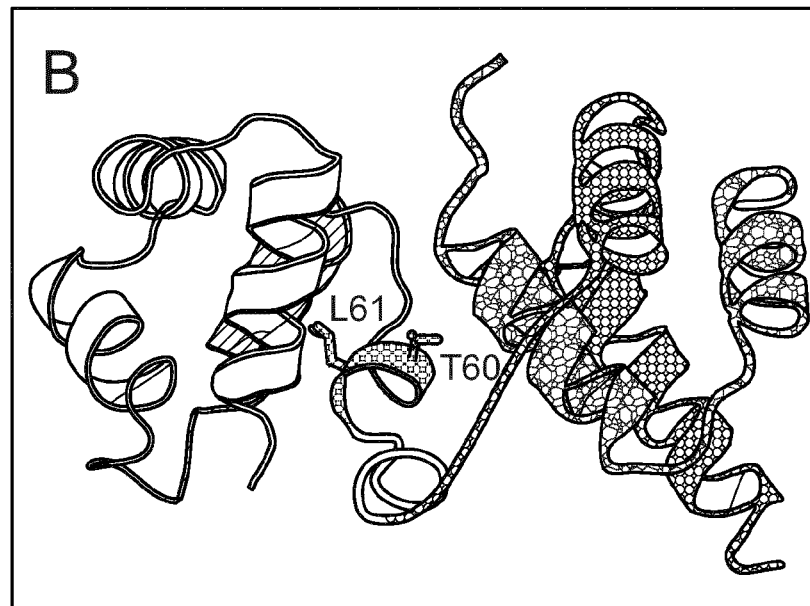
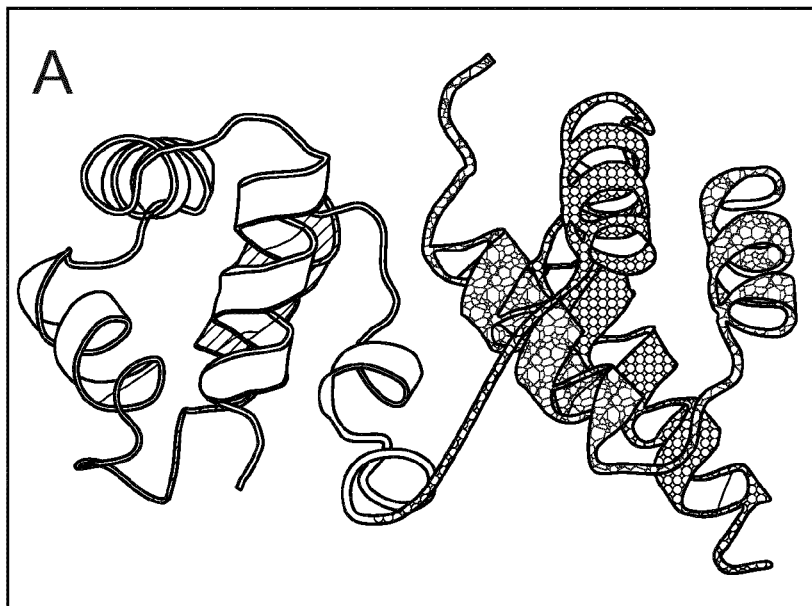
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



3.1Å

ФИГ. 4