

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 891**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62	(2012.01)
C12P 7/625	(2012.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)
C12N 15/74	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2018 PCT/US2018/054473**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2019 WO19071052**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2018 E 18865091 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2022 EP 3692155**

54 Título: **Producción de polihidroxitirato en microorganismos de Wood-Ljungdahl**

30 Prioridad:

04.10.2017 US 201762568127 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2022

73 Titular/es:

**LANZATECH, INC. (100.0%)
8045 Lamon Avenue, Suite 400
Skokie, Illinois 60077, US**

72 Inventor/es:

**TAPPEL, RYAN CHRISTOPHER;
BEHRENDORFF, JAMES BRUCE YARNTON
HAYCOCK;
KOEPE, MICHAEL;
MARCELLIN, ESTEBAN;
LEMGRUBER, RENATO DE SOUZA PINTO;
VALGEPEA, KASPAR y
NIELSEN, LARS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 928 891 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de polihidroxi butirato en microorganismos de Wood-Ljungdahl

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a microorganismos genomodificados y a métodos para la producción de polihidroxi butirato (PHB) por fermentación microbiana, particularmente, por fermentación microbiana de un sustrato gaseoso.

10

Antecedentes de la invención

Los plásticos derivados del petróleo se han vuelto esenciales para la vida moderna, en gran parte debido a su ligereza, dureza, durabilidad y resistencia a la degradación. Sin embargo, la dependencia de los plásticos derivados del petróleo ha provocado muchos problemas graves, incluyendo el agotamiento del crudo, la contaminación y su acumulación en vertederos. Para disminuir el impacto ambiental de los plásticos, se están realizando intentos para reemplazar los polímeros derivados del petróleo convencionales con biopolímeros tales como polilactida, polisacáridos, poliésteres alifáticos y polihidroxi alcanos, que poseen propiedades fisicoquímicas similares a las de los plásticos convencionales (Anjum, Int J Biol Macromol, 89: 161-174, 2016). Sin embargo, los microorganismos y los métodos de producción de dichos biopolímeros están aún muy poco desarrollados. C. Humphreys *et al.*: "Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium autoethanogenum*, an industrially relevant bacterium", BMC GENOMICS, vol. 16, no. 1, 2015, enseñan que *Clostridium autoethanogenum* es una bacteria acetógena capaz de producir biocombustibles y productos químicos básicos de alto valor a partir de los gases C1 presentes en el gas de síntesis mediante la acción de la vía reductora de la acetil-CoA (Wood-Ljungdahl).

25

En el documento US-A1-2009/191593 se desvelan microorganismos de origen no natural que pueden convertir CO y H₂ o CO₂ y H₂ en acetil-coenzima A.

30

J. Mifune *et al.*: "Engineering of pha operon on Cupriavidus necator chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil", POLYMER DEGRADATION AND STABILITY, vol. 95, n.º 8, páginas 1305-1312, enseñan la síntesis de polihidroxi butirato en *Cupriavidus necator* a partir de acetil-CoA.

Sumario de la invención

35

La invención proporciona un microorganismo genomodificado capaz de producir PHB. En concreto, la invención proporciona un microorganismo de Wood-Ljungdahl de origen no natural capaz de producir polihidroxi butirato que comprende:

40

a. un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga acetil-CoA C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9) que convierte acetil-CoA en acetoacetil-CoA,

45

b. un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga acetoacetil-CoA reductasa (EC 1.1.1.36) o un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.157) que convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxi butiril-CoA y c. un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga polihidroxi alcanos sintasa (EC 2.3.1.-) que convierte 3-hidroxi butiril-CoA en polihidroxi butirato.

50

La enzima que convierte la acetil-CoA en acetoacetil-CoA es una acetil-CoA C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9). Por ejemplo, la acetil-CoA C-acetiltransferasa puede obtenerse de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium acetobutylicum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* o *Streptomyces coelicolor*.

55

La enzima que convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxi butiril-CoA es una acetoacetil-CoA reductasa (EC 1.1.1.36) o una 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.157). Por ejemplo, la acetoacetil-CoA reductasa puede obtenerse de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* o *Streptomyces coelicolor*. En otro ejemplo, la 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa puede obtenerse de *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium kluyveri*.

60

65

La enzima que convierte la 3-hidroxi butiril-CoA en polihidroxi butirato es una polihidroxi alcanos sintasa (EC 2.3.1.-). Por ejemplo, la polihidroxi alcanos sintasa puede obtenerse de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Rhodospirillum rubrum* o *Streptomyces coelicolor*.

En una realización, el microorganismo es un miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa*, y *Thermoanaerobacter*. Por ejemplo, el microorganismo puede obtenerse de un microorganismo precursor seleccionado del grupo que consiste en *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* y *Thermoanaerobacter kiuvi*. En una realización preferida, el microorganismo se selecciona de una bacteria precursora seleccionada del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*. En una realización, el microorganismo consume sustratos gaseosos que comprenden uno o más de CO, CO₂ y H₂. En otra realización, el microorganismo es anaerobio. En otra realización más, el microorganismo no es capaz de degradar el PHB.

La invención también proporciona un método para producir PHB, que comprende cultivar el microorganismo de la invención en presencia de un sustrato gaseoso. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede comprender uno o más de CO, CO₂ y H₂. En una realización, el cultivo se realiza en condiciones anaerobias. En otra realización, el cultivo se realiza sin sustratos hidrocarbonados. En otra realización más, el cultivo se realiza sin luz.

Estas y otras características y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada junto con las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra una vía enzimática para la producción de polihidroxibutirato (PHB).

La figura 2 es un mapa plasmídico de pPHB_01.

La figura 3 es un gráfico que muestra la producción de PHB en *C. autoethanogenum* que lleva un plásmido con una vía de biosíntesis de PHB (pPHB_01) o un plásmido vacío (pMTL83157) como control negativo. Las bacterias se cultivaron en condiciones anaerobias en frascos clasificados a presión sólo con CO y CO₂ como fuentes de carbono. El rendimiento de PHB (expresado como % en peso de masa celular seca) se determinó mediante HPLC (*high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta resolución). Los valores representan promedios de muestras biológicas por triplicado más o menos las desviaciones estándar sobre esos promedios. En muestras que comprendían el plásmido pMTL83157 (vacío), no se detectó PHB.

Las figuras 4A-4D son gráficos que muestran el crecimiento de *C. autoethanogenum* en diversas condiciones de crecimiento. Las bacterias comprendían un plásmido vacío (pMTL83157) o un plásmido que comprendía la vía de síntesis de PHB (pPHB_01). Cada gráfica representa un conjunto diferente de condiciones. La figura 4A (condición 1) muestra una repetición de las condiciones utilizadas para generar los datos observados en la figura 3, utilizando una mezcla de gases compuesta por 50/18/3/29 de CO/CO₂/H₂/N₂ como única fuente de carbono. La figura 4B (condición 2) muestra condiciones idénticas a las de la condición 1 pero con un nuevo sustrato gaseoso (50/30/10/10 CO/CO₂/H₂/N₂). La figura 4C (condición 3) muestra condiciones idénticas a las de la condición 2 pero con un tiempo de incubación prolongado. La figura 4D (condición 4) muestra condiciones idénticas a las de la condición 3 pero con renovación periódica del sustrato gaseoso. Los valores representan promedios de muestras biológicas por triplicado más o menos las desviaciones estándar sobre esos promedios.

La figura 5 es un gráfico que muestra la producción de PHB en *C. autoethanogenum* en las condiciones 1-4, como se describe en relación con las figuras 4A-4D. Los valores representan promedios de muestras biológicas por triplicado más o menos las desviaciones estándar sobre esos promedios. En muestras que comprendían el plásmido pMTL83157 (vacío), no se detectó PHB.

La figura 6 es un gráfico que muestra la producción de PHB en *C. autoethanogenum* a partir de fuentes de carbono gaseoso en una fermentación continua. Las bacterias se conjugaron con el plásmido pPHB_01 que comprendía una vía de síntesis de PHB. Al finalizar la fermentación se midió el PHB. Los sustratos gaseosos comprendían hidrógeno al 20 % o hidrógeno al 2 % como parte de sus mezclas de 50/20/20/10 de CO/CO₂/H₂/Ar o 50/20/2/28 de CO/CO₂/H₂/N₂, respectivamente. Se mantuvo un pH de 5. Los valores representan promedios de fermentaciones por duplicado más o menos las desviaciones estándar sobre esos promedios.

La figura 7 es un gráfico que muestra una mayor producción de PHB en *C. autoethanogenum* a partir de fuentes de carbono gaseoso en una fermentación continua. Las bacterias se conjugaron con el plásmido pPHB_01 que comprendía una vía de síntesis de PHB. Al finalizar la fermentación se midió el PHB. Los sustratos gaseosos comprendían hidrógeno al 20 % o hidrógeno al 2 % como parte de sus mezclas de 50/20/20/10 de CO/CO₂/H₂/Ar o 50/20/2/28 de CO/CO₂/H₂/N₂, respectivamente. Con hidrógeno al 20 %, la menor concentración de biomasa tuvo una concentración de biomasa disminuida en comparación con la de los otros procesos. Con hidrógeno al 20 %, la

el pH se modificó, comenzando con un pH de 6 que después se redujo a 5,5. Con hidrógeno al 20 %, se mantuvo un pH de 6 durante todo el proceso de fermentación hasta que los cultivos disminuyeron. Los valores representan promedios de fermentaciones por duplicado más o menos las desviaciones estándar sobre esos promedios.

5 La figura 8 es un gráfico que muestra valores de PHB de simulaciones que utilizan reconstrucciones de modelos metabólicos a escala genómica (GEM). El PHB detectado experimentalmente se comparó con los niveles de PHB predichos por GEM utilizando la maximización del rendimiento de PHB. También se probó la maximización del rendimiento de PHB con una captación de 2 mmol/g de PCS/h de NADH, NADPH, $F_{d_{red}}$ o ATP. Las condiciones probadas fueron PHB20 (control); PHBMcB (Menor concentración de Biomasa) y PHBpH5,5 (pH de 5,5). Se descubrió que el ATP era el que más limitaba el PHB (se alcanzó un valor de PHB más alto), seguido de $F_{d_{red}}$, NADPH y por último NADH. Los datos representan un promedio \pm error estándar de dos quimiostatos de copias biológicas.

Descripción de la invención

15 Se ha reconocido desde hace mucho tiempo que los procesos catalíticos, tales como el proceso de Fischer-Tropsch, pueden utilizarse para convertir gases que comprenden dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO) y/o hidrógeno (H_2), tal como gas residual industrial o gas de síntesis (sintegás), en diversos combustibles y productos químicos. Sin embargo, recientemente, la fermentación de gases ha surgido como una plataforma alternativa para la fijación biológica de dichos gases. En concreto, se ha demostrado que los microorganismos acetógenos (es decir, Wood-Ljungdahl) convierten gases que comprenden CO, CO_2 y/o H_2 en productos tales como etanol y 2,3-butanodiol. La conveniencia de producir moléculas poliméricas más complejas, tal como PHB, a partir de estos gases, está bien documentada (Drzyzga, J Chem Technol Biotechnol, 90: 1735-1751, 2015). Sin embargo, la vía de Wood-Ljungdahl actúa en el límite termodinámico de la vida (Schuchmann, Nat Rev Microbiol, 12: 809-821, 2014), lo que dificulta que los microorganismos de Wood-Ljungdahl acumulen incluso suficiente carbono para el crecimiento y el mantenimiento de las células, y mucho menos producir productos de carbono complejos. Estas dificultades metabólicas se ven agravadas por la mala disolución de los sustratos gaseosos (p. ej., CO, CO_2 y/o H_2) en los medios de fermentación, en comparación con los sustratos hidrocarbonados o glucídicos. Por lo tanto, parece poco probable que puedan diseñarse microorganismos de Wood-Ljungdahl para sintetizar PHB u otros polihidroxicanoatos, especialmente porque estos polímeros los producen de manera natural especies tales como *Rhodospirillum rubrum* y *Cupriavidus necator* como un medio para almacenar el exceso de carbono. De hecho, hasta la fecha, los intentos de diseñar microorganismos acetógenos para producir PHB a partir de CO, CO_2 y/o H_2 han sido infructuosos (The European SYNPOL Project, Biopolymers from syngas fermentation, 2012-2017).

35 Sin embargo, después de diligentes esfuerzos de investigación e ingeniería, los inventores han conseguido por primera vez, la síntesis de PHB en microorganismos de Wood-Ljungdahl. Esto representa un hito importante en el camino hacia la producción de biopolímeros renovables y sostenibles.

40 En un primer aspecto, la invención proporciona un microorganismo de Wood-Ljungdahl capaz de producir PHB. En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para producir PHB mediante el cultivo del microorganismo de Wood-Ljungdahl anteriormente mencionado en presencia de un sustrato gaseoso.

Vía

45 Dado que los microorganismos de Wood-Ljungdahl no producen PHB de manera natural, la producción de PHB en un microorganismo de Wood-Ljungdahl requiere la introducción de al menos una enzima heteróloga. El microorganismo de la invención generalmente comprende tres enzimas heterólogas, de acuerdo con la reivindicación 1, más específicamente (a) una enzima que convierte la acetil-CoA en acetoacetil-CoA, (b) una enzima que convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxiacetil-CoA y (c) una enzima que convierte 3-hidroxiacetil-CoA en polihidroxiacetil-CoA. Esta vía se muestra en la figura 1.

(1) Conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA

55 La conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA la cataliza una enzima heteróloga (es decir, no natural). La enzima es la acetil-CoA C-acetiltransferasa (también conocida como tiolasa o 3-cetotiolasa), que tiene actividad definida por EC 2.3.1.9 (es decir, 2 acetil-CoA \leftrightarrow CoA + acetoacetil-CoA). La acetil-CoA C-acetiltransferasa puede obtenerse de cualquier microorganismo hospedador adecuado, tal como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium acetobutylicum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* o *Streptomyces coelicolor*.

65 En concreto, la acetil-CoA C-acetiltransferasa puede ser o puede obtenerse de *Acinetobacter baumannii* PhaA (SCZ16966), *Aeromonas hydrophilia* PhaA (WP_043162470), *Alcaligenes latus* PhaA (AAC83659), *Arthrospira platensis* PhaA (WP_006617472), *Bacillus subtilis* PhaA (CUB52080), *Burkholderia cepacia* PhaA (WP_043187452), *Clostridium acetobutylicum* ThIA (WP_0109661571), *Cupriavidus necator* PhaA (WP_013956452.1), *Cupriavidus necator* BktB (WP_011615089.1), *Cupriavidus necator* phaA (WP_010810132.1), *Escherichia coli* AtoB

(NP_416728.1), *Haloferax mediterranei* PhaA (WP_004059344), *Pseudomonas aeruginosa* PhaA (WP_038823536), *Pseudomonas fluorescens* PhaA (WP_073525707), *Pseudomonas mandelii* PhaA (WP_019582144), *Pseudomonas oleovorans* PhaA (WP_074859314), *Pseudomonas putida* PhaA (WP_058540218) o *Streptomyces coelicolor* PhaA (WP_011030221).

5

(2) Conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA

La conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA la cataliza una enzima heteróloga (es decir, no natural). La enzima es la acetoacetil-CoA reductasa, que tiene actividad definida por EC 1.1.1.36 (es decir, (R)-3-hidroxiacil-CoA + NADP⁺ ↔ 3-oxoacil-CoA + NADPH + H⁺). La acetoacetil-CoA reductasa puede obtenerse de cualquier microorganismo hospedador adecuado, tal como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* o *Streptomyces coelicolor*. En concreto, la acetoacetil-CoA reductasa puede ser de *Acinetobacter baumannii* PhaB (WP_095389464), *Aeromonas hydrophilia* PhaB (WP_041216919), *Alcaligenes latus* PhaB (AAC83660), *Arthrospira platensis* PhaB (WP_043469113), *Bacillus subtilis* PhaB (WP_070548955), *Burkholderia cepacia* PhaB (WP_059234032), *Cupriavidus necator* PhaB (WP_010810131.1), *Haloferax mediterranei* PhaB (WP_004572392), *Pseudomonas aeruginosa* PhaB (WP_031690879), *Pseudomonas fluorescens* PhaB (WP_030141425), *Pseudomonas mandelii* PhaB (WP_094467462), *Pseudomonas oleovorans* PhaB (WP_074858624), *Pseudomonas putida* PhaB (BAB96554) o *Streptomyces coelicolor* PhaB (WP_011027734). En otra realización preferida, la enzima es 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, que tiene actividad definida por EC 1.1.1.157 (es decir, (S)-3-hidroxi-butanoil-CoA + NADP⁺ = 3-acetoacetil-CoA + NADPH + H⁺). La 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa puede ser o puede obtenerse de cualquier microorganismo hospedador adecuado, tal como *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium kluveri*. En concreto, la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa puede ser de *Clostridium beijerinckii* Hbd (WP_011967675.1), *Clostridium acetobutylicum* Hbd (NP_349314.1) o *Clostridium kluveri* Hbd1 (WP_011989027.1).

Preferentemente, la enzima que convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA es específica de (R), es decir, produce (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, ya que la (R)-3-hidroxi-butiril-CoA es el sustrato clásico para la producción enzimática de PHB. Sin embargo, en algunos casos, la enzima que convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA es específica de (S), es decir, produce (S)-3-hidroxi-butiril-CoA. Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, los inventores creen que la actividad epimerasa natural o introducida en bacterias acetógenas puede permitir la interconversión de (S)- y (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, dicha (S)-3-hidroxi-butiril-CoA puede convertirse en (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, que después puede convertirse en PHB.

35

(3) Conversión de 3-hidroxi-butiril-CoA en PHB

La conversión de 3-hidroxi-butiril-CoA en PHB la cataliza una enzima heteróloga (es decir, no natural). La enzima es polihidroxiacanoato sintasa, que tiene actividad definida por EC 2.3.1.-, tal como EC 2.3.1.B2 (tipo I) (es decir, 3-hidroxi-butiril-CoA + [(R)-3-hidroxi-butanoato]_n = [(R)-3-hidroxi-butanoato]_{n+1} + CoA), EC 2.3.1.B3 (tipo II) (es decir, 3-hidroxiacil-CoA + [(R)-3-hidroxiacil]_n = [(R)-3-hidroxiacil]_{n+1} + CoA) o EC 2.3.1.B4 (tipo III) (es decir, 3-hidroxiacil-CoA + [(R)-3-hidroxiacil]_n = [(R)-3-hidroxiacil]_{n+1} + CoA). Esta enzima también puede denominarse polihidroxiacanoato polimerasa, polihidroxi-butirato sintasa, polihidroxi-butirato polimerasa, y similares. La polihidroxiacanoato sintasa puede obtenerse de cualquier microorganismo hospedador adecuado, tal como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Rhodospirillum rubrum* o *Streptomyces coelicolor*. En concreto, la polihidroxiacanoato sintasa puede ser o puede obtenerse de *Acinetobacter baumannii* PhaC (SCY71072), *Aeromonas caviae* PhaC (WP_045524574), *Aeromonas hydrophilia* PhaC1 (WP_017780191) o PhaC2 (AAV41872), *Alcaligenes latus* PhaC (WP_084267317), *Arthrospira platensis* PhaC (WP_006617456), *Bacillus subtilis* PhaC (CUB58881), *Burkholderia cepacia* PhaC (WP_027784567), *Cupriavidus necator* PhaC (WP_011615085 o WP_013956451.1), *Haloferax mediterranei* PhaC (WP_004056138), *Pseudomonas aeruginosa* PhaC1 (WP_038823539) o PhaC2 (WP_025271419), *Pseudomonas fluorescens* PhaC1 (WP_057399292) o PhaC2 (WP_030141001), *Pseudomonas mandelii* PhaC1 (WP_094467460) o PhaC2 (WP_010465951), *Pseudomonas oleovorans* PhaC1 (AAL17611) o PhaC2 (WP_037049875), *Pseudomonas putida* PhaC1 (BAB96552) o PhaC2 (WP_029886362), *Pseudomonas* sp. 61-3 PhaC1 (BAA36198) o PhaC2 (BAA36202), *Rhodospirillum rubrum* PhaC1 (WP_011388028), PhaC2 (WP_011390166) o PhaC3 (WP_011398569) o *Streptomyces coelicolor* PhaC.

Se pueden introducir una o más mutaciones interruptoras en una o más enzimas endógenas para reducir o eliminar la competencia con las enzimas heterólogas introducidas. En concreto, una "mutación interruptora" es una mutación que reduce o elimina (es decir, "interrumpe") la expresión o actividad de un gen o enzima. La mutación interruptora puede inactivar parcialmente, inactivar totalmente o deleccionar el gen o la enzima. La mutación interruptora puede ser una mutación inactivadora (KO, del inglés "knockout"). La mutación interruptora puede ser cualquier mutación que reduzca, impida o bloquee la biosíntesis de un producto generado por una enzima. La mutación interruptora puede incluir, por ejemplo, una mutación en un gen que codifica una enzima, una mutación en un elemento regulador genético implicado en la expresión de un gen que codifica una enzima, la introducción de un ácido nucleico que produce una proteína que

65

reduce o inhibe la actividad de una enzima o la introducción de un ácido nucleico (p. ej., ARN antisentido, ARNip, ARN guía) y/o proteína (p. ej., una proteína Cas) que inhibe la expresión de una enzima. La mutación interruptora puede introducirse utilizando cualquier método conocido en la técnica.

- 5 Por ejemplo, el microorganismo de la invención puede tener una mutación interruptora en una enzima tioesterasa endógena. Se han identificado tres supuestas tioesterasas en *Clostridium autoethanogenum*: (1) "tioesterasa 1" (AGY74947.1; anotada como palmitoil-CoA hidrolasa), (2) "tioesterasa 2" (AGY75747.1; anotada como 4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa) y (3) "tioesterasa 3" (AGY75999.1; anotada como supuesta tioesterasa). También se han identificado tres supuestas tioesterasas en *Clostridium ljungdahlii*: (1) "tioesterasa 1" (ADK15695.1; anotada como predicha acil-CoA tioesterasa 1), (2) "tioesterasa 2" (ADK16655.1; anotada como predicha tioesterasa) y (3) 10 "tioesterasa 3" (ADK16959.1; anotada como predicha tioesterasa). La mutación interruptora puede afectar a cualquiera de estas tioesterasas o a cualquier otra tioesterasa que pueda ser endógena al microorganismo de la invención.

15 *Microorganismo*

- Un "microorganismo" es un organismo microscópico, especialmente una bacteria, arquea, virus u hongo. El microorganismo de la invención es normalmente una bacteria. Como se usa en el presente documento, la referencia a un "microorganismo" debe considerarse que abarca un "bacteria".

- 20 El microorganismo de la invención es de origen no natural. La expresión "de origen no natural", cuando se usa en referencia a un microorganismo, pretende significar que el organismo tiene al menos una modificación genética que normalmente no se encuentra en una cepa de origen natural de la especie de referencia, incluidas las cepas de tipo silvestre de las especies de referencia. Los microorganismos de origen no natural se desarrollan normalmente en un laboratorio o centro de investigación. Por el contrario, "tipo silvestre" se refiere a la forma clásica de un organismo, 25 cepa, gen o característica tal como se presenta en la naturaleza.

- Las expresiones "modificación genética", "alteración genética", o "ingeniería genética", se refieren en términos generales a la manipulación artificial (hecha por el hombre) del genoma o de los ácidos nucleicos de un microorganismo. Del mismo modo, las expresiones "modificado genéticamente", "alterado genéticamente", o 30 "genomodificado", se refieren a un microorganismo que comprende dicha modificación genética, alteración genética o genomodificación. Estos términos pueden usarse para diferenciar un microorganismo generado en laboratorio de un microorganismo de origen natural. Los métodos de modificación genética incluyen, por ejemplo, expresión de genes heterólogos, inserción o delección de genes o promotores, mutación de ácidos nucleicos, expresión génica alterada o inactivación, ingeniería enzimática, evolución dirigida, diseño basado en el conocimiento, métodos de mutagénesis 35 aleatoria, reordenación de genes y optimización de codones.

- "Recombinante" indica que un ácido nucleico, una proteína o un microorganismo es el producto de una modificación genética, genomodificación o recombinación. En general, el término "recombinante" se refiere a un ácido nucleico, a una proteína o a un microorganismo que comprende, o está codificado por, material genético procedente de 40 numerosas fuentes, tal como dos o más cepas o especies diferentes de microorganismos. El microorganismo de la invención es normalmente un recombinante.

- La expresión "procedente de" indica que un ácido nucleico, una proteína o un microorganismo se modifica o adapta a partir de un ácido nucleico, una proteína o un microorganismo (p. ej., un precursor o de tipo silvestre) diferente, para 45 producir un ácido nucleico, una proteína o un microorganismo nuevo. Dichas modificaciones o adaptaciones normalmente incluyen inserción, delección, mutación o sustitución de ácidos nucleicos o genes. En general, el microorganismo de la invención procede de un "microorganismo precursor", que es un microorganismo que se utiliza para generar un microorganismo de la invención. El microorganismo precursor puede ser un microorganismo de origen natural (es decir, un microorganismo de tipo silvestre) o un microorganismo que se ha modificado previamente (es decir, un microorganismo mutante o recombinante). El microorganismo de la invención puede modificarse para que exprese o sobreexpresen una o más enzimas que no se expresaban o sobreexpresaban en el microorganismo precursor. De forma similar, el microorganismo de la invención puede modificarse para que comprenda uno o más genes que no estaban comprendidos en el microorganismo precursor. El microorganismo de la invención también puede modificarse para que no exprese o para que exprese menores cantidades de una o más enzimas que se expresaban en el microorganismo precursor. En una realización, el microorganismo de la invención procede de un 50 microorganismo precursor seleccionado del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. En una realización preferida, el microorganismo de la invención se selecciona del microorganismo precursor *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, que se depositó el 7 de junio de 2010 en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH) ubicada en Inhoffenstraße 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 7 de junio de junio de 2010 según los términos del Tratado de Budapest y el número de registro asignado DSM23693. Esta cepa se describe en la solicitud de patente internacional n.º PCT/NZ2011/000144, que se publicó como documento WO 2012/015317. 60

- El microorganismo de la invención también puede clasificarse basándose en características funcionales. El 65 microorganismo de la invención es un microorganismo de Wood-Ljungdahl de origen no natural y puede ser un microorganismo fijador de C1, un anaerobio, un acetógeno, un etanológeno y/o un carboxidótrofo. La Tabla 1

proporciona una lista representativa de microorganismos e identifica sus características funcionales.

Tabla 1

	Wood-Ljungdahl	Fijador de C1	Anaerobio	Acetógeno	Etanológeno	Autótrofo	Carboxidótrofo
<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> (anteriormente <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 kiuvi</i>	+	+	+	+		+	

¹ *Acetobacterium woodii* puede producir etanol a partir de fructosa, pero no a partir de gas.

5 ² No se ha investigado si *Clostridium magnum* puede crecer con CO.

³ Una cepa de *Moorella thermoacetica*, HUC22-1 de *Moorella* sp., se ha indicado que produce etanol a partir de gas.

⁴ No se ha investigado si *Sporomusa ovata* puede crecer con CO.

⁵ No se ha investigado si *Sporomusa silvacetica* puede crecer con CO.

10 ⁶ No se ha investigado si *Sporomusa sphaeroides* puede crecer con CO.

"Wood-Ljungdahl" se refiere a la vía de Wood-Ljungdahl de fijación de carbono como se describe, p. ej., en Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784: 1873-1898, 2008. "Microorganismos de Wood-Ljungdahl" se refiere, como era de esperar, a microorganismos que comprenden la vía de Wood-Ljungdahl. En general, el microorganismo de la invención comprende una vía de Wood-Ljungdahl natural. En el presente documento, una vía de Wood-Ljungdahl puede ser una vía de Wood-Ljungdahl natural, no modificada o puede ser una vía de Wood-Ljungdahl con cierto grado de modificación genética (p. ej., sobreexpresión, expresión heteróloga, inactivación, etc), siempre que siga manteniendo la función de convertir CO, CO₂ y/o CH₂ en acetyl-CoA.

20 "C1" se refiere a una molécula de un carbono, por ejemplo, CO, CO₂ o CH₃OH. "C1-oxigenado" se refiere a una molécula de un carbono que también comprende al menos un átomo de oxígeno, por ejemplo, CO, CO₂ o CH₃OH. "Fuente de carbono C1" se refiere a una molécula de carbono que sirve como fuente de carbono parcial o única para el microorganismo de la invención. Por ejemplo, una fuente de carbono C1 puede comprender uno o más de CO, CO₂, CH₃OH o CH₂O₂. Preferentemente, la fuente de carbono C1 comprende uno o ambos de CO y CO₂. Un

25 "microorganismo fijador de C1" es un microorganismo que tiene la capacidad de producir uno o más productos a partir de una fuente de carbono C1. Normalmente, el microorganismo de la invención es una bacteria fijadora de C1. El

microorganismo puede seleccionarse de un microorganismo fijador de C1 identificado en la Tabla 1. El metano (CH₄) podría considerarse como una fuente de carbono C1, pero solo si la bacteria de la invención fue diseñada para comprender una vía metabólica de metano, como se describe, p. ej., en el documento WO 2016/138050, dado que las bacterias acetógenas no son capaces de usar metano de manera natural como fuente de carbono.

5 Un "anaerobio" es un microorganismo que no requiere oxígeno para su crecimiento. Un anaerobio puede reaccionar negativamente o incluso morir si hay oxígeno por encima de un umbral determinado. Sin embargo, algunos anaerobios son capaces de tolerar niveles bajos de oxígeno (p. ej., oxígeno al 0,000001-5 %). Normalmente, el microorganismo de la invención es un anaerobio. En una realización preferida, el microorganismo de la invención es un anaerobio
10 identificado en la Tabla 1.

Los "acetógenos" son bacterias anaerobias obligadas que utilizan la vía de Wood-Ljungdahl como su mecanismo principal para la conservación de energía y para la síntesis de acetyl-CoA y productos derivados de acetyl-CoA, tales como acetato (Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784: 1873-1898, 2008). Los acetógenos utilizan la vía de Wood-Ljungdahl como un (1) mecanismo para la síntesis reductora de acetyl-CoA a partir de CO₂, (2) terminal de aceptación de electrones, proceso de conservación de energía, (3) mecanismo para la fijación (asimilación) de CO₂ en la síntesis de carbono celular (Drake, Acetogenic Prokaryotes, En: The Prokaryotes, 3ª edición, pág. 354, Nueva York, NY, 2006). Todos los acetógenos de origen natural son fijadores de C1, anaerobios, autótrofos y no metanótrofos. Normalmente,
15 el microorganismo de la invención es un acetógeno. El microorganismo puede seleccionarse de un acetógeno
20 identificado en la Tabla 1.

Un "etanológico" es un microorganismo que produce o es capaz de producir etanol. Normalmente, el microorganismo de la invención es un etanológico. El microorganismo puede seleccionarse de un etanológico identificado en la Tabla
25 1.

Un "autótrofo" es un microorganismo capaz de crecer sin carbono orgánico. En cambio, los autótrofos utilizan fuentes de carbono inorgánico, tales como CO y/o CO₂. Normalmente, el microorganismo de la invención es un autótrofo. El microorganismo puede seleccionarse de un autótrofo identificado en la Tabla 1.

30 Un "carboxidótrofo" es un microorganismo capaz de utilizar CO como única fuente de carbono y energía. Normalmente, el microorganismo de la invención es un carboxidótrofo. El microorganismo puede seleccionarse de un carboxidótrofo
identificado en la Tabla 1.

De manera más amplia, el microorganismo de la invención puede seleccionarse de cualquier género o especie
35 identificado en la Tabla 1. Por ejemplo, el microorganismo puede ser un miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* y *Thermoanaerobacter*. En concreto, el microorganismo puede seleccionarse de una bacteria precursora seleccionada del grupo que consiste en *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*,
40 *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

45 En una realización preferida, el microorganismo de la invención se selecciona del grupo de *Clostridia* que comprende las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*. Estas especies fueron informadas y caracterizadas por primera vez por Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994 (*Clostridium autoethanogenum*), Tanner, Int J System Bacteriol, 43: 232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*) y Huhnke, documento WO 2008/028055 (*Clostridium ragsdalei*).
50

Estas especies tienen muchas similitudes. En concreto, todas estas especies son miembros fijadores de C1, anaerobios, acetógenos, etanológicos y carboxidótrofos del género *Clostridium*. Estas especies tienen genotipos y fenotipos y modos de conservación de energía y metabolismo fermentativo similares. Asimismo, estas especies están agrupadas en el grupo I de homología de ARNr de los clostridios con ADN de ARNr 16S que tiene una identidad mayor del 99 %, tienen un contenido de G+C en el ADN de aproximadamente 22-30 % en moles, son grampositivas, tienen una morfología y un tamaño similares (células en crecimiento logarítmico entre 0,5-0,7 × 3-5 μm), son mesófilas (crecen de manera óptima a 30-37 °C), tienen intervalos de pH similares de aproximadamente 4-7,5 (con un pH óptimo de aproximadamente 5,5-6), carecen de citocromos y conservan energía a través de un complejo de Rnf. Además, en estas especies, se ha demostrado la reducción de ácidos carboxílicos en sus correspondientes alcoholes (Perez, Biotechnol Bioeng, 110:1066-1077, 2012). Es importante destacar que, estas especies también muestran un fuerte crecimiento autótrofo en gases que comprenden CO, producen etanol y acetato (o ácido acético) como principales productos de fermentación y producen pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico en determinadas condiciones.
55
60

65 Sin embargo, estas tres especies también tienen diversas diferencias. Estas especies se aislaron de diferentes fuentes: *Clostridium autoethanogenum* de intestino de conejo, *Clostridium ljungdahlii* de desechos de gallinero y

Clostridium ragsdalei de sedimentos de agua dulce. Estas especies difieren en la utilización de diversos azúcares (p. ej., ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej., gluconato, citrato), aminoácidos (p. ej., arginina, histidina) y otros sustratos (p. ej., betaína, butanol). Asimismo, estas especies difieren en la auxotrofia de determinadas vitaminas (p. ej., tiamina, biotina). Estas especies tienen diferencias en las secuencias de los ácidos nucleicos y de aminoácidos de los genes y proteínas de la vía de Wood-Ljungdahl, aunque se ha comprobado que la organización general y el número de estos genes y proteínas son idénticos en todas las especies (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011).

Por tanto, resumiendo, muchas de las características de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*, no son específicas de esa especie, sino que más bien son características generales de este grupo de miembros fijadores de C1, anaerobios, acetógenos, etanológenos y carboxidotrofos del género *Clostridium*. Sin embargo, dado que estas especies son, de hecho, distintas, la modificación o manipulación genética de una de estas especies puede que no tenga el mismo efecto en otra de estas especies. Por ejemplo, pueden observarse diferencias en el crecimiento, el rendimiento o la producción del producto.

El microorganismo de la invención también puede seleccionarse de un aislado o mutante de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. Los aislados y mutantes de *Clostridium autoethanogenum* incluyen JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (documento WO 2009/064200) y LZ1561 (DSM23693) (documento WO 2012/015317). Los aislados y mutantes de *Clostridium ljungdahlii* incluyen ATCC 49587 (Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (documento US 5.593.886), C-01 (ATCC 55988) (documento US 6.368.819), O-52 (ATCC 55989) (documento US 6.368.819) y OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, tesis doctoral, North Carolina State University, 2010). Los aislados y mutantes de *Clostridium ragsdalei* incluyen PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (documento WO 2008/028055).

Preferentemente, el microorganismo de la invención no es fotótrofo ni fotosintético. Preferentemente, el microorganismo de la invención no es metanótrofo.

Preferentemente, el microorganismo de la invención no es miembro del género *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus* (*Ralstonia*), *Rhizobium*, *Rhodospirillum* o *Pseudomonas*. En concreto, preferentemente, el microorganismo de la invención no procede de *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus cereus*, *Cupriavidus nicator* (anteriormente *Ralstonia eutropha*) o *Pseudomonas putida*. Preferentemente, el microorganismo de la invención no procede de *Escherichia coli*.

Enzimas

"Endógeno" o "natural" se refiere a un ácido nucleico o a una proteína que está presente o que se expresa en el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo de la invención. Por ejemplo, un gen endógeno o una proteína endógena es un gen o una proteína que está presente de manera natural en el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo de la invención. La expresión de un gen endógeno puede estar controlada por un elemento regulador exógeno, tal como un promotor exógeno.

"Exógeno" se refiere a un ácido nucleico o a una proteína que se origina fuera del microorganismo de la invención. Por ejemplo, un gen exógeno o una enzima exógena puede crearse artificialmente o de forma recombinante e introducirse o expresarse en el microorganismo de la invención. También se puede aislar un gen exógeno o una enzima exógena de un microorganismo heterólogo e introducirse o expresarse en el microorganismo de la invención. Los ácidos nucleicos exógenos pueden adaptarse para integrarse en el genoma del microorganismo de la invención o para permanecer en un estado extracromosómico en el microorganismo de la invención, por ejemplo, en un plásmido.

"Heterólogo" se refiere a un ácido nucleico o a una proteína que no está presente en el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo de la invención. Por ejemplo, un gen heterólogo o una enzima heteróloga puede proceder de una cepa o de una especie diferente e introducirse o expresarse en el microorganismo de la invención.

Las enzimas que (a) convierten acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA, (b) convierten acetoacetyl-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA o (c) convierten 3-hidroxi-butiril-CoA en PHB, según la reivindicación 1, son heterólogas (es decir, no naturales) para la bacteria.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el cual un polinucleótido se transcribe a partir de un molde de ADN (tal como en un ARNm u otro transcrito de ARN) y/o el proceso por el cual un ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas.

"Actividad enzimática", o simplemente "actividad", se refiere, en líneas generales, a actividad enzimática, incluyendo, aunque sin limitación, la actividad de una enzima, la cantidad de una enzima o la disponibilidad de una enzima para catalizar una reacción. Por consiguiente, "aumentar" la actividad enzimática incluye aumentar la actividad de una enzima, aumentar la cantidad de una enzima o aumentar la disponibilidad de una enzima para catalizar una reacción. De forma similar, "disminuir" la actividad enzimática incluye disminuir la actividad de una enzima, disminuir la cantidad

de una enzima o disminuir la disponibilidad de una enzima para catalizar una reacción.

"Optimización de codones" se refiere a la mutación de un ácido nucleico, tal como un gen, para la traducción optimizada o mejorada del ácido nucleico en una cepa o especie particular. La optimización de codones puede dar como resultado velocidades de traducción más rápidas o una mayor precisión de traducción. Los genes de la invención pueden tener codones optimizados para su expresión en *Clostridium*, en particular, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. Como se usa en el presente documento, las expresiones "codones optimizados" y "codones adaptados" pueden utilizarse indistintamente.

El término "variantes" incluye ácidos nucleicos y proteínas cuya secuencia varía de la secuencia de un ácido nucleico y una proteína de referencia, tal como una secuencia de un ácido nucleico y una proteína de referencia desvelados en la técnica anterior o ilustrados en el presente documento. Los ácidos nucleicos o las proteínas variantes realizan sustancialmente la misma función que el ácido nucleico o la proteína de referencia. Por ejemplo, una proteína variante puede realizar sustancialmente la misma función o catalizar sustancialmente la misma reacción que una proteína de referencia. Un gen variante puede codificar la misma o sustancialmente la misma proteína que un gen de referencia. Un promotor variante puede tener sustancialmente la misma capacidad para promover la expresión de uno o más genes como un promotor de referencia.

Dichos ácidos nucleicos o proteínas pueden denominarse en el presente documento "variantes funcionalmente equivalentes". A modo de ejemplo, las variantes funcionalmente equivalentes de un ácido nucleico pueden incluir variantes alélicas, fragmentos de un gen, genes mutados, polimorfismos y similares. Los genes homólogos de otros microorganismos también son ejemplos de variantes funcionalmente equivalentes. Estos incluyen genes homólogos en especies tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* o *Clostridium ljungdahlii*, cuyos detalles están disponibles al público en páginas web tales como Genbank o NCBI. Las variantes funcionalmente equivalentes también incluyen ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de la optimización de codones de un microorganismo particular. Una variante funcionalmente equivalente de un ácido nucleico tendrá preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 98 %, o más, de identidad de secuencia del ácido nucleico (porcentaje de homología) con el ácido nucleico de referencia. Una variante funcionalmente equivalente de una proteína tendrá preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 98 %, o más, de identidad de aminoácidos (porcentaje de homología) con la proteína de referencia. La equivalencia funcional de un ácido nucleico o proteína variante puede evaluarse usando cualquier método conocido en la técnica.

Las enzimas descritas en el presente documento se expresan normalmente a partir de un ácido nucleico que se ha introducido en el microorganismo de la invención. Los ácidos nucleicos pueden suministrarse a un microorganismo de la invención usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden suministrarse como ácidos nucleicos desnudos o pueden formularse con uno o más agentes, tales como liposomas. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, ADnc o combinaciones de los mismos, según sea apropiado. En determinadas realizaciones pueden utilizarse inhibidores de restricción. Los vectores adicionales pueden incluir plásmidos, virus, bacteriófagos, cósmidos y cromosomas artificiales. En una realización preferida, los ácidos nucleicos se suministran al microorganismo de la invención usando un plásmido. A modo de ejemplo, la transformación (incluyendo transducción o transfección) puede conseguirse mediante electroporación, ultrasonido, transformación mediada por polietilenglicol, competencia química o natural, transformación de protoplastos, inducción de profagos o conjugación. En determinadas realizaciones que tienen sistemas activos de enzimas de restricción, puede ser necesario metilar un ácido nucleico antes de la introducción del ácido nucleico en un microorganismo.

Asimismo, los ácidos nucleicos pueden diseñarse para que comprendan un elemento regulador, tal como un promotor, para aumentar, o controlar de otro modo, la expresión de un ácido nucleico concreto. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Idealmente, el promotor es un promotor de la vía de Wood-Ljungdahl, un promotor de ferredoxina, un promotor de piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, un promotor del operón del complejo Rnf, un promotor del operón de ATP sintasa o un promotor del operón de fosfotransacetilasa/acetato cinasa.

Sustratos

"Sustrato" se refiere a una fuente de carbono y/o de energía para el microorganismo de la invención. Normalmente, el sustrato es gaseoso y comprende una fuente de carbono C1, por ejemplo, CO y/o CO₂. Preferentemente, el sustrato comprende una fuente de carbono C1 de CO o CO + CO₂. El sustrato puede comprender además otros componentes que no sean carbono, tales como H₂, N₂ o electrones.

El sustrato generalmente comprende al menos alguna cantidad de CO, tal como aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % en moles de CO. El sustrato puede comprender un intervalo de CO, tal como aproximadamente 20-80, 30-70 o 40-60 % en moles de CO. Preferentemente, el sustrato comprende aproximadamente 40-70 % en moles de CO (p. ej., gas de acería o alto horno), aproximadamente 20-30 % en moles de CO (p. ej., gas de horno de oxígeno básico) o aproximadamente 15-45 % en moles de CO (p. ej., sintegás). El sustrato puede comprender una cantidad relativamente baja de CO, tal como aproximadamente 1-10 o 1-20 % en

moles de CO. El microorganismo de la invención normalmente convierte al menos una parte del CO del sustrato en un producto. Es posible que el sustrato no comprenda o no comprenda sustancialmente (<1 % en moles) CO.

5 El sustrato puede comprender alguna cantidad de H₂. Por ejemplo, el sustrato puede comprender aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 30 % en moles de H₂. El sustrato puede comprender una cantidad relativamente alta de H₂, tal como aproximadamente 60, 70, 80 o 90 % en moles de H₂. Es posible que el sustrato no comprenda o no comprenda sustancialmente (<1 % en moles) H₂.

10 El sustrato puede comprender alguna cantidad de CO₂. Por ejemplo, el sustrato puede comprender aproximadamente 1-80 o 1-30 % en moles de CO₂. El sustrato puede comprender menos de aproximadamente 20, 15, 10 o 5 % en moles de CO₂. Es posible que el sustrato no comprenda o no comprenda sustancialmente (<1 % en moles) CO₂.

15 El crecimiento de una cepa productora de PHB puede compararse con el de una cepa de control ("plásmido vacío" o "EP" por las siglas del inglés *empty plasmid*) usando dos mezclas de gases diferentes que contengan CO y CO₂ con un 20 % de H₂ parecido al sintegás (50 % de CO, 20 % de CO₂, 20 % de H₂, 10 % de Argón), denominadas condiciones "PHB20" y "EP20", respectivamente, o 2 % de H₂ parecido al gas residual de acería (50 % de CO, 20 % de CO₂, 2 % de H₂, 28 % de Nitrógeno), denominadas condiciones "PHB2" y "EP2", respectivamente.

20 Aunque el sustrato es normalmente gaseoso, el sustrato también puede proporcionarse en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato puede disolverse en un líquido saturado con un gas que comprenda CO usando un generador de dispersión de microburbujas. A modo de ejemplo adicional, el sustrato puede adsorberse sobre un soporte sólido.

25 El sustrato y/o la fuente de carbono C1 puede ser un gas residual obtenido como subproducto de un proceso industrial o de alguna otra fuente, tal como los de los gases de escape de los automóviles o la gasificación de biomasa. El proceso industrial puede seleccionarse del grupo que consiste en la fabricación de productos de metales ferrosos, tales como la fabricación de una acería, fabricación de productos no ferrosos, refinado de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbón, producción de amoniaco, producción de metanol y fabricación de coque. El sustrato y/o la fuente de carbono C1 puede capturarse a partir del proceso industrial antes de ser emitido a la atmósfera, usando cualquier método conveniente.

30 El sustrato y/o la fuente de carbono C1 puede ser sintegás, tal como el sintegás obtenido por gasificación de carbón o residuos de refinería, gasificación de biomasa o material lignocelulósico o reformado de gas natural. El sintegás puede obtenerse de la gasificación de residuos sólidos urbanos o residuos sólidos industriales.

35 La composición del sustrato puede tener un impacto significativo sobre la eficacia y/o el coste de la reacción. Por ejemplo, la presencia de oxígeno (O₂) puede reducir la eficacia de un proceso de fermentación anaerobia. Dependiendo de la composición del sustrato, puede ser deseable tratar, lavar o filtrar el sustrato para eliminar cualquier impureza no deseable, tales como toxinas, componentes no deseados o partículas de polvo y/o aumentar la concentración de componentes deseables.

40 En determinadas realizaciones, la fermentación o el cultivo se realiza sin sustratos hidrocarbonados, tales como azúcar, almidón, lignina, celulosa o hemicelulosa.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "PHBMcB" se usa para referirse a experimentos con una menor concentración de biomasa en estado de equilibrio, tal como una concentración de biomasa 3 veces menor en estado de equilibrio. Como se usa en el presente documento, la expresión "PHBpH5,5" se utiliza para referirse a experimentos realizados a un pH de 5,5. Véase la figura 8.

50 *Productos*

El microorganismo de la invención se cultiva para producir PHB.

55 El PHB es un polímero de monómeros de 3-hidroxiбутирато. El PHB producido según el proceso de la invención, puede comprender cualquier número de monómeros de 3-hidroxiбутирато, por ejemplo, aproximadamente 10-1 000 000 monómeros. Como ejemplos adicionales, el PHB puede comprender aproximadamente 10-100 000 monómeros, 100-100 000 monómeros, 100-10 000 monómeros, 500-5 000 monómeros, 1 000-10 000 monómeros o 5 000-20 000 monómeros. Se prefiere que el PHB comprenda aproximadamente 100-12 000 monómeros.

60 El peso molecular del PHB producido por la bacteria de la invención puede estar en el intervalo de aproximadamente 1000-100 000 000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del PHB puede ser de aproximadamente 1 000-10 000 Da, 10 000-1 000 000 Da, 10 000-10 000 000 Da o 10 000 000-100 000 000 Da. Preferentemente, el peso molecular del PHB puede ser de aproximadamente 1 000-1 000 000 Da, tal como 10 000-100 000 Da, 10 000-500 000 Da, 100 000-500 000 Da, 300 000-800 000 Da o 500 000-1 000 000 Da.

65 La producción de PHB se refiere frecuentemente como un porcentaje del peso celular seco. El microorganismo de la invención puede producir, por ejemplo, 0,005-0,995 % en peso de PHB. Preferentemente, el microorganismo de la

invención produce aproximadamente 0,01 % en peso, 0,1 % en peso, 0,5 % en peso, 1 % en peso, 1,5 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 5 % en peso, 10 % en peso, 20 % en peso, 30 % en peso, 40 % en peso, 50 % en peso, 60 % en peso, 70 % en peso, 80 % en peso, 90 % en peso o 95 % en peso de PHB.

- 5 Las características físicas del PHB son muy conocidas en la técnica. Como aproximación, el PHB tiene un módulo de Young de 1 497-3 500 MPa, una resistencia a la tracción de 18-43 MPa, un alargamiento a la rotura de 1,9-45 %, una cristalinidad de 60-80 %, una temperatura de fusión de 162-180 °C, una temperatura de cristalización de 45-116 °C y/o una temperatura de transición vítrea de -1,2-10 °C.
- 10 Además, pero no incluido en las reivindicaciones, el microorganismo de la invención también puede ser capaz de producir o puede diseñarse para ser capaz de producir otros productos, tales como etanol (documento WO 2007/117157), acetato (documento WO 2007/117157), butanol (documentos WO 2008/115080 y WO 2012/053905), butirato (documento WO 2008/115080), 2,3-butanodiol (documentos WO 2009/151342 y WO 2016/094334), lactato (documento WO 2011/112103), buteno (documento WO 2012/024522), butadieno (documento WO 2012/024522),
- 15 metil etil cetona (2-butanona) (documentos WO 2012/024522 y WO 2013/185123), etileno (documento WO 2012/026833), acetona (documento WO 2012/115527), isopropanol (documento WO 2012/115527), lípidos (documento WO 2013/036147), 3-hidroxipropionato (3-HP) (documento WO 2013/180581), isopreno (documento WO 2013/180584), ácidos grasos (documento WO 2013/191567), 2-butanol (documento WO 2013/185123), 1,2-propanodiol (documento WO 2014/036152), 1-propanol (documento WO 2014/0369152) y productos derivados del corismato (documento WO 2016/191625). Además de uno o más productos diana, el microorganismo de la invención también puede ser capaz de producir etanol, acetato y/o 2,3-butanodiol. La propia biomasa microbiana puede considerarse como un producto.

- 25 Preferentemente, el microorganismo de la invención no es capaz de degradar el PHB. Los organismos que producen de manera natural PHB y otros polihidroxialcanoatos generalmente sintetizan los polímeros como material de almacenamiento de carbono cuando otros nutrientes (p. ej., nitrógeno y fósforo) son limitantes y hay un exceso de carbono. Después, estos organismos pueden despolimerizar/degradar los polímeros cuando se repone el nutriente limitante para tener acceso al carbono almacenado. Con el fin de maximizar la producción de PHB, productores naturales, tales como los microorganismos de la presente invención, a menudo tienen la ventaja de no ser capaces de degradar enzimáticamente los polímeros una vez que se producen. Básicamente, esto bloquea el carbono de los polímeros de forma permanente y puede aumentar el rendimiento.

- "Selectividad" se refiere a la relación de la producción de un producto diana respecto a la producción de todos los productos de fermentación producidos por un microorganismo. El microorganismo de la invención se puede diseñar para producir PHB con una cierta selectividad o con una selectividad mínima. El PHB puede representar al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 % o 75 % de todos los productos de fermentación producidos por el microorganismo de la invención. El PHB puede suponer al menos un 10 % de todos los productos de fermentación producidos por el microorganismo de la invención, de manera que el microorganismo de la invención tenga una selectividad por el PHB de al menos un 10 %. El PHB puede suponer al menos un 30 % de todos los productos de fermentación producidos por el microorganismo de la invención, de manera que el microorganismo de la invención tenga una selectividad por el PHB de al menos un 30 %.

Fermentación

- 45 La invención también proporciona un método de producción de PFH que comprende, cultivar el microorganismo de la invención en presencia de un sustrato gaseoso, de modo que el microorganismo produce PHB. El sustrato gaseoso generalmente comprende uno o más de CO, CO₂ y H₂.

- 50 Normalmente, el cultivo se realiza en un biorreactor. El término "biorreactor" incluye un dispositivo de cultivo/fermentación que consiste en uno o más recipientes, torres o estructuras de tuberías, tal como un reactor de tanque con agitación continua (CSTR, *continuous stirred tank reactor*), un reactor de células inmovilizadas (ICR, *immobilized cell reactor*), un reactor de lecho percolador (TBR, *trickle bed reactor*), una columna de burbujeo, un fermentador de elevación de gases, un mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido. El biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de cultivo/fermentación. El sustrato se puede proporcionar a uno de estos reactores o a ambos. Como se usa en el presente documento, los términos "cultivo" y "fermentación" se utilizan indistintamente. Estos términos abarcan tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del proceso de cultivo/fermentación.

- 60 El cultivo generalmente se mantiene en un medio de cultivo acuoso que contiene nutrientes, vitaminas y/o minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo. Preferentemente, el medio de cultivo acuoso es un medio de crecimiento microbiano anaerobio, tal como un medio de crecimiento microbiano anaerobio mínimo. En la técnica se conocen bien medios adecuados.

- 65 Es deseable que el cultivo se lleve a cabo en condiciones apropiadas para la producción de PHB. Normalmente, el cultivo se realiza en condiciones anaerobias. Las condiciones de reacción a tener en cuenta incluyen presión (o presión parcial), temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH de los medios, potencial redox de los medios, velocidad de

agitación (en caso de utilizar un reactor de tanque con agitación continua), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato gaseoso para garantizar que, en la fase líquida, el gas no se vuelve limitante y concentraciones máximas del producto para evitar la inhibición del producto.

5 El funcionamiento de un biorreactor a presiones elevadas, permite aumentar la tasa de transferencia de masa de gas de la fase gaseosa a la fase líquida. Por consiguiente, generalmente es preferible realizar la fermentación a presiones más altas que la presión atmosférica. Además, dado que una determinada tasa de conversión de gas es en parte una función del tiempo de retención del sustrato y que el tiempo de retención dictamina el volumen requerido de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en gran medida el volumen del biorreactor necesario y, en consecuencia, el coste de capital del equipo de fermentación. A su vez esto significa que el tiempo de retención, definido como el volumen líquido del biorreactor dividido entre el caudal de gas de entrada, puede reducirse cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada, en vez de a presión atmosférica. Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular utilizado. Sin embargo, en general, es preferible llevar a cabo la fermentación a presiones más altas que la presión atmosférica. Además, dado que una determinada tasa de conversión de gas es en parte una función del tiempo de retención del sustrato y que conseguir un tiempo de retención deseado, a su vez, dictamina el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en gran medida el volumen necesario del biorreactor y en consecuencia, el coste de capital del equipo de fermentación.

20 En determinadas realizaciones, la fermentación se realiza sin luz o con una cantidad de luz insuficiente para satisfacer las necesidades energéticas de los microorganismos fotosintéticos o fotótrofos.

25 Los métodos de la invención pueden implicar además la separación o purificación de PHB. El PHB se puede separar o purificar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden recogerse células por precipitación (Chen, Appl Microbiol Biotechnol, 57: 50-55, 2001) o separación continua (Elbahloul, Appl Environ Microbiol, 75: 643-651, 2009; Heinrich, AMB Express, 2: 59, 2012) seguido de liofilización. Después de la liofilización, el polímero puede eliminarse de las células con materiales tales como acetato de etilo (Chen, Appl Microbiol Biotechnol, 57: 50-55, 2001), acetona (Elbahloul, Appl Environ Microbiol, 75: 643-651, 2009), o hipoclorito de sodio (Heinrich, AMB Express, 2: 59, 2012). A continuación, el polímero puede eliminarse de la masa celular residual/solubilizada. Se han publicado y desarrollado un gran número de procesos alternativos para la purificación de polihidroxialcanoatos, pero aún no se han establecido para la purificación a gran escala (Kunasundari, Express Polym Lett, 5, 620-634, 2011).

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la construcción de un microorganismo de Wood-Ljungdahl capaz de sintetizar PHB.

40 Genes de la vía de PHB (*phaC*, *phaA* y *phaB*) de *C. necator* (SEQ ID NO: 1, 4 y 7) se introdujeron en *C. autoethanogenum*, un microorganismo de Wood-Ljungdahl que no produce PHB de manera natural. Cabe destacar que, estas especies tienen diferencias significativas en cuanto al contenido cromosómico de GC. Específicamente, *C. necator* tiene un contenido de GC de 66 % (Pohlmann, Nat Biotechnol, 24: 1257-1262, 2006) y *C. autoethanogenum* tiene solo un contenido de GC de 31 % (Brown, Biotechnol Biofuels, 7: 40, 2014). Anticipando los problemas de expresión génica basados en el uso de codones, las secuencias de los genes de PHB de *C. necator* se adaptaron a los codones para que se ajustaran mejor a un perfil de expresión más alto para las proteínas de *C. autoethanogenum*. Los genes, con secuencias novedosas (SEQ ID NO: 3, 6 y 9) que codifican las mismas proteínas que las de *C. necator*, se sintetizaron y ensamblaron en el vector de expresión pMTL83157 (SEQ ID NO: 10). Este plásmido es similar al de la serie pMTL8000 (Heap, J Microbiol Methods, 78: 79-85, 2009) con un promotor natural de Wood-Ljungdahl tomado de *C. autoethanogenum* para impulsar la transcripción génica. Los genes se colocaron secuencia abajo del promotor en el mismo orden en que aparecían en el genoma de *C. necator*: *phaC*, *phaA* y *phaB*. También se utilizó un marcador de selección de antibióticos, catP. El plásmido resultante se denominó pPHB_01 (SEQ ID NO: 11) (figura 2). El plásmido pPHB_01 se insertó en *C. autoethanogenum* por conjugación bacteriana utilizando la cepa HB101 de *E. coli*, como se describe en cualquier otro lugar (Mock, J Bacteriol, 197: 2965-2980, 2015). Por separado, para actuar como un control negativo, un plásmido pMTL83157 "vacío" se insertó en *C. autoethanogenum*. Después, estas cepas se usaron para probar la producción de PHB a partir de sustratos gaseosos.

60 En una realización preferida, el microorganismo comprende una enzima que convierte acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA que comprende una enzima que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, la enzima que convierte acetoacetyl-CoA en 3-hidroxiacetyl-CoA comprende una enzima que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, y/o la enzima que convierte 3-hidroxiacetyl-CoA en polihidroxiacetyl-CoA comprende una enzima que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la producción de PHB a partir de sustratos gaseosos en frascos Schott.

Las cepas construidas en el Ejemplo 1 se cultivaron en lotes pequeños para probar la producción de PHB. Todo el trabajo se realizó en estrictas condiciones anaerobias (Hungate, *Methods in microbiology*, páginas 117-132, Academic Press, Nueva York, NY, 1969). Se inocularon con las cepas frascos Schott a presión que contenían medio PETC modificado (Köpke, *Appl Environ Microbiol*, 77: 5467-5475, 2011) con tiamfenicol para la retención del plásmido y ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico para el amortiguamiento, y se añadió a los frascos gas compuesto por CO, CO₂, H₂ y N₂ (al 50, 18, 3 y 29 %, respectivamente) como única fuente de carbono a 21 psi. Los cultivos se cultivaron a 37 °C con agitación rotatoria.

El crecimiento celular se controló periódicamente hasta que los cultivos entraron en fase estacionaria. Al finalizar el crecimiento, las células ya no se manipularon en condiciones anaerobias. Las células se recogieron mediante centrifugación, sus sobrenadantes se desecharon, se congelaron a -20 °C y se secaron mediante liofilización.

El rendimiento de PHB se calculó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de manera similar a la descrita en cualquier otro lugar (Karr, *Appl Environ Microbiol*, 46, 1339-1344, 1983). Resumiendo, las células secas se trataron con ácido sulfúrico concentrado y se calentaron para convertir el PHB en ácido crotónico. Las muestras se enfriaron, diluyeron, filtraron y analizaron mediante HPLC con un detector UV-Vis para cuantificar el ácido crotónico. En la figura 3 se resumen los resultados de la producción inicial de PHB, que muestra la producción satisfactoria de ~1,15 % en peso de PHB en un microorganismo de Wood-Ljungdahl.

Sin embargo, dados los bajos rendimientos, en comparación con productores naturales, tales como *Cupriavidus* and *Pseudomonas*, que son capaces de sintetizar polímeros como PHB de manera que representen más del 90 % de su peso, parece que la síntesis de PHB a partir de gas en los microorganismos de Wood-Ljungdahl no es tan sencilla como en los productores naturales que crecen en sustratos no gaseosos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, los inventores postulan que la producción de PHB en microorganismos de Wood-Ljungdahl, puede requerir una adaptación de codones para superar las diferencias en la preferencia de pH, requerimientos de oxígeno, usos de sustrato, etc. entre los microorganismos de Wood-Ljungdahl y los productores naturales de PHB.

Después de lograr la síntesis de PHB en *C. autoethanogenum* a partir de sustratos gaseosos, el trabajo descrito anteriormente se repitió con condiciones de crecimiento alteradas en un esfuerzo por explorar las condiciones que pueden favorecer/mejorar el rendimiento de PHB. En concreto, se realizaron experimentos para repetir las condiciones descritas anteriormente (condición 1, figura 4A), para cambiar la composición del gas a 50/30/10/10 CO/CO₂/H₂/N₂ (condición 2, figura 4B), prolongar la incubación del cultivo a la fase estacionaria (condición 3, figura 4C) y renovar periódicamente el gas en los frascos (condición 4, figura 4D). Como se muestra en las figuras 4A-4D, el crecimiento fue similar tanto para la cepa modificada como para la cepa de control en todas las condiciones probadas.

Las células se recogieron y analizaron para determinar la producción de PHB como se describe anteriormente. Los resultados se representan en la figura 5, que muestra una producción de ~1,65 % en peso de PHB en la condición 1, ~1,50 % en peso de PHB en la condición 2, ~1,50 % en peso de PHB en la condición 3 y ~0,85 % en peso de PHB en la condición 4.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la producción de PHB a partir de sustratos gaseosos en una fermentación continua.

La cepa construida en el Ejemplo 1 se probó con fermentación continua utilizando gas como fuente principal de carbono, en condiciones similares a las descritas en Valgepea, *Cell Syst*, 4: 505-515, 2017. De manera similar a la de los experimentos realizados en frascos Schott, los cultivos continuos se cultivaron y manipularon en condiciones anaerobias. A diferencia de los frascos Schott, los cultivos se cultivaron de manera continua durante aproximadamente 20 días con alimentación constante de medios. Se utilizaron dos composiciones de gas diferentes para el crecimiento y la producción de PHB: 50/20/20/10 CO/CO₂/H₂/Ar y 50/20/2/28 CO/CO₂/H₂/N₂. La captación de gas se controló mediante espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) y se tomaron muestras periódicamente para cuantificar los metabolitos líquidos mediante HPLC.

El PHB no se cuantificó hasta la finalización de la fermentación continua. De manera similar a los experimentos realizados en frascos Schott, las células se recogieron mediante centrifugación, se congelaron y se secaron mediante liofilización. Posteriormente, las células secas se analizaron para detectar PHB mediante tratamiento con ácido sulfúrico y calor para convertir el PHB en ácido crotónico. A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de PHB mediante HPLC. En la figura 6 se muestran los resultados de la producción de PHB en la fermentación continua. En concreto, los microorganismos cultivados en hidrógeno gaseoso al 20 % produjeron ~0,45 % en peso de PHB y los microorganismos cultivados en hidrógeno gaseoso al 2 % produjeron ~0,25 % en peso de PHB.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la optimización del fermentador para aumentar la producción de PHB.

Se probaron varias condiciones dentro de fermentaciones continuas para aumentar el contenido de PHB en las células. Las reservas de acetil-CoA y NADPH aumentaban a menores concentraciones de biomasa (Valgepea, Cell Syst., 4: 505-515, 2017). Por lo tanto, se probó si una menor concentración de biomasa en estado de equilibrio daría como resultado una mayor cantidad de PHB aumentando las concentraciones de las reservas de acetil-CoA y NADPH. La disminución de la tasa de captación de CO₂ y, por extensión, de la concentración de biomasa en el fermentador, demostró aumentar el flujo de recursos celulares hacia el PHB (figura 7).

Otro factor que aumentó el PHB fue el pH. A un pH más alto, menos ácido acético se difundiría y desacoplaría la fuerza motriz de protones (PMF, *proton motive force*) (Valgepea, Cell Syst., 4: 505-515, 2017). Por lo tanto, se probó si aumentar el pH de 5 a 5,5 o 6 consumiría menos energía para mantener la PMF. La energía adicional disponible proporcionaría ATP adicional para respaldar la producción de PHB al reducir la producción de acetato necesaria para la producción de ATP. Cambiar el pH de 5,0 a 5,5 o 6,0 dio como resultado una mayor producción de PHB (~12,5 veces a pH 5,5). Sin embargo, es difícil mantener un valor de pH de 6,0, ya que *C. autoethanogenum* crece de manera óptima a un pH más ácido.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra cambios a nivel transcripcional y del metaboloma cuando se produce PHB, en comparación con la cepa de control (plásmido vacío).

El análisis de los datos del transcriptoma de la secuenciación del ARN se basó en una secuencia de comandos (*script*) en R publicada anteriormente (Valgepea, Cell Syst., 4: 505-515, 2017) con las siguientes modificaciones: uso de la secuencia de referencia CP006763.1 del NCBI de *C. autoethanogenum* y su genoma anotado descrito en Brown, Biotechnol. Biofuels, 7: 40, 2014; adición de la secuencia de nucleótidos de los tres genes de PHB (SEQ ID NO: 3, 6, 9).

Para realizar el análisis estadístico de los datos de metabolómica intracelular, se utilizó un paquete de metabolómica disponible en R (Livera y Bowne, R package, 2014). Esta secuencia de comandos normaliza e integra los datos de metabolómica en un ajuste de modelo lineal (De Livera, Anal. Chem., 84: 10768-10776, 2012). Las concentraciones de metabolitos intracelulares se normalizaron por biomasa ($\mu\text{mol/g}$ de PCS) antes de importar los datos a la secuencia de comandos. Para el análisis estadístico de los datos del metaboloma se usó un ajuste de modelo lineal utilizando datos estadísticos corrientes (es decir, no bayesianos) (De Livera, Anal. Chem., 84: 10768-10776, 2012; De Livera, Metabolomics Tools for Natural Product Discovery, 2013).

Aunque no se suministró arginina, se observó una regulación positiva de la vía de la arginina desiminasa, una vía alternativa encontrada para proporcionar ATP en acetógenos (Valgepea, Metab. Eng. 41: 202-211, 2017) (valor de $q < 0,01$): arginina desiminasa (CAETHG_3021, ~7 veces); ornitina carbamoiltransferasa (CAETHG_3022, ~6 veces); carbamato cinasa (CAETHG_3025, ~3,3 veces). Además, tres genes que codificaban el complejo Rnf, que forma parte del complejo de conservación de energía en acetógenos (Schuchmann y Müller, Nat. Rev. Microbiol. 12: 809-821, 2014), mostraron un aumento de ~2 veces en la cepa de PHB: (CAETHG_3231, valor de $q=0,02$; CAETHG_3228, valor de $q=0,04$ y CAETHG_3230, valor de $q=0,03$). Estas observaciones resaltan cambios en el metabolismo energético debido a la producción heteróloga. Además, la expresión de dos genes de la vía de Wood-Ljungdahl (WLP) que codifican la CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (CAETHG_1610, ~1,4 veces; CAETHG_1611, ~1,2 veces) y un gen que codifica una (FeFe)-hidrogenasa (CAETHG_1691, ~2,5 veces) se reguló positivamente en la cepa de PHB. Estos cambios pueden reflejar el aumento necesario para la producción de acetil-CoA y NADPH para la producción de PHB (figura 1).

A nivel del metaboloma, la cepa de PHB tenía una relación NADH/NAD⁺ intracelular más alta en comparación con el EP. Esto sugiere posibles cambios en el estado redox después de la expresión de PHB. La producción de acetato, el principal subproducto natural del metabolismo de *C. autoethanogenum* (Abrini, Arch. Microbiol., 161: 345-351, 1994; Marcellin, Green Chem., 18: 3020-3028, 2016), disminuyó en comparación con la de la cepa de EP en sintegás (valor de $p < 0,01$; prueba de la *t* bilateral con la misma varianza). No se observó ningún cambio en el gas residual de aceria.

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra los resultados de reconstrucciones de modelos metabólicos a escala genómica (GEM, *genome-scale metabolic*). Se utilizó el modelo metabólico a escala genómica GEM iCLAU786 (Valgepea, Cell Syst., 4: 505-515, 2017) con la adición de la vía de PHB. Se realizaron simulaciones para la cepa de PHB cultivada en sintegás en todas las condiciones indicadas anteriormente.

Las simulaciones de flujo confirmaron que se disipaba menos CO₂ en las condiciones con mayor PHB (es decir, "menor concentración de biomasa" y a un "pH de 5,5"). Además, como se ha observado anteriormente (Valgepea, Cell Syst., 4: 505-515, 2017), estas simulaciones también mostraron que el CO₂ se redujo directamente a formiato por H₂ a través de la actividad de la formiato-H₂ liasa del complejo enzimático de la hidrogenasa-formiato deshidrogenasa con bifurcación de electrones (HytA-E/FdhA) (Wang, J. Bacteriol., 195: 4373-4386, 2013). Esto ofrece una ventaja sobre

la reducción de CO₂ por la formiato deshidrogenasa consumidora de redox, porque durante la reducción de CO₂ en la vía de WLP (Wood-Ljungdah), no se consume redox utilizando el antiguo complejo enzimático. También se observó que en los experimentos de "Baja concentración de biomasa" y "pH de 5,5", se conseguía equilibrar la cantidad total de ferredoxina reducida aumentando o disminuyendo el flujo de algunas reacciones clave, como la reacción de bifurcación de la AOR (aldehído ferredoxina oxidoreductasa), del complejo de Nfn o de la metileno THF reductasa, en comparación con el control (PHB20).

Sorprendentemente, la condición de "control" (PHB20) tenía, informáticamente, menor coste de mantenimiento de ATP (mmol/g de PCS/h) y costes de mantenimiento de ATP a partir de la producción total de ATP (% de mATP) en comparación con la condición "PHBpH5,5".

También se procesaron simulaciones para determinar si el ATP, NADH NADPH o la ferredoxina reducida (Fd_{red}) estaban limitando la producción de PHB. Las simulaciones mostraron que, cuando se proporcionaba ATP, la producción de PHB (mmol/g de PCS/h) alcanzaba su valor máximo entre los candidatos "limitantes" en todas las condiciones probadas (es decir, "PHB20", "PHBMcB", y "PHBpH5,5"). Esta observación es coherente con la idea de que el metabolismo del acetógeno está limitado por el ATP (Schuchmann y Müller, Nat. Rev. Microbiol. 12: 809-821, 2014). El modelo también mostró que, seguido de la limitación de ATP, la producción de PHB está limitada por la Fd_{red}, NADPH, y después la disponibilidad de NADH (figura 8).

Este resultado confirma la importancia del ATP y de la Fd_{red} como portadores de alta energía en acetógenos. Como el ATP soporta principalmente el anabolismo y el mantenimiento celular, la Fd_{red} es esencial para el complejo de conservación de energía Rnf (Biegel, Cell. Mol. Life Sci. 68: 613-634, 2011) y se sabe que solo la Fd_{red} proporciona electrones para la reducción de CO₂ a CO en la rama carbonílica de la vía de WLP (Schuchmann y Müller, Nat. Rev. Microbiol. 12: 809-821, 2014).

Se ha de interpretar que el uso de los términos "un", "uno/una" y "el/la" y las referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. Se ha de interpretar que las expresiones "que comprende(n)", "que tiene(n)", "que incluye(n)", y "que contiene(n)", son expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye(n), aunque no de forma limitativa"), salvo que se indique lo contrario. La expresión "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una composición, proceso o método a los materiales o etapas que se especifican, o a aquellos que no influyen materialmente en las características básicas y novedosas de la composición, proceso o método. El uso de la alternativa (p. ej., "o") debe entenderse que significa o bien una, ambas o cualquier combinación de las mismas alternativas. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa $\pm 20\%$ del intervalo, valor o estructura indicado, a menos que se indique de otro modo.

La enumeración de intervalos de valores en el presente documento, sólo pretende servir como método abreviado para referirse individualmente a cada uno de los distintos valores que se encuentren dentro del intervalo, salvo que se indique lo contrario en el presente documento y cada distinto valor se incorpora a la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento. Por ejemplo, debe entenderse que, cualquier intervalo de concentración, de porcentaje, de relación, de números enteros, de tamaño o de grosor, incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique de otro modo.

Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, pretende simplemente ilustrar mejor la invención. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva ha de interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de esta invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen dichas variaciones según convenga, y también pretenden que la invención se ponga en práctica de una manera distinta a la descrita específicamente en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LanzaTech, Inc.

<120> PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN MICROORGANISMOS DE WOOD-LJUNGDAHL

<130> LT128WO1

<150> US 62/568.127

<151> 04/10/2017

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 1179

<212> ADN

<213> *Cupriavidus necator*

10

<400> 1

```

atgactgacg ttgtcatcgt atccgccgcc cgcaccgcgg tcggcaagtt tggcggctcg      60
ctggccaaga tcccggcacc ggaactgggt gccgtggtca tcaaggccgc gctggagcgc      120
gccggcgtca agccggagca ggtgagcгаа gtcatcatgg gccaggtgct gaccgccggt      180
tcggggccaga accccgcacg ccaggccgcg atcaaggccg gcctgccggc gatggtgccg      240
gccatgacca tcaacaaggt gtgctggctcg ggcctgaagg ccgtgatgct ggccgccaac      300
gcgatcatgg cgggcgacgc cgagatcgtg gtggccggcg gccaggaaaa catgagcgc      360
gccccgcacg tgctgccggg ctgcgcgat ggtttccgca tgggcgatgc caagctggtc      420
gacacatga tcgtcgacgg cctgtgggac gtgtacaacc agtaccacat gggcatcacc      480
gccgagaacg tggccaagga atacggcatc acacgcgagg cgcaggatga gttcgccgtc      540
ggctcgcaga acaaggccga agccgcgcag aaggccggca agtttgacga agagatcgtc      600
ccggtgctga tcccgcagcg caagggcgac ccggtggcct tcaagaccga cgagttcgtg      660
cgccagggcg ccacgctgga cagcatgtcc ggcctcaagc ccgccttcga caaggccggc      720
acggtgaccg cggccaacgc ctcgggcctg aacgacggcg ccgcccggt ggtggtgatg      780
tcggcggcca agccaagga actgggcctg accccgctgg ccacgatcaa gagctatgcc      840
aacgccggtg tcgatcccaa ggtgatgggc atgggcccgg tgccggcctc caagcgcgcc      900
ctgtcgcgcg ccgagtggac cccgcaagac ctggacctga tggagatcaa cgaggccttt      960
gccgcgcagg cgctggcggg gcaccagcag atgggctggg acacctcaa ggtcaatgtg     1020
aacggcggcg ccatcgccat cggccacccg atcggcgcgt cgggctgccg taccctgggtg     1080
acgctgctgc acgagatgaa gcgccgtgac gcgaagaagg gcctggcctc gctgtgcatc     1140
ggcggcggca tgggcgtggc gctggcagtc gagcgcaaa                               1179

```

15

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> *Cupriavidus necator*

20

<400> 2

ES 2 928 891 T3

Met Thr Asp Val Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Lys
1 5 10 15

Phe Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ile Pro Ala Pro Glu Leu Gly Ala Val
20 25 30

Val Ile Lys Ala Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val Lys Pro Glu Gln Val
35 40 45

Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn
50 55 60

Pro Ala Arg Gln Ala Ala Ile Lys Ala Gly Leu Pro Ala Met Val Pro
65 70 75 80

Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met
85 90 95

Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala
100 105 110

Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser
115 120 125

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

Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr
145 150 155 160

Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp
165 170 175

Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala
180 185 190

Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys
195 200 205

Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala
210 215 220

ES 2 928 891 T3

Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly
225 230 235 240

Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala
245 250 255

Val Val Val Met Ser Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro
260 265 270

Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val
275 280 285

Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala
290 295 300

Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe
305 310 315 320

Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser
325 330 335

Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly
340 345 350

Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg
355 360 365

Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met
370 375 380

Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys
385 390

- <210> 3
- <211> 1182
- <212> ADN
- <213> Ácido nucleico sintético
- <400> 3

5

ES 2 928 891 T3

atgactgatg tagtaatagt atctgcagca agaacggcag ttggaaaatt tggaggatct 60
 ttggctaaaa tacctgcacc agaactaggg gcagtgggta taaaagcagc actggaaagg 120
 gccggcgctca aaccagaaca ggtttcagaa gtaattatgg gacaagtttt aacagctgga 180
 tcaggtcaga atcctgcaag acaagcagct attaaagcag gacttccagc aatgggtgcca 240
 gctatgacca taaataaggt ttgtggcagt ggattaaagg cagtaatggt ggcagctaat 300
 gcaataatgg caggatgatgc agaaatagtt gtagcagggt gtcaagaaa tatgtctgct 360
 gcaccacatg tactgccggg atctagggat ggtttttagga tgggagatgc aaaattgggtg 420

 gatacaatga tagtagatgg actttgggat gtatacaatc agtatcacat gggaaattaca 480
 gctgaaaatg ttgctaaaga atatggaata actagagaag ctcaagatga gtttgcagta 540
 ggttcacaaa ataaggctga agcagcacia aaagccggaa aatttgatga ggaaatagtt 600
 cctgtattaa taccacaaaag aaaaggagat cctgtagcat ttaaaacaga tgaatttgta 660
 cgccagggag ctacattgga ttcaatgtct ggcttaaaac cggcctttga taaggcaggt 720
 actgtaactg cagctaatgc aagtgggtta aatgatggag cagcagcagt tgtggtaatg 780
 tcagcagcta aagctaaaga gttgggtctt actccacttg caactataaa gagctatgca 840
 aatgcaggag tcgatccaaa ggtcatgggc atgggtcctg ttccagcgtc taaaagagca 900
 ctaagtagag ctgaatggac accacaagac ctggatctta tggaaataaa tgaagcattt 960
 gctgcbgagg cccttgctgt ccatcaacaa atgggatggg atacttcaaa agtaaatgtg 1020
 aatggaggag ctattgccat agggcatccc attggagcca gtggatgccg catttttagta 1080
 actttacttc atgagatgaa aagaagagat gcaaaaaaag gacttgccag cttatgtata 1140
 ggtggaggaa tgggtgtagc tttagccggt gaaagaaaat aa 1182

<210> 4
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> *Cupriavidus necator*

 <400> 4

5

ES 2 928 891 T3

```

atgactcagc gcattgcgta tgtgaccggc ggcatgggtg gtatcggaac cgccatttgc      60
cagcggctgg ccaaggatgg ctttcgtgtg gtggccggtt gcggcccaa ctcgccgcgc      120
cgcgaaaagt ggctggagca gcagaaggcc ctgggcttcg atttcattgc ctcggaaggc      180
aatgtggctg actgggactc gaccaagacc gcattcgaca aggtcaagtc cgaggtcggc      240
gaggttgatg tgtgatcaa caacgccggt atcaccgcgc acgtggtgtt ccgcaagatg      300
accgcgccg actgggatgc ggtgatcgac accaacctga cctcgctgtt caacgtcacc      360
aagcaggtga tcgacggcat ggccgaccgt ggctggggcc gcatcgtcaa catctcgtcg      420
gtgaacgggc agaagggcca gttcggccag accaactact ccaccgcaa ggccggcctg      480
catggcttca ccatggcact ggcgcaggaa gtggcgacca agggcgtgac cgtcaacacg      540
gtctctccgg gctatatcgc caccgacatg gtcaaggcga tccgccagga cgtgctcgac      600
aagatcgtcg cgacgatccc ggtcaagcgc ctgggcctgc cggaagagat cgcctcgatc      660
tgcgcctggt tgcgtcgga ggagtccggt ttctcgaccg gcgccgactt ctcgctcaac      720
ggcggcctgc atatgggctg a                                          741

```

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> *Cupriavidus necator*

<400> 5

5

ES 2 928 891 T3

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
1 5 10 15

Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
20 25 30

Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
35 40 45

Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
50 55 60

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
65 70 75 80

Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
85 90 95

Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
100 105 110

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

Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
130 135 140

Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
145 150 155 160

His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
165 170 175

Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
180 185 190

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
195 200 205

Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu
210 215 220

Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn
225 230 235 240

Gly Gly Leu His Met Gly
245

ES 2 928 891 T3

<210> 6
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> Ácido nucleico sintético

5 <400> 6

atgacacaga gaatagctta tgtaactgga ggaatggggg gaattggcac ggcaatatgt 60
 cagagattag caaaggatgg ttttagagta gttgcggggt gtggcccaaa ctcaccgagg 120
 agagaaaaat ggttggaaaca gcagaaagct ctcgattttg actttatagc tagtgagggt 180
 aatgttgctg attgggattc aacaaagaca gcttttgata aggttaagtc agaagtgggt 240
 gaagtagatg tgctcataaa taatgctggg atcacaagag atgtagtttt tagaaaaatg 300
 acaagagctg actgggatgc tgtaatagat acaaacttta ctagcttatt caatgtaacg 360
 aacaggтта tagatggaat ggcagatagg ggatggggta ggatagtaaa tatttcatca 420
 gtaaatggtc aaaaaggaca atttggacaa acaaattatt caactgcaa ggcaggactt 480
 catggattta cgatggcact tgcacaggaa gtagctacta aaggagttac tgtaaataca 540
 gtttctccag gatacatagc tactgatatg gtaaaagcta ttaggcagga tgtattagat 600
 aagattgtag caacaatacc tgtgaagaga cttggcttac ctgaagaaat agcatcaata 660
 tgtgcttggт tatccagtga agaatcagga ttttctacag gagctgattt ctccttgaat 720
 ggtggacttc acatgggata a 741

10 <210> 7
 <211> 1770
 <212> ADN
 <213> *Cupriavidus necator*

15 <400> 7

atggcgaccg gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtcca accattcaag 60
 gtcacgcccg ggccattcga tccagccaca tggctggaat ggtcccgcca gtggcagggc 120
 actgaaggca acggccacgc ggccgcgtcc ggcattccgg gcctggatgc gctggcaggc 180
 gtcaagatcg cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggacttctca 240
 gcgctgtggc aggccatggc cgagggcaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg 300
 cgcttcgccc ggcagcgcgtg gcgcaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgttctac 360
 ctgcccaatg cgcgcgcctt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc 420
 cgccagcgca tccgcttcgc gatctcgcaa tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc 480
 cttgccacca atcccagggc gcagcgcctg ctgatcgagt cgggcggcga atcgctgcgt 540

ES 2 928 891 T3

```

gccggcgtgc gcaacatgat ggaagacctg acacgcggca agatctcgca gaccgacgag      600
agcgcgtttg aggtcggccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac      660
gagtacttcc agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgtg      720
ctgatggtgc cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg      780
ctggtgcgcc atgtggtgga gcagggacat acggtgtttc tgggtgctg gcgcaatccg      840
gacgccagca tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacgcggc catccgcgcc      900
atcgaagtcg cgcgcgacat cagcggccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgcgtg      960
ggcggcacca ttgtctcgac cgcgctggcg gtgctggccg cgcgcggcga gcacccggcc     1020
gccagcgtca cgctgctgac cacgctgctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc     1080
tttgtcgacg agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tgggcggcgg cgccggcgcg     1140
ccgtgcgcgc tgetgcgcgg ccttgagctg gccaatacct tctcgttctt gcgcccgaac     1200
gacctggtgt ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacacgcc ggtgccgttc     1260
gacctgctgt tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggta ctgctggtac     1320
ctgcgccaca cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc     1380
gtgccggtgg acctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacggctc gcgcaagac     1440
catatcgtgc cgtggaccgc ggcctatgcc tcgaccgcgc tgetggcgaa caagctgcgc     1500
ttcgtgctgg gtgcgtcggg ccatatcgcc ggtgtgatca acccgccggc caagaacaag     1560
cgcagccact ggactaacga tgcgctgccg gagtcgccgc agcaatggct ggccggcgcc     1620
atcgagcatc acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc     1680
gcgaaacgcg ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgct atcgcgcaat cgaacccgcg     1740
cctgggcgat acgtcaaagc caaggcatga                                     1770

```

<210> 8
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> *Cupriavidus necator*

5

<400> 8

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
 20 25 30

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
 35 40 45

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala

10

ES 2 928 891 T3

50						55										60
Pro	Ala	Gln	Leu	Gly	Asp	Ile	Gln	Gln	Arg	Tyr	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	
65					70					75					80	
Ala	Leu	Trp	Gln	Ala	Met	Ala	Glu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	Pro	
				85					90					95		
Leu	His	Asp	Arg	Arg	Phe	Ala	Gly	Asp	Ala	Trp	Arg	Thr	Asn	Leu	Pro	
			100					105					110			
Tyr	Arg	Phe	Ala	Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Leu	Thr	
		115					120					125				
Glu	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Arg	Ile	
	130					135					140					
Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Gln	Trp	Val	Asp	Ala	Met	Ser	Pro	Ala	Asn	Phe	
145					150					155					160	
Leu	Ala	Thr	Asn	Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Ile	Glu	Ser	Gly	Gly	
				165					170					175		
Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Val	Arg	Asn	Met	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Arg	
			180					185					190			
Gly	Lys	Ile	Ser	Gln	Thr	Asp	Glu	Ser	Ala	Phe	Glu	Val	Gly	Arg	Asn	
		195					200					205				
Val	Ala	Val	Thr	Glu	Gly	Ala	Val	Val	Phe	Glu	Asn	Glu	Tyr	Phe	Gln	
	210					215					220					
Leu	Leu	Gln	Tyr	Lys	Pro	Leu	Thr	Asp	Lys	Val	His	Ala	Arg	Pro	Leu	
225					230					235					240	
Leu	Met	Val	Pro	Pro	Cys	Ile	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln	
				245					250					255		
Pro	Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Arg	His	Val	Val	Glu	Gln	Gly	His	Thr	Val	
			260					265					270			
Phe	Leu	Val	Ser	Trp	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Ser	Thr	
		275					280					285				
Trp	Asp	Asp	Tyr	Ile	Glu	His	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ile	Glu	Val	Ala	
	290					295					300					

ES 2 928 891 T3

Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 305 310 315 320

 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 325 330 335

 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 340 345 350

 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln
 355 360 365

 Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu
 370 375 380

 Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn
 385 390 395 400

 Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr
 405 410 415

 Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu
 420 425 430

 Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn
 435 440 445

 Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
 450 455 460

 Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
 465 470 475 480

 His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
 485 490 495

 Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val
 500 505 510

 Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala
 515 520 525

 Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His
 530 535 540

 Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly
 545 550 555 560

ES 2 928 891 T3

Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
565 570 575

Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys
580 585

<210> 9

<211> 1767

5 <212> ADN

<213> Ácido nucleico sintético

<400> 9

ES 2 928 891 T3

atggctacag gaaaaggagc agcagctagt acacaggaag gaaaatcaca accgtttaa 60
 gttacaccag gtccttttga cccagccacc tggttagaat ggtcacgcca gtggcagggt 120
 actgagggaa atggacatgc agcagcaagt ggcattccag gattggatgc tcttgetggg 180
 gtaaagatag ctccagctca gcttggagat atacaacaga gatatatgaa agatttttca 240
 gctctttggc aagccatggc agaaggaaaa gcagaagcga caggccact tcatgacaga 300
 agatttgctg gagatgcttg gagaactaat ttgccatata gatttgctgc cgctttttat 360
 cttttgaatg ccagagcttt aactgagctt gcagatgctg tagaagctga tgctaaaaca 420
 agacagagaa taagatttgc tatttcccaa tgggttgatg ctatgtcgcc ggcaatttt 480
 ttagctacaa atcctgaggc acagagatta cttattgagt ccggaggaga atcactaagg 540
 gctggagtga gaaatatgat ggaagatttg accagaggaa agatctctca gacagacgaa 600
 tctgcatttg aagtaggaag gaatgttgcg gtaactgaag gtgctgttgt atttgaaaat 660
 gaatattttc aattactaca atataaacct ttgacagaca aggtgcatgc tagacctctt 720
 cttatggttc caccttgtat aaataaatat tatatttttag atcttcagcc tgaatcatct 780
 ttagtaagac acgtttaga acaaggtcac acagtatfff tagtttcttg gaaaaatcct 840
 gacgcacta tggccggcag tacctgggat gattatatag aacatgcagc aataagggca 900
 atagaagttg ctagagatat aagcggtcag gacaagatta atgtacttgg attttgtgta 960
 ggaggaacta tagtttcaac agcactggca gtattggctg ctagaggaga acatccagca 1020
 gcatcggtaa ctttacttac aacactttta gattttgcag atactggaat attagacgta 1080
 tttgttgatg aaggacacgt acaattaaga gaggcaacct tgggtggagg agctggtgca 1140
 ccctgtgctc ttcttagagg gttagaatta gcaaatactt ttagtttttt acgacctaat 1200
 gacttagttt ggaattatgt agtggataat taccttaaag gaaacacacc tgtacctttt 1260
 gatttattat tttggaatgg agatgcaacc aacttgctg gtccttggta ttgttggat 1320
 cttagacata cctacctca aatgaatta aaagttcctg gcaaactcac tgtatgcggt 1380
 gtccccgttg atttggcttc aatagatgta ccaacttata tatacggag tagagaggat 1440

 catatcgtac cttggactgc ggcttacgct tctacagcat tgctggctaa taaattgaga 1500
 tttgtattag gagcttctgg tcacatagct ggagtaataa atccaccagc caaaaataaa 1560
 cgaagtcatt ggaccaatga tgcacttctt gaatctccac agcagtggct tgctggtgca 1620
 atagaacatc atggttcatg gtggccccgac tggacagcat ggttggcagg tcaagccggt 1680
 gctaaaaggg ctgcgccagc aaactatggc aatgcaagat acagggctat agaaccggct 1740
 ccaggaagat acgttaaagc aaaataa 1767

<210> 10
<211> 5024

ES 2 928 891 T3

<212> ADN

<213> Ácido nucleico sintético

<400> 10

5

```

cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaaata gttttatcta caattttttt      60
atcaggaaac agctatgacc gcggccgcag atagtcataa tagttccaga atagttcaat      120
ttagaaatta gactaaactt caaaatgttt gttaaataata taccaaacta gtatagatat      180
tttttaaata ctggacttaa acagtagtaa tttgcctaaa aaattttttc aatttttttt      240
aaaaaatcct tttcaagttg tacattgtta tggtaatatg taattgaaga agttatgtag      300
taatattgta aacgtttcct gattttttta catccatgta gtgcttaaaa aaccaaata      360
tgtcacatgc aattgtatat ttcaaataac aatatttatt ttctcgtaa attcacaat      420
aatttattaa taatatcaat aaccaagatt atacttaaat ggatgtttat ttttaacac      480
ttttatagta aatatattta ttttatgtag taaaaagggt ataattataa ttgtatttat      540
tacaattaat taaaataaaa atagggtttt aggtaaaatt aagttatttt aagaagtaat      600
tacaataaaa attgaagtta ttgctttaag gaggaatta ttcatatgac catgattacg      660
aattcgagct cgttaccggg ggatcctcta ggtcgcagct cacgcgtcca tggagatctc      720
gaggcctgca gacatgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa      780
aacctggcg ttaccaact taatcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt      840
aatagcgaag aggccgcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa      900
tggcgctagc ataaaaataa gaagcctgca tttgcaggct tcttattttt atggcgcgcc      960
gccattattt ttttgaacaa ttgacaattc atttcttatt ttttattaag tgatagtcaa     1020
aaggcataac agtgcgtaat agaaagaaat ttacagaaaa gaaaattata gaatttagta     1080
tgattaatta tactcattta tgaatgttta attgaatata aaaaaaata cttgttatgt     1140
attcaattac gggttaaaat atagacaagt tgaaaaattt aataaaaaaa taagtcctca     1200
gctcttatat attaagctac caacttagta tataagccaa aacttaaatg tgctaccaac     1260
acatcaagcc gtagagaac tctatctata gcaatatttc aaatgtaccg acatacaaga     1320

```

ES 2 928 891 T3

gaaacattaa ctatataat tcaatttatg agattatcctt aacagatata aatgtaaatt 1380
 gcaataagta agatttagaa gtttatagcc tttgtgtatt ggaagcagta cgcaaaggct 1440
 tttttatttg ataaaaatta gaagtatatt tttttttca taattaattt atgaaaatga 1500
 aaggggtga gcaaagtac agaggaaagc agtatcctat caaataacaa ggtattagca 1560
 atatcattat tgacttttagc agtaaacatt atgactttta tagtgcttgt agctaagtag 1620
 tacgaaaggg ggagctttaa aaagctcctt ggaatacata gaattcataa attaatttat 1680
 gaaaagaagg gcgtatatga aaacttgtaa aaattgcaa gagtttatta aagatactga 1740
 aatagcaaa atacattcgt tgatgattca tgataaaaca gtagcaacct attgcagtaa 1800
 atacaatgag tcaagatggt tacataaagg gaaagtccaa tgtattaatt gttcaaagat 1860
 gaaccgatat ggatggtgtg ccataaaaat gagatgtttt acagaggaag aacagaaaaa 1920
 agaacgtaca tgcattaaat attatgcaag gagctttaa aaagctcatg taaagaagag 1980
 taaaaagaaa aaataattta tttattaatt taatattgag agtgccgaca cagtatgcac 2040
 taaaaaatat atctgtggtg tagtgagccg atacaaaagg atagtactc gcattttcat 2100
 aatacatcct atgttatgat tatgtgtcgg tgggacttca cgacgaaaac ccacaataaa 2160
 aaaagagttc ggggtagggt taagcatagt tgaggcaact aaacaatcaa gctaggatat 2220
 gcagtagcag accgtaaggc cgttgtttag gtgtgttga atacatacgc tattaagatg 2280
 taaaaatagc gataccaatg aagggaaaag tataattttt ggatgtagtt tgtttgttca 2340
 tctatgggca aactacgtcc aaagccgttt ccaaatctgc taaaaagtat atcctttcta 2400
 aatcaaagt caagtatgaa atcataaata aagtttaatt ttgaagttat tatgatatta 2460
 tgtttttcta ttaaaataaa ttaagtatat agaatagttt aataatagta tatacttaat 2520
 gtgataagtg tctgacagtg tcacagaaag gatgattggt atggattata agcggccggc 2580
 cagtgggcaa gttgaaaaat tcacaaaaat gtggtataat atccttggtc attagagcga 2640
 taaacttgaa tttgagaggg aacttagatg gtatttgaaa aaattgataa aaatagttgg 2700
 aacagaaaag agtattttga ccactacttt gcaagtgtac cttgtaccta cagcatgacc 2760
 gttaaagtgg atatcacaca aataaaggaa aagggaaatga aactatatcc tgcaatgctt 2820
 tattatattg caatgattgt aaaccgcat tcagagttta ggacggcaat caatcaagat 2880
 ggtgaattgg ggatatatga tgagatgata ccaagctata caatatttca caatgatact 2940
 gaaacatttt ccagcctttg gactgagtgt aagtctgact ttaaatcatt tttagcagat 3000
 tatgaaagtg atacgcaacg gtatggaac aatcatagaa tggaaggaaa gccaaatgct 3060
 ccggaaaaca tttttaatgt atctatgata ccgtggtcaa ccttcgatgg cttaaatctg 3120
 aatttgcaga aaggatatga ttatttgatt cctattttta ctatggggaa atattataaa 3180
 gaagataaca aaattatact tcctttggca attcaagttc atcacgcagt atgtgacgga 3240

ES 2 928 891 T3

tttcacattt gccgttttgt aaacgaattg caggaattga taaatagtta acttcagggt 3300
 tgtctgtaac taaaaacaag tatttaagca aaaacatcgt agaaatacgg tgttttttgt 3360
 taccctaagt ttaaactcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt 3420
 tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 3480
 tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 3540
 ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag 3600
 ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 3660
 gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctggtaccag tggctgctgc cagtggcgat 3720
 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg 3780
 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg 3840
 agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac 3900
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga 3960
 aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 4020
 ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 4080
 cggttcctgg ccttttctg gccttttct cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat 4140
 tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg 4200
 accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg cagggccccc 4260
 tgcttcgggg tcattatagc gatTTTTTcg gtatatccat cctttttcgc acgatataca 4320
 ggattttgcc aaagggttcg tgtagacttt ccttgggtgta tccaacggcg tcagccgggc 4380
 aggataggtg aagtaggcc acccgcgagc ggggtgtcct tcttcaactgt cccttattcg 4440
 cacctggcgg tgctcaacgg gaatcctgct ctgagaggct ggccggctac cgccggcgta 4500
 acagatgagg gcaagcggat ggctgatgaa accaagccaa ccaggaaggg cagcccacct 4560
 atcaaggtgt actgccttcc agacgaacga agagcgattg aggaaaaggc ggcggcggcc 4620
 ggcatgagcc tgtcggccta cctgctggcc gtcggccagg gctacaaaat cacgggcgtc 4680
 gtggactatg agcacgtccg cgagctggcc cgcacatg gcgacctggg ccgcctgggc 4740
 ggcctgctga aactctggct caccgacgac ccgcgcacgg cgcggttcgg tgatgccag 4800
 atcctcgccc tgctggcgaa gatcgaagag aagcaggacg agcttggcaa ggtcatgatg 4860
 ggcgtggtcc gcccgagggc agagccatga cttttttagc cgctaaaacg gccgggggggt 4920
 gcgcgtgatt gccaaagcag tccccatgcg ctccatcaag aagagcgact tcgaggagct 4980
 ggtgaagtac atcaccgacg agcaaggcaa gaccgatcgg gcc 5024

<210> 11
 <211> 8765
 <212> ADN

ES 2 928 891 T3

<213> Ácido nucleico sintético

<400> 11

cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaaata gttttatcta caattttttt	60
atcaggaaac agctatgacc ggggccgcag atagtcataa tagttccaga atagttcaat	120
ttagaaatta gactaaactt caaaatgttt gttaaata taccaaacta gtatagatat	180
tttttaaata ctggacttaa acagtagtaa tttgcctaaa aaattttttc aatttttttt	240
aaaaaatcct tttcaagttg tacattgtta tggtaatatg taattgaaga agttatgtag	300
taatattgta aacgtttctt gattttttta catccatgta gtgcttaaaa aaccaaata	360
tgtcacatgc aattgtatat ttcaaataac aatatttatt ttctcgtaa attcacaaat	420
aatttattaa taatatcaat aaccaagatt aactttaat ggatgtttat tttttaacac	480
ttttatagta aatatattta ttttatgtag taaaaaggtt ataattataa ttgtatttat	540
tacaattaat taaaaataaaa atagggtttt aggtaaaatt aagttatttt aagaagtaat	600
tacaataaaa attgaagtta ttgctttaag gaggaatta ttcatatggc tacaggaaaa	660
ggagcagcag ctagtacaca ggaaggaaaa tcacaaccgt ttaaagttac accaggtcct	720
tttgaccag ccacctggtt agaatggtca cgccagtggc agggactga gggaaatgga	780
catgcagcag caagtggcat tccaggattg gatgctcttg ctggggtaaa gatagctcca	840
gctcagcttg gagatataca acagagatat atgaaagatt tttcagctct ttggcaagcc	900
atggcagaag gaaaagcaga agcgacaggt ccacttcatg acagaagatt tgctggagat	960
gcttgagaa ctaatttgcc atatagattt gctgccgctt tttatctttt gaatgccaga	1020
gctttaactg agcttgacaga tgctgtagaa gctgatgcta aaacaagaca gagaataaga	1080
tttgctattt cccaatgggt tgatgctatg tcgccggcga attttttagc tacaatcct	1140
gaggcacaga gattacttat tgagtccgga ggagaatcac taagggctgg agtgagaaat	1200
atgatggaag atttgaccag aggaaagatc tctcagacag acgaatctgc atttgaagta	1260
ggaaggaatg ttgcggtaac tgaagtgct gttgtatttg aaaatgaata ttttcaatta	1320
ctacaatata aacctttgac agacaaggtg catgctagac ctcttcttat ggttccacct	1380
tgtataaata aatattatat tttagatctt cagcctgaat catcttttagt aagacacgtt	1440
gtagaacaag gtcacacagt attttttagtt tcttgagaa atcctgacgc atctatggcc	1500
ggcagtacct gggatgatta tatagaacat gcagcaataa gggcaataga agttgctaga	1560
gatataagcg gtcaggacaa gattaatgta cttggatttt gtgtaggagg aactatagtt	1620
tcaacagcac tggcagtatt ggctgctaga ggagaacatc cagcagcatc ggtaacttta	1680
cttacaacac ttttagattt tgcagatact ggaatattag acgtatttgt tgatgaagga	1740

ES 2 928 891 T3

cacgtacaat taagagagggc aaccttgggt ggaggagctg gtgcaccctg tgetcttctt 1800
agagggttag aattagcaaa tacttttagt tttttacgac ctaatgactt agtttggaa 1860
tatgtagtgg ataattacct taaaggaaac acacctgtac cttttgattt attattttgg 1920
aatggagatg caaccaactt gcctggctct tggattgtt ggtatcttag acatacctac 1980
cttcaaaatg aattaaaagt tcctggcaaa ctactgtat gcggtgtccc cgttgatttg 2040
gcttcaatag atgtaccaac ttatatatac ggaagtagag aggatcatat cgtaccttgg 2100
actgcggtt acgcttctac agcattgctg gctaataaat tgagatttgt attaggagct 2160
tctggtcaca tagctggagt aataaatcca ccagccaaaa ataaacgaag tcattggacc 2220
aatgatgcac ttcctgaatc tccacagcag tggcttctg gtgcaataga acatcatggt 2280
tcatggtggc ccgactggac agcatggtt gcaggtcaag ccggtgctaa aagggtgctg 2340
ccagcaaaact atggcaatgc aagatacagg gctatagaac cggctccagg aagatacgtt 2400
aaagcaaaat aagaattcga gctcggtagc aggaggatat taaaatgact gatgtagtaa 2460
tagtatctgc agcaagaacg gcagttggaa aatttggagg atctttggct aaaatacctg 2520
caccagaact aggggcagtg gttataaaag cagcactgga aagggccggc gtcaaaccag 2580
aacaggtttc agaagtaatt atgggacaag ttttaacagc tggatcaggt cagaatcctg 2640
caagacaagc agctattaa gcaggacttc cagcaatggt gccagctatg accataaata 2700
aggtttgtgg cagtggatta aaggcagtaa tgttggcagc taatgcaata atggcaggtg 2760
atgcagaaat agttgtagca ggtggtcaag aaaatatgtc tgctgcacca catgtactgc 2820
cgggatctag ggatggtttt aggatgggag atgcaaaatt ggtggataca atgatagtag 2880
atggactttg ggatgtatac aatcagtatc acatgggaat tacagctgaa aatgttgcta 2940
aagaatatgg aataactaga gaagctcaag atgagtttgc agtaggttca caaaataagg 3000
ctgaagcagc acaaaaagcc ggaaaatttg atgaggaaat agttcctgta ttaataccac 3060
aaagaaaagg agatcctgta gcatttaaaa cagatgaatt tgtacgccag ggagctacat 3120
tggattcaat gtctggctta aaaccggcct ttgataagc aggtactgta actgcagcta 3180
atgcaagtgg gttaaatgat ggagcagcag cagttgtggt aatgtcagca gctaaagcta 3240
aagagttggg tcttactcca cttgcaacta taaagagcta tgcaaatgca ggagctgatc 3300
caaaggtcat gggcatgggt cctgttccag cgtctaaaag agcactaagt agagctgaat 3360
ggacaccaca agacctggat cttatggaaa taaatgaagc atttgctgcg caggcccttg 3420
ctgtccatca acaaatggga tgggatactt caaaagtaaa tgtgaatgga ggagctattg 3480
ccatagggca tcccattgga gccagtggat gccgcatttt agtaacttta cttcatgaga 3540
tgaaaagaag agatgcaaaa aaaggacttg ccagcttatg tataggtgga ggaatgggtg 3600
tagcttttagc cgttgaaaga aaataaatca ttctgaattc gagctcggta ggaggtcaga 3660

ES 2 928 891 T3

atgacacaga gaatagctta tgtaactgga ggaatggggg gaattggcac ggcaatatgt 3720
cagagattag caaaggatgg ttttagagta gttgcggggt gtggcccaa ctcaccgagg 3780
agagaaaaat ggttggaaaca gcagaaagct ctcggtttg actttatagc tagtgagggt 3840
aatgttgctg attgggattc aacaaagaca gcttttgata aggttaagtc agaagtgggt 3900
gaagtagatg tgctcataaa taatgctggg atcacaagag atgtagtttt tagaaaaatg 3960
acaagagctg actgggatgc tgtaatagat acaaatctta ctagcttatt caatgtaacg 4020
aacaggtta tagatggaat ggcagatagg ggatggggta ggatagtaaa tatttcatca 4080
gtaaatggtc aaaaaggaca atttggacaa acaattatt caactgcaa ggcaggactt 4140
catggattta cgatggcact tgcacaggaa gtagctacta aaggagttac tgtaaataca 4200
gtttctccag gatacatagc tactgatatg gtaaaagcta ttaggcagga tgtattagat 4260
aagattgtag caacaatacc tgtgaagaga cttggcttac ctgaagaaat agcatcaata 4320
tgtgcttggg tatccagtga agaatcagga ttttctacag gagctgattt ctccttgaat 4380
ggtgacttc acatgggata aaattcgagc tcggtaccg gggatcctct agagtcgagc 4440
tcacgcgtcc atggagatct cgaggcctgc agacatgcaa gcttggcact ggccgtcgtt 4500
ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagcacat 4560
cccccttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag 4620
ttgcgagcc tgaatggcga atggcgctag cataaaaata agaagcctgc atttgcaggc 4680
ttcttatttt tatggcgcgc cgccattatt tttttgaaca attgacaatt catttcttat 4740
tttttattaa gtgatagtca aaaggcataa cagtgctgaa tagaaagaaa ttacagaaa 4800
agaaaattat agaatttagt atgattaatt atactcattt atgaatgttt aattgaatac 4860
aaaaaaaaat acttgttatg tattcaatta cgggttaaaa tatagacaag ttgaaaaatt 4920
taataaaaaa ataagtcctc agctcttata tattaagcta ccaacttagt atataagcca 4980
aaacttaaat gtgctaccaa cacatcaagc cgttagagaa ctctatctat agcaatattt 5040
caaatgtacc gacatacaag agaaacatta actatatata ttcaatttat gagattatct 5100
taacagatat aaatgtaaat tgcaataagt aagatttaga agtttatagc ctttgtgtat 5160
tggaagcagt acgcaaaggc ttttttattt gataaaaatt agaagtatat ttattttttc 5220
ataattaatt tatgaaaatg aaaggggggtg agcaaagtga cagaggaaag cagtatctta 5280
tcaaataaca aggtattagc aatatcatta ttgactttag cagtaaacad tatgactttt 5340
atagtgcttg tagctaagta gtacgaaagg gggagcttta aaaagctcct tggaatacat 5400
agaattcata aattaattta tgaaaagaag ggcgtatatg aaaacttgta aaaattgcaa 5460
agagtttatt aaagatactg aatatgcaa aatacattcg ttgatgattc atgataaaac 5520

ES 2 928 891 T3

agtagcaacc tattgcagta aatacaatga gtcaagatgt ttacataaag ggaaagtcca 5580
 atgtattaat tgttcaaaga tgaaccgata tggatggtgt gccataaaaa tgagatgttt 5640
 tacagaggaa gaacagaaaa agaacgtac atgcattaaa tattatgcaa ggagctttaa 5700
 aaaagctcat gtaaagaaga gtaaaaagaa aaaataattt atttattaat ttaatatga 5760
 gagtgccgac acagtatgca ctaaaaaata tatctgtggt gtagtgagcc gatacaaaaag 5820
 gatagtcaact cgcattttca taatacatct tatgttatga ttatgtgtcg gtgggacttc 5880
 acgacgaaaa cccacaataa aaaaagagtt cgggtaggg ttaagcatag ttgaggcaac 5940
 taaacaatca agctaggata tgcagtagca gaccgtaagg tcgtgtttaa ggtgtgttgt 6000
 aatacatacg ctattaagat gtaaaaatac ggataccaat gaagggaaaa gtataatttt 6060
 tggatgtagt ttgtttgttc atctatgggc aaactacgtc caaagccgtt tccaaatctg 6120
 ctaaaaagta tatcctttct aaaatcaaag tcaagtatga aatcataaat aaagttaat 6180
 tttgaagtta ttatgatatt atgtttttct attaaaataa attaatgata tagaatagtt 6240
 taataatagt atatacttaa tgtgataagt gtctgacagt gtcacagaaa ggatgattgt 6300
 tatggattat aagcggccgg ccagtgggca agttgaaaaa ttcacaaaaa tgtggtataa 6360
 tatcctttgtt cattagagcg ataaacttga atttgagagg gaacttagat ggtatttgaa 6420
 aaaattgata aaaatagttg gaacagaaaa gagtattttg accactactt tgcaagtgta 6480
 ccttgtaact acagcatgac cgttaaagtg gatatcacac aaataaagga aaagggatg 6540
 aaactatatac ctgcaatgct ttattatatt gcaatgattg taaaccgcca ttcagagttt 6600
 aggacggcaa tcaatcaaga tggatgaattg gggatatatg atgagatgat accaagctat 6660
 acaatatttc acaatgatac tgaaacattt tccagccttt ggactgagtg taagtctgac 6720
 tttaaatcat ttttagcaga ttatgaaagt gatagcgaac ggtatggaaa caatcataga 6780
 atggaaggaa agccaaatgc tccgaaaaac atttttaatg tatctatgat accgtggtca 6840
 acctcgatg gctttaatct gaattgcag aaaggatatg attatttgat tcctattttt 6900
 actatgggga aatattataa agaagataac aaaattatac ttcctttggc aattcaagtt 6960
 catcacgcag tatgtgacgg atttcacatt tgccgttttg taaacgaatt gcaggaattg 7020
 ataaatagtt aacttcaggt ttgtctgtaa ctaaaaacaa gtatttaagc aaaaacatcg 7080
 tagaaatacg gtgttttttg ttaccctaag tttaaactcc tttttgataa tctcatgacc 7140
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 7200
 ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 7260
 ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta 7320
 actggttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc 7380
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca 7440

ES 2 928 891 T3

gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta	7500
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag	7560
cgaacgacct acaccgaaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt	7620
cccgaagggg gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca gggcggaac aggagagcgc	7680
acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac	7740
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac	7800
gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc	7860
tttctcgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta cgcctttga gtgagctgat	7920
accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga agcgggaagag	7980
cgcccaatac gcagggcccc ctgcttcggg gtcattatag cgattttttc ggtatatcca	8040
tcctttttcg cacgatatac aggattttgc caaagggttc gtgtagactt tccttggtgt	8100
atccaacggc gtcagccggg caggataggt gaagtaggcc caccgcgag cgggtgttcc	8160
ttcttcaactg tcccttattc gcacctggcg gtgctcaacg ggaatcctgc tctgcgaggc	8220
tggccgggcta ccgccggcgt aacagatgag ggcaagcggg tggctgatga aaccaagcca	8280
accaggaagg gcagcccacc tatcaagggtg tactgccttc cagacgaacg aagagcgatt	8340
gaggaaaagg cggcggcggc cggcatgagc ctgtcggcct acctgctggc cgtcggccag	8400
ggctacaaaa tcacgggctg cgtggactat gaggacgtcc gcgagctggc ccgcatcaat	8460
ggcgacctgg gccgcctggg cggcctgctg aaactctggc tcaccgacga cccgcgcacg	8520
gcgcggttcg gtgatgccac gatcctcgcc ctgctggcga agatcgaaga gaagcaggac	8580
gagcttggca aggtcatgat gggcgtggtc cgcccagggg cagagccatg acttttttag	8640
ccgctaaaac ggccgggggg tgcgcgtgat tgccaagcac gtcccatgc gctccatcaa	8700
gaagagcgac ttcgcgggagc tggatgaagta catcaccgac gagcaaggca agaccgatcg	8760
ggccc	8765

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo de Wood-Ljungdahl de origen no natural, capaz de producir polihidroxitirato, que comprende:
- 5 a. un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga acetil-CoA C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9) que convierte acetil-CoA en acetoacetil-CoA,
 b. un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga acetoacetil-CoA reductasa (EC 1.1.1.36) o un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga 3-hidroxitirato-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.157) que convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxitirato-CoA, y
 10 c. un ácido nucleico que codifica una enzima heteróloga polihidroxitirato sintasa (EC 2.3.1.-) que convierte 3-hidroxitirato-CoA en polihidroxitirato.
2. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde la acetil-CoA C-acetiltransferasa es de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium acetobutylicum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* o *Streptomyces coelicolor*.
3. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde la acetoacetil-CoA reductasa es de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* o *Streptomyces coelicolor*.
4. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde la 3-hidroxitirato-CoA deshidrogenasa es de *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium kluyveri*.
5. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde la polihidroxitirato sintasa es de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrospira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Rhodospirillum rubrum* o *Streptomyces coelicolor*.
6. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es un miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* y *Thermoanaerobacter*.
7. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.
8. El microorganismo de la reivindicación 7, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*.
9. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es capaz de consumir sustratos gaseosos que comprenden uno o más de CO, CO₂ y H₂.
- 50 10. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el microorganismo es:
- a. anaerobio,
 b. no es capaz de degradar el polihidroxitirato, o
 c. no fotótrofo, fotosintético o metanótrofo.
- 55 11. Un método para producir polihidroxitirato que comprende, cultivar el microorganismo de la reivindicación 1, en presencia de un sustrato gaseoso, de modo que el microorganismo produce polihidroxitirato.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en donde el sustrato gaseoso comprende uno o más de CO, CO₂ y H₂.
- 65 13. El método de la reivindicación 11, en donde el cultivo se realiza:
- a. en condiciones anaerobias,
 b. sin sustratos hidrocarbonados o
 c. sin luz.

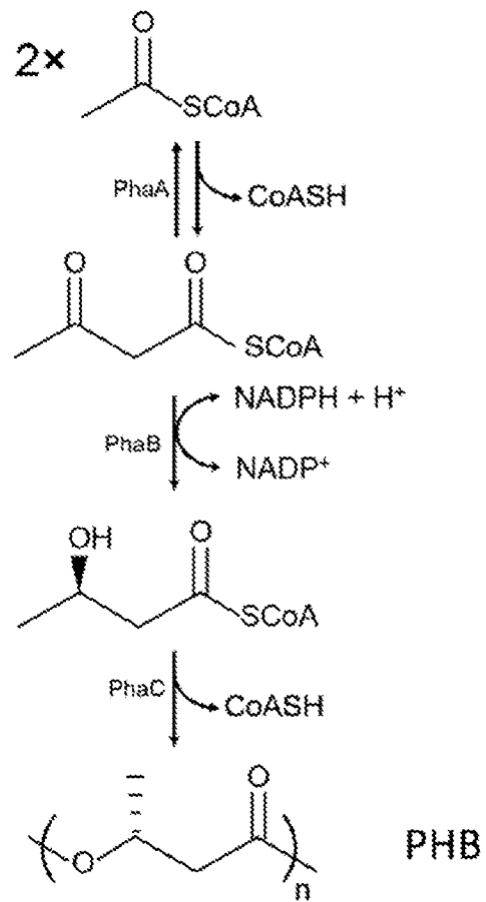


Fig. 1

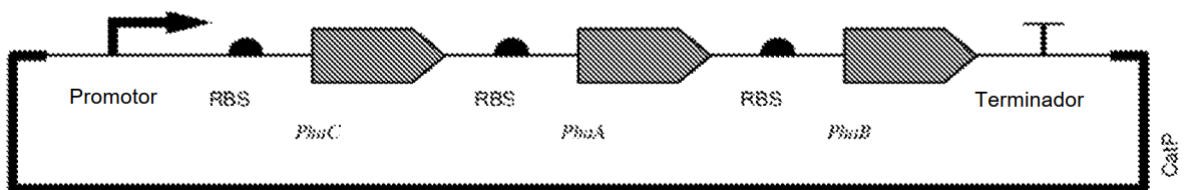


Fig. 2

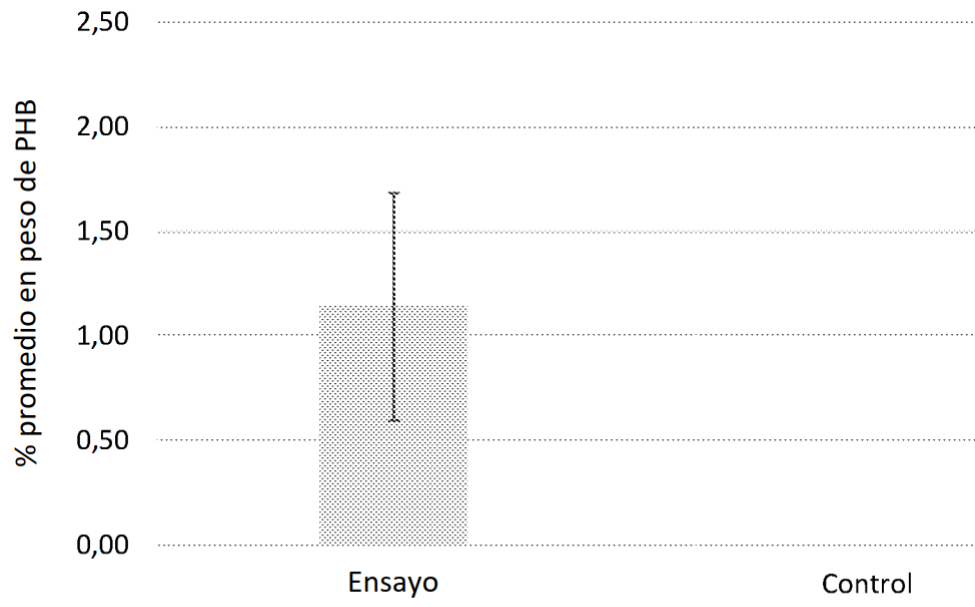


Fig. 3

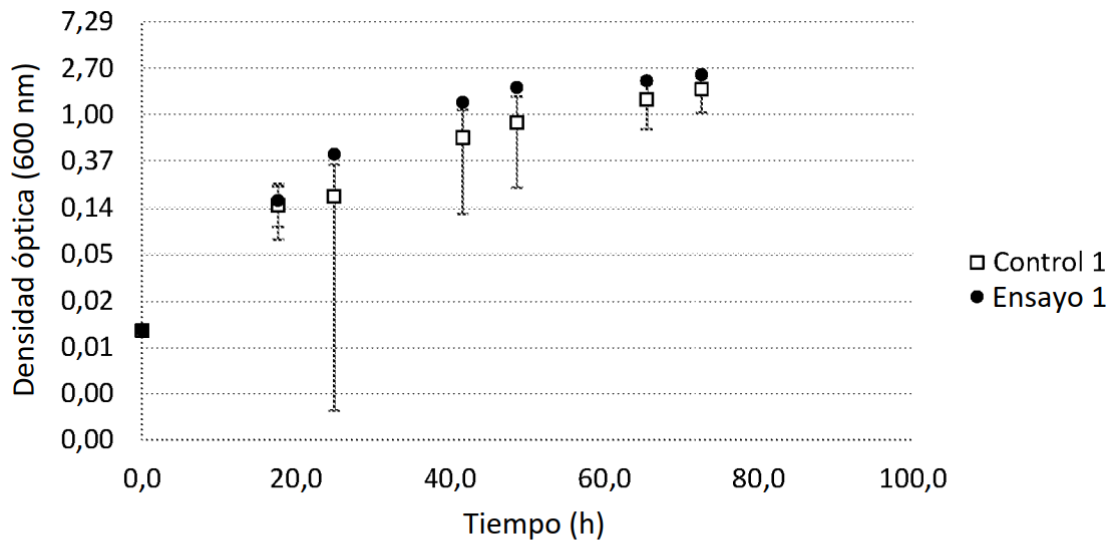


Fig. 4A

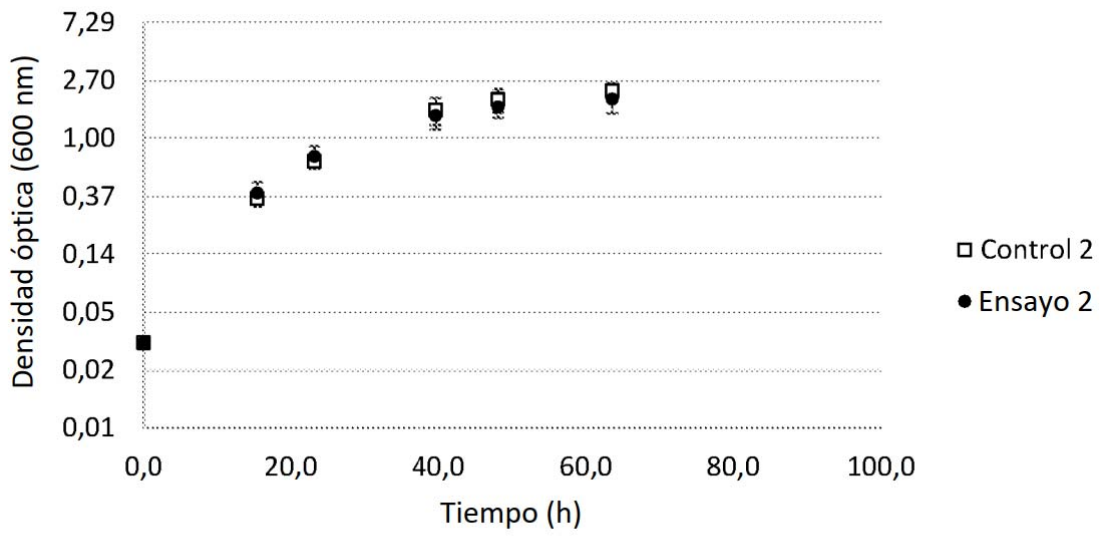


Fig. 4B

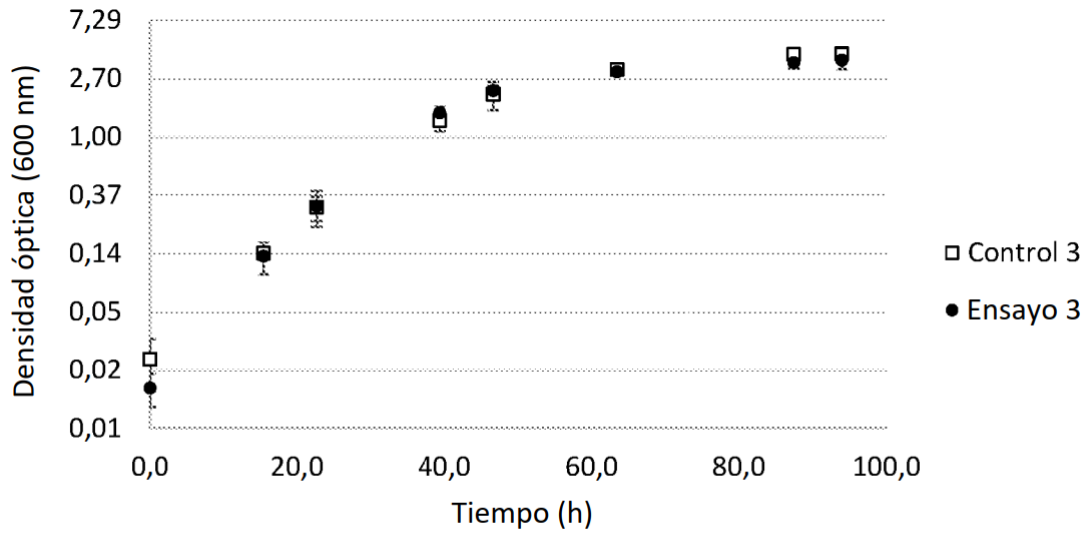


Fig. 4C

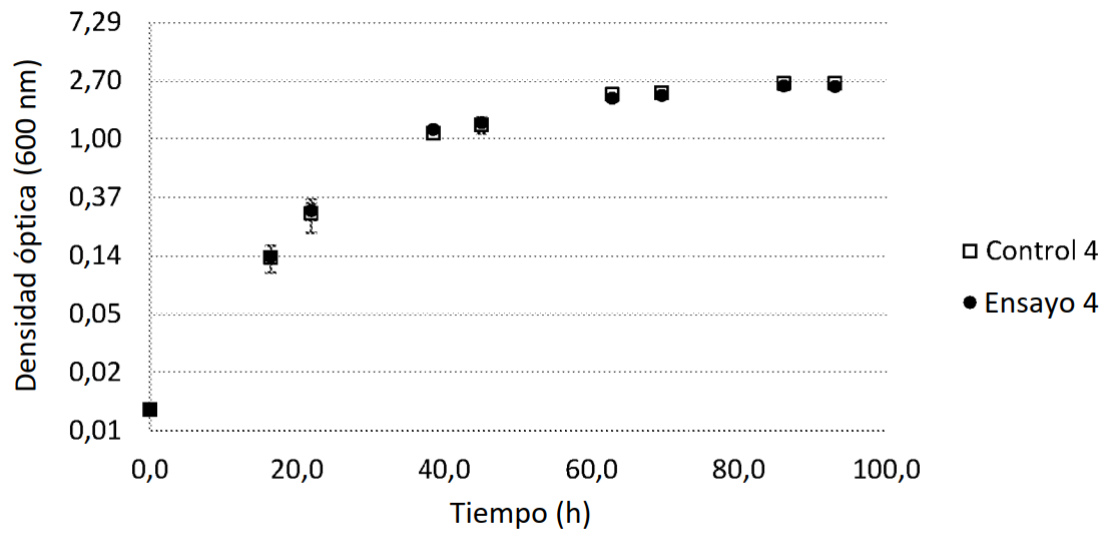


Fig. 4D

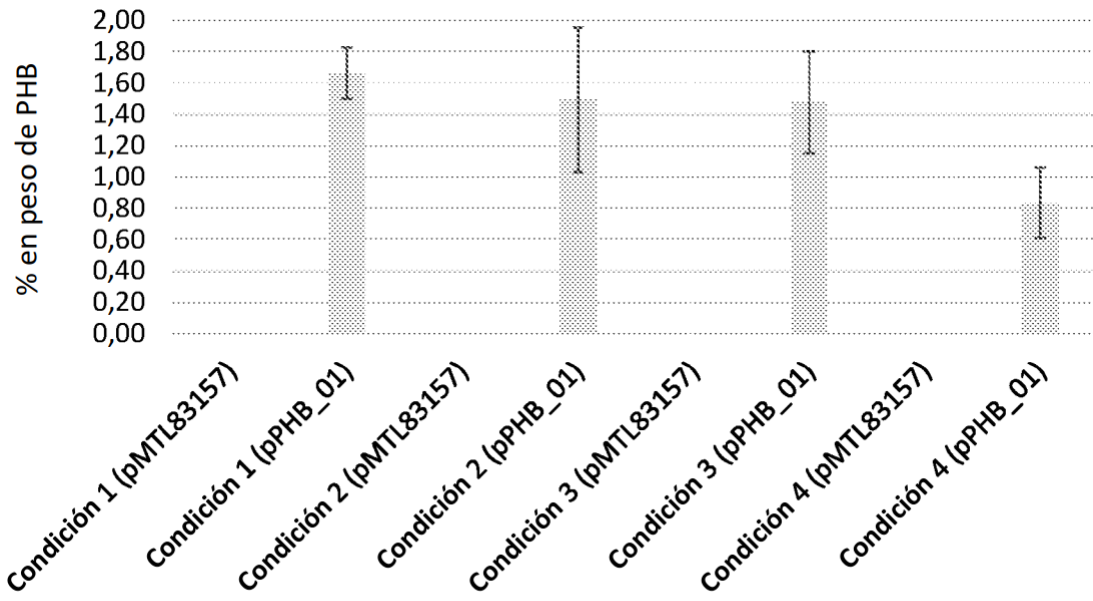


Fig. 5

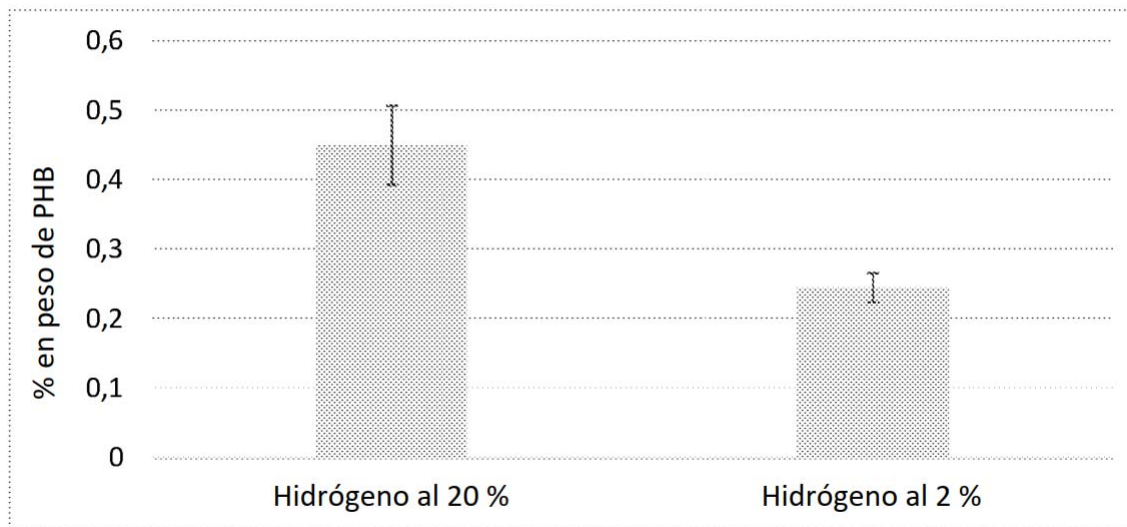


Fig. 6

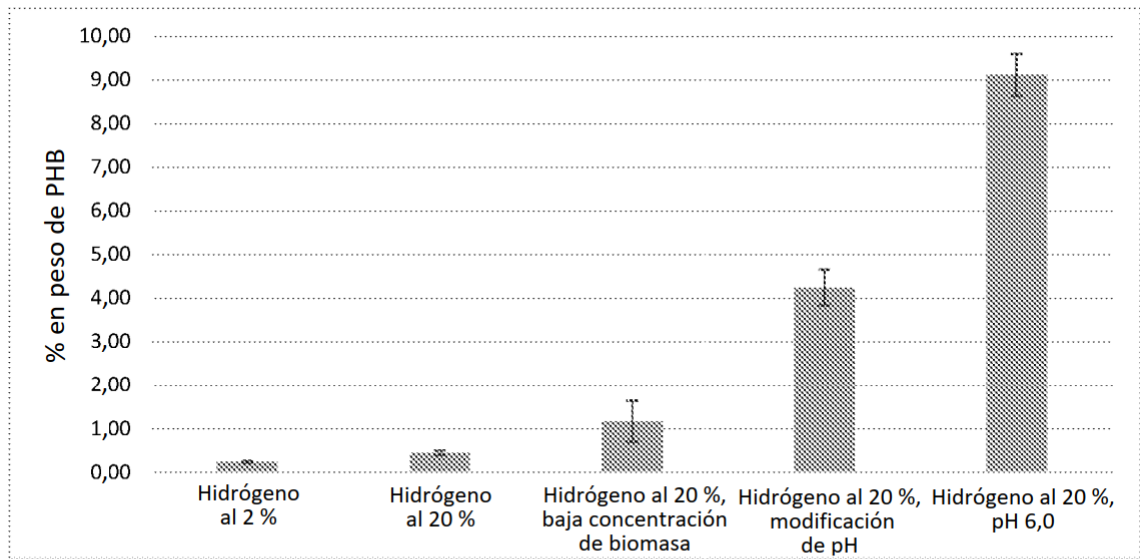


Fig. 7

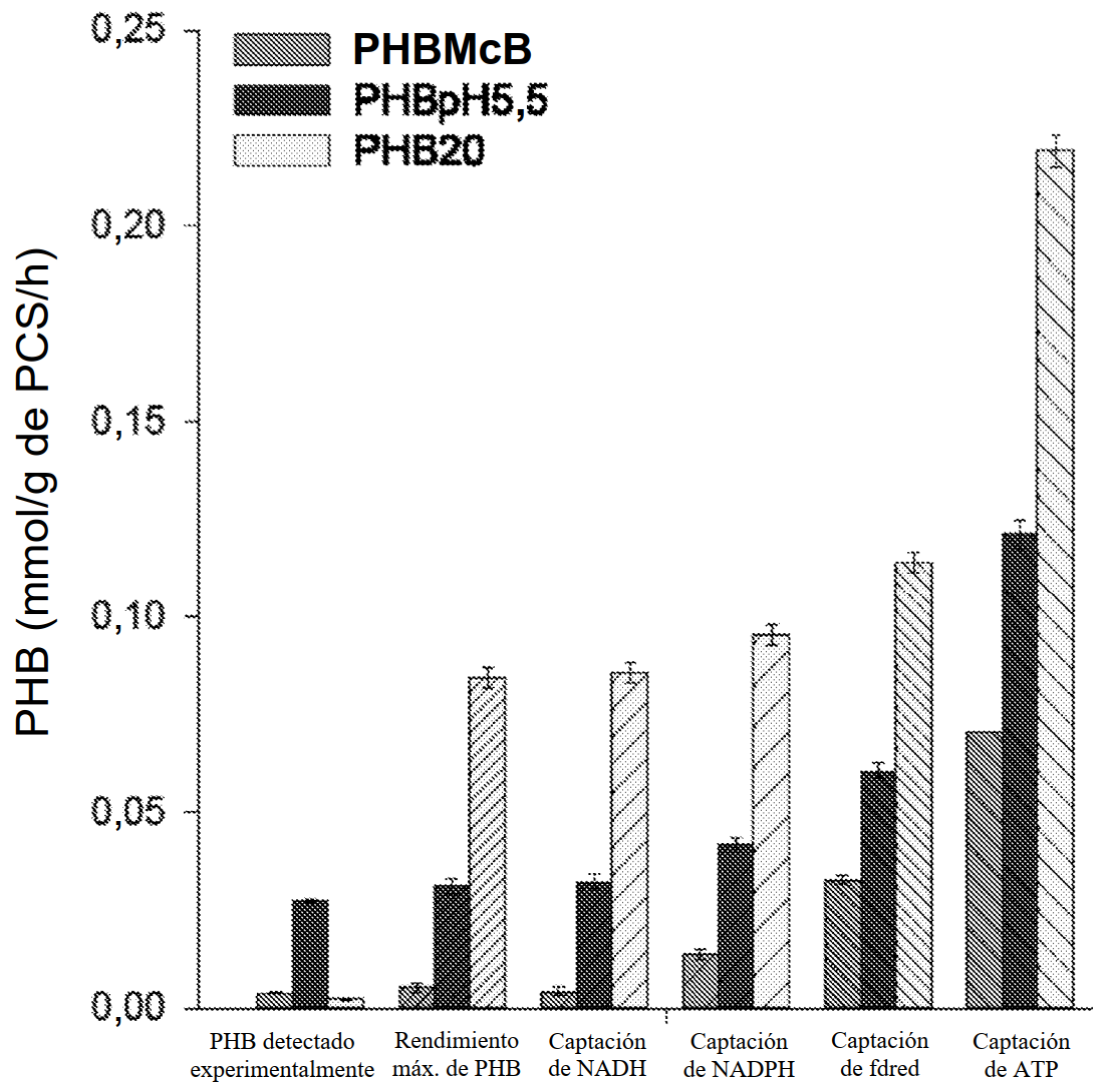


Fig. 8