



(51) МПК
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ(21), (22) Заявка: **2008147372/13, 02.05.2007**

(30) Конвенционный приоритет:
02.05.2006 US 60/796,816
21.12.2006 US 60/871,156

(43) Дата публикации заявки: **10.06.2010 Бюл. № 16**(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **02.12.2008**

(86) Заявка РСТ:
US 2007/010744 (02.05.2007)

(87) Публикация РСТ:
WO 2007/130521 (15.11.2007)

Адрес для переписки:
**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364**

(71) Заявитель(и):

**Е.И.ДЮПОН ДЕ НЕМУР ЭНД
 КОМПАНИ (US)**

(72) Автор(ы):

**ДОНАЛЬДСОН Гейл К. (US),
 ЭЛИОТ Эндрю К. (US),
 НАГАРАЯН Васантха (US),
 НАКАМУРА Чарльз И. (US),
 ТОМБ Жан-Франсуа (US)**

(54) ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ СПИРТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЧЕТЫРЕ АТОМА УГЛЕРОДА**(57) Формула изобретения**

1. Рекомбинантная микробная клетка-хозяин, содержащая по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, катализирующий преобразование субстрата в продукт, выбранный из группы, состоящей из преобразований:

- i) пирувата в альфа-ацетолактат;
- ii) альфа-ацетолактата в ацетоин;
- iii) ацетоина в 2,3-бутандиол;
- iv) 2,3-бутандиола в 2-бутанон; и
- v) 2-бутанона в 2-бутанол;

где 1) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, пирувата в альфа-ацетолактат, является ацетолактатсинтазой;

2) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, альфа-ацетолактата в ацетоин, является ацетолактатдекарбоксилазой;

3) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, ацетоина в 2,3-бутандиол, является бутандиолдегидрогеназой;

4) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, 2,3-бутандиола в 2-бутанон, является диолдегидратазой или глицериндегидратазой; и

5) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, 2-бутанон в 2-бутанол, является бутанолдегидрогеназой,

где по меньшей мере одна молекула ДНК гетерологична для указанной микробной клетки-хозяина, и где указанная микробная клетка-хозяин продуцирует 2-бутанол.

2. Рекомбинантная микробная клетка-хозяин, содержащая по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, катализирующий преобразование субстрата в продукт, выбранный из группы, состоящей из преобразований:

- i) пирувата в альфа-ацетолактат;
- ii) альфа-ацетолактата в ацетоин;
- iii) ацетоина в 2,3-бутандиол; и
- iv) 2,3-бутандиола в 2-бутанон;

где 1) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, пирувата в альфа-ацетолактат, является ацетолактатсинтазой;

2) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, альфа-ацетолактата в ацетоин, является ацетолактатдекарбоксилазой;

3) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, ацетоина в 2,3-бутандиол, является бутандиолдегидрогеназой;

4) полипептид, который катализирует преобразование субстрата в продукт, 2,3-бутандиола в 2-бутанон, является диолдегидратазой или глицериндегидратазой,

где по меньшей мере одна молекула ДНК гетерологична для указанной микробной клетки-хозяина, и где указанная микробная клетка-хозяин продуцирует 2-бутанон.

3. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где ацетолактатсинтаза обладает аминокислотной последовательностью, по меньшей мере, с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:77 и SEQ ID NO:79, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

4. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где ацетолактатдекарбоксилаза обладает аминокислотной последовательностью по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:83, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

5. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где бутандиолдегидрогеназа обладает аминокислотной последовательностью по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87 и SEQ ID NO:89, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

6. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратаза или глицеролдегидратаза содержат полноразмерные большие, средние и малые субъединицы, которые каждая дают значение параметра E 0,01 или менее при запросе с использованием профиля по скрытой марковской модели, полученного с использованием больших субъединиц с SEQ ID NO:8, 99, 105, 135, 138, 141, 146 и 164; средних субъединиц с SEQ ID NO:10, 101, 107, 136, 139, 142, 148 и 165 и малых субъединиц с SEQ ID NO:12, 103, 109, 137, 140, 143, 150 и 166; где каждый запрос осуществляли с использованием алгоритма hmmsearch, где параметр Z установлен на 1 миллиард.

7. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратазу или глицеролдегидратазу, идентифицировали способом, включающим в себя стадии:

- а) получения профиля по скрытой марковской модели из выравнивания

аминокислотных последовательностей, соответствующих большим, средним и малым субъединицам ферментов диол- и глицеролдегидратаз,

где i) большая субъединица содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 99, 105, 135, 138, 141, 146 и 164;

ii) средняя субъединица содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, 101, 107, 136, 139, 142, 148 и 165; и

iii) малая субъединица содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, 103, 109, 137, 140, 143, 150 и 166;

b) осуществления запроса по меньшей мере к одной общедоступной базе данных белковых последовательностей, содержащей последовательности диол- и глицеролдегидратаз с профилем по скрытой марковской модели (a) с использованием алгоритма hmmsearch, где параметр Z установлен на 1 миллиард и значение параметра E установлено на 0,01, для идентификации первого набора данных аминокислотных последовательностей диол- и глицеролдегидратаз; и

c) удаления любых частичных последовательностей из первого набора данных (b) с получением второго набора данных аминокислотных последовательностей диол- и глицеролдегидратаз, где идентифицированы ферменты диолдегидратазы и глицеролдегидратазы.

8. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратаза или глицеролдегидратаза содержат большую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 93, 99, 105, 135, 138, 141, 146, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 130, 243, 254, 255, 256, 257, 258 и 259, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

9. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратаза или глицеролдегидратаза содержат среднюю субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, 95, 101, 107, 136, 139, 142, 148, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 244, 250, 252, 260, 261, 262, 263, 364, 265, 266 и 167, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

10. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратаза или глицеролдегидратаза содержат малую субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, 97, 103, 109, 137, 140, 143, 150, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 199, 202, 205, 208, 211, 214, 217, 220, 223, 226, 229, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 245, 248, 249, 251, 253, 268, 270, 271, 272, 273 и 274, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

11. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратаза или глицеролдегидратаза содержат слитые большие, средние и малые субъединицы, содержащие аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:233, 235, 237, 239, 241, 246 и 247, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

12. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где диолдегидратаза или глицеролдегидратаза содержат слитые большие, средние и малые субъединицы и обладают по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, содержащей все три аминокислотные последовательности, кодирующие большую, среднюю и малую субъединицы, выбранные из группы, состоящей из:

- a) SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:12;
- b) SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95 и SEQ ID NO:97;
- c) SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101 и SEQ ID NO:103;
- d) SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107 и SEQ ID NO:109;
- e) SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:136 и SEQ ID NO:137;
- f) SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:139 и SEQ ID NO:140;
- g) SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 и SEQ ID NO:150;
- h) SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:142 и SEQ ID NO:143; и
- i) SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:165 и SEQ ID NO:166;

на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

13. Клетка-хозяин по п.1 или 2, где бутанолдегидрогеназа обладает аминокислотной последовательностью по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:75 и SEQ ID NO:91, на основе способа выравнивания Clustal W с использованием параметров по умолчанию GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1 и серии весовой матрицы белков Gonnet 250.

14. Способ получения 2-бутанола, включающий:

1) получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина по любому из пп.1 и 3-12;
и

2) приведение клетки-хозяина в контакт (1) с поддающимся ферментации углеродным субстратом в среде для ферментации в условиях, при которых происходит образование 2-бутанола.

15. Способ получения 2-бутанола, включающий:

1) получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина по любому из пп.2 и 3-12;
и

2) приведение клетки-хозяина в контакт (1) с поддающимся ферментации углеродным субстратом в среде для ферментации в условиях, при которых происходит образование 2-бутанола.

16. Способ по п.14 или 15, где поддающийся ферментации углеродный субстрат выбран из группы, состоящей из моносахаридов, олигосахаридов и полисахаридов.

17. Содержащая 2-бутанол среда с продуктом ферментации, полученным способом по п.16.

18. Содержащая 2-бутанол среда с продуктом ферментации, полученным способом по п.16.