

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 579**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/38</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12P 1/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/52</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/06</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/54</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/56</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2016 PCT/US2016/064855**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17096324**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2016 E 16871684 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.02.2022 EP 3384005**

54 Título: **Arginina como única fuente de nitrógeno para microorganismos fijadores de C1**

30 Prioridad:

**03.12.2015 US 201562262886 P**  
**03.12.2015 US 201562262888 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2022**

73 Titular/es:

**LANZATECH NZ, INC. (100.0%)**  
**Corporation Trust Center, 1209 Orange Street**  
**Wilmington, New Castle Delaware 19801, US**

72 Inventor/es:

**VALGEPEA, KASPAR;**  
**KOEPKE, MICHAEL;**  
**BEHRENDORFF, JAMES BRUCE YARNTON**  
**HAYCOCK;**  
**MARCELLIN, ESTEBAN;**  
**NIELSEN, LARS K. y**  
**LEMGRUBER, RENATO DE S.P.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 909 579 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

Arginina como única fuente de nitrógeno para microorganismos fijadores de C1

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/262.886 (presentada el 3 de diciembre de 2015) y 62/262.888 (presentada el 3 de diciembre de 2015).

## Antecedentes de la invención

- 10 En la actualidad, aproximadamente el 10 % de la demanda mundial de energía y productos químicos básicos se produce a partir de materias primas renovables, principalmente con azúcares cultivados. Sin embargo, cada vez se presta más atención al uso futuro de los recursos no alimentarios para cumplir los objetivos climáticos. La fermentación de gas ofrece una vía para utilizar una amplia gama de materias primas C1 fácilmente disponibles y de bajo coste tales como gases residuales industriales, gas de síntesis o metano reformado en productos químicos y combustibles. Se cree que la ruta de Wood Ljungdahl, una de las primeras rutas bioquímicas que surgieron en la Tierra, permite que los Clostridia acetogénicos fijen estos gases C1 en acetil-CoA. *Clostridium autoethanogenum*, en particular, ofrece una plataforma sólida y flexible para la fermentación de gases y se ha implementado a escala industrial. La fermentación de gas mediante *C. autoethanogenum* es muy selectiva, tolera contaminantes, resuelve la refractividad de los procesos de Fischer-Tropsch y es económicamente viable incluso cuando se suministra con corrientes de gas de pequeño volumen.

- 25 Se sabe que, si bien los acetógenos son capaces de producir muchos productos químicos de cadena corta útiles, la producción de moléculas de carbono de cadena más larga para su uso en biodiesel o combustibles para aviones está fuera de la capacidad metabólica de las bacterias acetogénicas por sí mismas, debido a la limitación de ATP. Fast *et al.*, determinaron que, si bien la ruta de Wood Ljungdahl era la ruta de mejor rendimiento para la producción de acetato y etanol, la fermentación de butanol es un proceso limitado por ATP, haciendo que la producción anaeróbica de butanol a partir de la ruta de Wood Ljungdahl sea ineficaz.

- 30 *C. autoethanogenum* produce acetato, etanol, 2,3-butanodiol (2,3-BDO) y lactato de forma natural. Si se pueden superar los impedimentos energéticos, la biología sintética promete mejorar el espectro de productos de *C. autoethanogenum*. Las bacterias acetogénicas están muy extendidas en la naturaleza y juegan un papel importante en el ciclo global del carbono, pero se consideran que viven en el límite termodinámico de la vida.

- 35 La energía de la ruta de Wood-Ljungdahl de los acetógenos anaerobios apenas está surgiendo, pero a diferencia de las condiciones de crecimiento aerobio o la glucólisis de los organismos fermentadores de azúcares, en la ruta de Wood-Ljungdahl no se gana ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato, de hecho, la activación de CO<sub>2</sub> a formiato en realidad requiere una molécula de ATP y se requiere un gradiente de membrana [Documento WO 2013/180584].

- 40 La generación de ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato se puede utilizar como fuerza impulsora para la síntesis de productos, especialmente en sistemas limitados por ATP. En particular, se sabe que las bacterias acetogénicas viven en el límite termodinámico de la vida (Schuchmann, Nat Rev Microbiol, 12: 809-821, 2014). De este modo, se ha descrito que todos los microorganismos acetogénicos aislados hasta la fecha producen acetato (Drake, Acetogenic Prokaryotes, en: The Prokaryotes, 3.ª edición, páginas 354-420, Nueva York, NY, Springer, 2006; Liew *et al.*, Insights into CO<sub>2</sub> Fixation Pathway of *Clostridium autoethanogenum* by Targeted Mutagenesis. mBio, 2016, 7: e00427-16) ya que la producción de acetato proporciona al microorganismo una opción para generar directamente ATP a partir de la fosforilación a nivel de sustrato a través de Pta (fosfotransacetilasa) (EC 2.3.1.8) y Ack (acetato cinasa) (EC 2.7.2.1). El sistema Pta-Ack es muy específico para la conversión de acetil-CoA en acetato y no utiliza otros acil-CoA. Aunque mecanismos como los gradientes de membrana y las enzimas de bifurcación de electrones acoplados a sistemas de translocación de iones o protones, por ejemplo, el complejo Rnf (Schuchmann, Nat Rev Microbiol, 12: 809-821, 2014), conservan ATP en estos microorganismos, la generación directa de ATP sigue siendo fundamental para su supervivencia. Como resultado, cuando se introducen rutas heterólogas que no permiten la generación de ATP, se produce acetato como subproducto (Schiel-Bengelsdorf, FEBS Lett, 586: 2191-2198, 2012).

## Sumario de la invención

- 60 La invención proporciona un método para cultivar un microorganismo fijador de C1, que comprende, hacer fluir un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> a un biorreactor que contiene un cultivo de un microorganismo fijador de C1 en un medio nutritivo líquido; en donde se proporciona arginina al cultivo como única fuente de nitrógeno; además, en donde el microorganismo fijador de C1 es un microorganismo modificado de manera genética recombinante que comprende una ruta del metabolismo de la arginina; y además en donde el microorganismo fijador de C1 es *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. El colulrue puede fermentarse para producir al menos un producto. Se puede proporcionar arginina al cultivo en exceso de los requisitos para la síntesis de biomasa.

También se divulga un método para aumentar la producción de al menos un producto intensivo en ATP, comprendiendo el método; hacer fluir un sustrato gaseoso que contiene C1 a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos fijadores de C1 en un medio nutritivo líquido; y fermentar el cultivo para producir al menos un producto. Se puede proporcionar arginina al cultivo en exceso de los requisitos para la síntesis de biomasa y el microorganismo fijador de C1 puede comprender una ruta del metabolismo de la arginina.

En realizaciones particulares, la ruta del metabolismo de la arginina comprende al menos una ruta de la arginina desiminasa y/o una ruta de la arginina descarboxilasa. La ruta de la arginina desiminasa comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y una carbamato cinasa (EC 2.7.2.2). La ruta de la arginina descarboxilasa comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19), posible agmatina desiminasa (EC 3.5.3.12), putrescina carbamoiltransferasa (EC 2.1.3.6) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2).

En general, la cantidad de arginina proporcionada al cultivo de microorganismos fijadores de C1 supera el requisito para la síntesis de biomasa. Se puede proporcionar arginina al cultivo desde aproximadamente el requisito celular hasta aproximadamente 1000 veces por encima de los requisitos celulares. La arginina se puede aportar al cultivo de 2 a 1000 o de 2 a 800 o de 2 a 500 o de 2 a 100 o de 2 a 50 o de 2 a 10 o de 50 a 1000, o de 50 a 800 o de 50 a 600 o de 50 a 500 o de 50 a 300 o de 50 a 200 o de 50 a 100 o de 100 a 1000 o de 100 a 800 o de 100 a 600 o de 100 a 500 o de 100 a 300 o de 100 a 200 veces el requisito celular.

Se puede proporcionar arginina al cultivo, tal que la concentración de arginina se mantenga en una cantidad de al menos 20 mg/l o al menos 100 mg/l o al menos 300 mg/l o al menos 500 mg/l o al menos 1 g/l o al menos 2 g/l o al menos 3 g/l o al menos 4 g/l o al menos 5 g/l o al menos 10 g/l o al menos 20 g/l. La concentración de arginina se puede mantener entre 20 mg/l y aproximadamente 20 g/l o entre 100 mg/l y 20 g/l o entre 500 mg/l y 20 g/l o entre 500 mg/l y 10 g/l o entre 1 g/l y 10 g/l o entre 5 g/l y 10 g/l o entre 5 g/l y 20 g/l. Se puede proporcionar arginina al cultivo de manera que el consumo de arginina por parte del cultivo sea de al menos 20 mg de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 100 mg de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 1 gramo de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 5 gramos de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 10 gramos de arginina por gramo de peso celular seco. Se puede proporcionar arginina al cultivo de manera que el consumo de arginina por el cultivo esté entre 20 mg y 20 gramos por gramo de peso celular seco o entre 100 mg y 20 gramos por gramo de peso celular seco o entre 1 gramo y 10 gramos por gramo de peso celular seco.

El cultivo puede consumir al menos 0,012 g de arginina para producir 1 g de biomasa. El requisito celular de arginina para la síntesis de biomasa puede estar entre 0,012 g por gramo de biomasa y aproximadamente 24 g por gramo de biomasa. El requisito de arginina para la síntesis de biomasa puede ser de al menos 0,012 g por gramo de biomasa o al menos 0,024 g por gramo de biomasa, a aproximadamente 0,048 g por gramo de biomasa o al menos 0,120 g por gramo de biomasa o al menos 0,24 g por gramo de biomasa o al menos 0,48 g por gramo de biomasa o al menos 1,2 g por gramo de biomasa o al menos 2,4 g por gramo biomasa o al menos 4,8 g por gramo de biomasa o al menos 12 g por gramo de biomasa.

En general, la arginina se proporciona al cultivo del microorganismo fijador de C1 como componente del medio nutritivo líquido que se alimenta de manera continua al biorreactor. La arginina se puede proporcionar al biorreactor de manera independiente del medio nutritivo líquido (por ejemplo, mediante dosificación o alimentación continua).

El tiempo de duplicación del cultivo se puede aumentar en al menos un 10 % o al menos un 20 % o al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % o al menos un 60 % o al menos un 70 % cuando se proporciona arginina al cultivo en exceso de los requisitos celulares del microorganismo, en comparación con un cultivo donde no se proporciona arginina en exceso de los requisitos celulares del cultivo.

En realizaciones particulares, el microorganismo fijador de C1 comprende al menos una ruta de arginina desiminasa o una ruta de arginina descarboxilasa.

El microorganismo fijador de C1 puede ser un microorganismo carboxidotrófico acetogénico. Los ejemplos de microorganismos fijadores de C1 adecuados incluyen *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, o *Butyribacterium*. El microorganismo se puede seleccionar del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium coskatii*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvii*.

En realizaciones particulares, el microorganismo fijador de C1 es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum*. La bacteria puede tener las características de identificación de los números de registro DSM10061, DSM19630 o DSM23693. Estas bacterias se han depositado en el *German Resource Centre for Biological Material* (DSMZ) cuya dirección es DSMZ

GmbH InhoffenstraBe, 7 B, D-38124.

En determinadas realizaciones, el microorganismo fijador de C1 se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*.

5 El al menos un producto puede ser cualquier producto elaborado por microorganismos fijadores de C1 naturales o recombinantes. El al menos un producto puede seleccionarse del grupo que consiste en etanol, 2,3-butanodiol, 1,3-butanodiol, lactato, succinato, metil etil cetona (MEK), butirato, 2-butanol, 1,2-propanodiol (1,2-PDO), 1-propanol, isopropanol (IPA), acetoína, iso-butanol, isopreno, farneseno, bisaboleno, pineno, limoneno, acetona, 3-  
10 hidroxibutirato, ácido 2-hidroxiisobutírico (2-HIBA), citramalato, butadieno, ácido poliláctico, 1-butanol, 3-hidroxipropionato (3-HP), benzoato, ésteres etílicos de ácidos grasos, ácidos grasos e isobutileno.

La concentración de arginina proporcionada al cultivo puede aumentarse para aumentar la producción de al menos un producto intensivo en ATP. En general, la tasa de producción del al menos un producto intensivo en ATP es al  
15 menos 1,5 veces mayor que la tasa de producción del al menos un producto intensivo en ATP cuando no se proporciona arginina en exceso para los requisitos celulares del cultivo. La tasa de producción del al menos un producto intensivo en ATP puede ser al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor o al menos 4 veces mayor o al menos 5 veces mayor o al menos 10 veces mayor.

20 Los productos intensivos de ATP se definen generalmente como productos que tienen un requisito directo de ATP en la ruta metabólica. Los ejemplos de productos intensivos de ATP (productos que requieren directamente ATP para la síntesis que tienen una reacción dependiente de ATP en la ruta) incluyen, pero sin limitación, productos procedentes de la ruta de los terpenoides/mevalonato, que incluyen isopreno, farneseno, bisaboleno y limoneno, productos procedentes de la ruta de los ácidos grasos, que incluyen ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos o  
25 moléculas tales como 3-hidroxipropionato (3-HP) o isobutileno.

La concentración de arginina proporcionada al cultivo puede aumentarse para aumentar la producción de al menos un producto seleccionado de un grupo de productos que no requieren directamente ATP pero que tampoco producen  
30 la misma cantidad de ATP por acetyl-CoA que el formación de acetato. La concentración de arginina proporcionada al cultivo puede aumentarse para aumentar la producción de al menos un producto seleccionado del grupo que consiste en acetona, IPA, 3-HB, 2-HIBA, 1,3-BDO, 2,3-BDO, lactato, 1,2-PDO, 1-propanol, iso-butanol, butirato, butanol, citramalato, succinato y MEK.

El cultivo puede producir una cantidad reducida de acetato en comparación con un cultivo donde no se proporciona  
35 arginina en exceso para los requisitos celulares. El cultivo puede producir al menos un 10 % menos de acetato o al menos un 20 % menos de acetato o al menos un 30 % menos de acetato o al menos un 40 % menos de acetato o al menos un 50 % menos de acetato o al menos un 60 % menos de acetato o al menos un 80 % menos de acetato. Puede no producirse acetato neto, menos de 1 g/l de acetato, menos de 0,5 g/l de acetato, menos de 0,1 g/l de acetato, menos de 0,05 g/l de acetato o menos de 0,01 g/l de acetato.

40 Se divulga un método para mejorar la eficacia de una fermentación, comprendiendo el método proporcionar al cultivo uno o más sustratos gaseosos y arginina, y fermentar el cultivo de manera que el cultivo utilice argina y el uno o más sustratos gaseosos. El sustrato gaseoso se selecciona del grupo que consiste en CO, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. La arginina y el sustrato gaseoso pueden ser absorbidos por el cultivo en una proporción de al menos 2:1 o al menos 1:1 o al menos  
45 1:2.

También se divulga un método para mejorar la viabilidad de un proceso de fermentación, comprendiendo el método  
50 hacer fluir un sustrato gaseoso que contiene C1 en un biorreactor que contiene un cultivo de al menos una bacteria fijadora de C1 que comprende al menos una ruta de arginina desiminasa o una ruta de arginina descarboxilasa en un medio nutritivo líquido; y fermentar el cultivo para producir al menos un producto. Se puede proporcionar arginina al cultivo en exceso de los requisitos celulares del cultivo. En determinadas realizaciones, la arginina proporcionada al cultivo se cataboliza mediante la ruta de la arginina desiminasa para producir amonio, que se utiliza por el cultivo como fuente de nitrógeno.

55 Se divulga un método de crecimiento de una bacteria fijadora de C1 con arginina como única fuente de nitrógeno. Puede proporcionarse arginina al cultivo y no proporcionarse de manera extrínseca amonio al cultivo.

La bacteria fijadora de C1 puede seleccionarse del grupo que consiste en *Clostridium*, *Moorella*, *Eubacterium*,  
60 *Oxobacter*, *Sporomusa* y *Thermoanaerobacter*. La bacteria puede seleccionarse del grupo que consiste en *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia product*, *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*, *Thermoanaerobacter kiuvi*. En realizaciones preferidas, la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*  
65 y *Clostridium ragsdalei*.

5 Se divulga una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una ruta de arginina desiminasa optimizada. La bacteria fijadora de C1 genomanipulada puede comprender una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), carbamoiltransferasa (ornitina carbamoiltransferasa, putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), en donde cada enzima es una enzima endógena sobreexpresada, una enzima endógena mutada o una enzima exógena. La bacteria fijadora de C1 puede ser una bacteria *Clostridium*. En realizaciones particulares, la bacteria es *Clostridium autoethanogenum*.

10 Se divulga una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que ha mejorado el metabolismo celular de la arginina en comparación con un microorganismo precursor, en donde la bacteria fijadora de C1 genomanipulada comprende una o más modificaciones genéticas que interrumpen un transportador de arginina. La modificación genética puede ser una inactivación o un reemplazo del transportador arginina:ornitina (CAETHG 3023-24). La bacteria puede comprender además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3), una carbamato cinasa (EC 2.7.2.2),  
15 ornitina racemasa ( EC 5.1.1.12), ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12), 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa (EC 2.3.1.B10), en donde cada enzima es una enzima endógena sobreexpresada, una enzima endógena mutada o una enzima exógena.

20 Se divulga un método para producir al menos un producto a partir de un sustrato, comprendiendo el método cultivar una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), carbamoiltransferasa (ornitina carbamoiltransferasa, putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), en donde cada enzima es una enzima endógena sobreexpresada, una enzima endógena mutada de una enzima exógena.

25 Se divulga un método para mejorar la eficacia de la incorporación de arginina en el metabolismo, comprendiendo el método cultivar una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una o más modificaciones genéticas seleccionadas del grupo que consiste en (i) una mutación interruptora que interrumpe un transportador de arginina; (ii) sobreexpresión de una o más enzimas endógenas seleccionadas del grupo que consiste en arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3), carbamato cinasa (EC 2.7.2.2),  
30 ornitina racemasa ( EC 5.1.1.12), ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12), y 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa (EC 2.3.1.B10); (iii) expresión de una o más enzimas endógenas mutadas seleccionadas del grupo que consiste en arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3), carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), ornitina racemasa (EC 5.1.1.12), ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12) y  
35 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa (EC 2.3.1.B10) y (iv) expresión de una o más enzimas exógenas seleccionadas del grupo que consiste en arginina desiminasa ( EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3), carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), ornitina racemasa (EC 5.1.1.12), ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12) y 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa (EC 2.3.1.B10).

40 Se divulga un método para mejorar la eficacia de la utilización conjunta de arginina con uno o más sustratos gaseosos seleccionados del grupo que consiste en CO, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, comprendiendo el método cultivar una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una o más modificaciones genéticas, en donde la una o más modificaciones genéticas se seleccionan del grupo que consiste en (i) la mutación interruptora de elementos reguladores y (ii) el reemplazo de sitios de unión a operadores o promotores naturales con promotores constitutivos o sintéticos. En realizaciones particulares, la mutación interruptora es una inactivación del represor de arginina argR, y el reemplazo es un reemplazo de un promotor del operón de la ruta de la arginina desiminasa con un promotor constitutivo o sintético.

#### 50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra el crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio definido de 20 aminoácidos + 5 g de fructosa/l.

55 La figura 2 es un gráfico que muestra los datos de consumo y producción de aminoácidos para DSM10061 de *C. autoethanogenum* creciendo en medio de 20AA. El marcador indica la DO en el momento del muestreo; la medición de cisteína para las dos primeras muestras estaba fuera del intervalo de calibración.

La figura 3 es un gráfico que muestra el crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medios de 14AA y 8AA junto con una comparación con el medio de 20AA. Las barras de error representan la desviación típica entre cultivos duplicados. 4× y 2× significan concentraciones de AA 4 veces y 2 veces más elevadas en comparación con el medio de 20AA, respectivamente.

60 La figura 4 es un gráfico que muestra el tiempo de duplicación, tD, para DSM10061 de *C. autoethanogenum* para medios de 14AA y 8AA en comparación con el medio 20AA. tD, tiempo de duplicación; Las barras de error representan la desviación típica entre cultivos duplicados. 4× y 2× significan concentraciones de AA 4 veces y 2 veces más elevadas en comparación con el medio de 20AA, respectivamente.

65 La figura 5 es un gráfico que muestra los datos de consumo y producción de aminoácidos de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio 4× de 14 AA. 4× significa concentraciones de AA 4 veces más elevadas en

comparación con el medio de 20AA. El marcador indica la DO en el momento del muestreo.

La figura 6 es un gráfico que muestra los datos de consumo y producción de aminoácidos de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio 2× 8AA. 2× significa concentraciones de AA 2 veces más elevadas en comparación con el medio de 20AA. El marcador indica la DO en el momento del muestreo; la medición de cisteína para la

5 primera muestra estaba fuera del intervalo de calibración.

La figura 7 es un gráfico que muestra los datos de crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medios de 12AA y 4AA. Las barras de error representan la desviación típica entre cultivos duplicados.

La figura 8 es un gráfico que muestra los datos de consumo y producción de aminoácidos para DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio de 12 AA. El marcador indica la DO en el momento del muestreo.

10 La figura 9 es un gráfico que muestra los datos de consumo y producción de aminoácidos para DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio de 4AA. El marcador indica la DO en el momento del muestreo; la unidad  $\mu\text{M}$  no es aplicable al máximo de 8,3 min.

La figura 10 es un gráfico que muestra los datos de crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio de 4AA utilizando BugLab. Unidades de error, entrada de datos sin procesar. La tasa de crecimiento específica 0,34 h<sup>-1</sup> es tD~2 h. La figura 11 es un gráfico que muestra los datos de crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medios PETC-MES sin YE con 5 g de arginina/l + 5 g de fructosa/l.

15 La figura 12 es un gráfico que muestra los datos de producción de acetato para DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio PETC-MES sin YE con 5 g de arginina/l + 5 g de fructosa/l.

La figura 13 es un gráfico que muestra los datos de consumo y producción de aminoácidos para DSM10061 de

20 *C. autoethanogenum* en 5 g de arginina/l + 5 g de fructosa/l. El marcador indica la DO en el momento del muestreo; la unidad  $\mu\text{M}$  no es aplicable al máximo de 8,3 min.

La figura 14 es un gráfico que muestra los datos de crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio PETC-MES sin YE con 5 g de arginina/l + 5 g de fructosa/l utilizando BugLab. Unidades de error, entrada de datos sin procesar. La tasa de crecimiento específica 0,21 h<sup>-1</sup> es tD~3 h.

25 La figura 15 es un gráfico que muestra la diferencia en la curva de crecimiento y los tiempos de duplicación de arginina y extracto de levadura en experimentos de biorreactor con fructosa.

La figura 16 es un gráfico que muestra el crecimiento autótrofo de DSM23693 de *C. autoethanogenum* con ( $\Delta$ ) y sin ( $\bullet$ ) complementos de arginina.

La figura 17 es un gráfico que muestra el crecimiento autótrofo de DSM23693 de *C. autoethanogenum* con ( $\Delta$ ) y sin ( $\bullet$ ) complementos de arginina, así como el crecimiento en arginina solo en ausencia de gas CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> ( $\square$ ).

30 La figura 18 es un gráfico logarítmico del crecimiento autótrofo de DSM23693 de *C. autoethanogenum* con ( $\Delta$ ) y sin ( $\bullet$ ) complementos de arginina.

La figura 19 es un gráfico que muestra la producción de acetato durante el crecimiento autótrofo de DSM23693 de *C. autoethanogenum* con ( $\Delta$ ) y sin ( $\bullet$ ) complementos de arginina.

35 La figura 20 es una representación esquemática de la ruta de la arginina desiminasa.

La figura 21 es una representación esquemática de la degradación de L-arginina en una ruta de arginina desiminasa.

La figura 22A y la figura 22B son gráficos circulares que muestran el flujo de carbono hacia los productos.

La figura 23 muestra las enzimas necesarias para el consumo de ornitina en *Clostridium sticklandii*.

40 La figura 24 es un gráfico que muestra la distribución de la producción de ATP durante el crecimiento heterótrofo de *C. autoethanogenum* en medio de 4AA o ARG con fructosa.

## Descripción detallada de la invención

### 45 Definiciones y antecedentes

La expresión "en exceso de los requisitos celulares" se refiere a proporcionar un componente al microorganismo que es mayor que la cantidad del componente que necesita el microorganismo para la síntesis de biomasa.

50 La expresión "producto intensivo en ATP" se refiere a un metabolito cuya síntesis necesita la entrada de ATP (energía) al menos en una etapa de su ruta de síntesis (por ejemplo, que tiene una reacción dependiente de ATP en la ruta).

La expresión "tasa de crecimiento específica" se refiere a la tasa de crecimiento de la biomasa celular por biomasa celular por hora.

La expresión "tiempo de duplicación" se refiere al tiempo en horas que tarda en duplicarse la biomasa celular. La expresión "ruta del metabolismo de la arginina" se refiere en general a cualquier ruta implicada en el metabolismo de la arginina. La ruta del metabolismo de la arginina normalmente comprende al menos una ruta de la arginina desiminasa y una ruta de la arginina descarboxilasa.

La expresión "modificación genética" o "genomanipulado" se refiere en general a la manipulación del genoma o de los ácidos nucleicos de un microorganismo. De igual modo, la expresión "modificado por ingeniería genética" se refiere a un microorganismo que comprende un genoma o ácidos nucleicos manipulados. Los métodos de modificación genética incluyen, por ejemplo, la expresión de genes heterólogos, inserción o eliminación 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 aleatoria, reordenación de genes y optimización de codones.

"Recombinante" indica que un ácido nucleico, proteína o microorganismo es el producto de una modificación genética, genomaniplulación o recombinación. En general, el término "recombinante" se refiere a un ácido nucleico, proteína o microorganismo que contiene o está codificado por material genético procedente de múltiples fuentes, tal como dos o más cepas o especies diferentes de microorganismos. Como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante" también puede usarse para describir un microorganismo que comprende un ácido nucleico o proteína mutados, incluyendo una forma mutada de un ácido nucleico o proteína endógenos.

"Endógeno" se refiere a un ácido nucleico o proteína que está presente o se expresa en el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo. Por ejemplo, un gen endógeno es un gen que está presente de forma natural en el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo. 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 proteína que no está presente en el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo. Un gen o enzima exógeno puede proceder de una cepa o especie heteróloga (es decir, diferente) e introducirse o expresarse en el microorganismo. Un gen o enzima exógeno puede crearse de manera artificial o recombinante e introducirse o expresarse en el microorganismo. Los ácidos nucleicos exógenos pueden adaptarse para integrarse en el genoma del microorganismo para permanecer en un estado extracromosómico en el microorganismo, por ejemplo, en un plásmido.

"Actividad enzimática", o simplemente "actividad", se refiere ampliamente a la actividad enzimática, incluyendo, aunque no de forma limitativa, a 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 manera 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.

"Mutado" se refiere a un ácido nucleico o proteína que se ha modificado en el microorganismo en comparación con el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo. La mutación puede ser una eliminación, inserción o sustitución en un gen que codifica una enzima. La mutación puede ser una eliminación, inserción o sustitución de uno o más aminoácidos en una enzima.

En particular, 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 eliminar 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 reduce, previene o bloquea 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 reduce o inhibe la actividad de una enzima o la introducción de un ácido nucleico (por ejemplo, ARN antisentido, ARNip, CRISPR) o proteína que inhibe la expresión de una enzima. La mutación interruptora puede introducirse utilizando cualquier método conocido en la materia.

La introducción de una mutación interruptora da como resultado un microorganismo que no produce ningún producto diana o que no produce de manera sustancial ningún producto diana o que produce una cantidad reducida de producto diana en comparación con el microorganismo precursor del que procede el microorganismo. Por ejemplo, el microorganismo puede no producir ningún producto diana o al menos aproximadamente un 1 %, un 3 %, un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % menos de producto diana que el microorganismo precursor. Por ejemplo, el microorganismo puede producir menos de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 o 1,0 g/l de producto diana.

"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 pueden tener codones optimizados para la expresión en *Clostridium*, en particular *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. Los genes pueden tener codones optimizados para la expresión en LZ1561 de *Clostridium autoethanogenum*, que se deposita con el número de registro de DSMZ DSM23693.

"Sobreexpresado" se refiere a un aumento en la expresión de un ácido nucleico o proteína en el microorganismo en comparación con el microorganismo de tipo silvestre o precursor del que procede el microorganismo. La sobreexpresión puede lograrse por cualquier medio conocido en la materia, incluyendo la modificación del número de copias del gen, la velocidad de transcripción de genes, la velocidad de traducción de genes o la velocidad de degradación enzimática.

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 divulgados en la técnica anterior o ejemplificados en el presente documento. La invención puede practicarse usando ácidos nucleicos o proteínas variantes que 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.

5  
10  
15  
20  
25

Tales 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 públicamente en sitios web tales como Genbank o NCBI. Las variantes funcionalmente equivalentes también incluyen ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de la optimización de codones para 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 preferentemente tendrá 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 variantes puede evaluarse usando cualquier método conocido en la materia.

Los ácidos nucleicos pueden administrarse a un microorganismo usando cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden administrarse 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. Pueden usarse inhibidores de restricción. Los vectores adicionales pueden incluir plásmidos, virus, bacteriófagos, cósmidos y cromosomas artificiales. Los ácidos nucleicos pueden administrarse al microorganismo usando un plásmido. A modo de ejemplo, la transformación (incluyendo transducción o transfección) puede lograrse mediante electroporación, ultrasonido, transformación mediada por polietilenglicol, competencia química o natural, transformación de protoplastos, inducción de profagos o conjugación. Cuando está presente un sistema de enzimas de restricción activo, puede ser necesario metilar un ácido nucleico antes de la introducción del ácido nucleico en un microorganismo.

Además, los ácidos nucleicos pueden diseñarse para comprender 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. De manera ideal, el promotor es un promotor de la ruta de Wood-Ljungdahl, un promotor de ferredoxina, un promotor de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, un promotor del operón del complejo Rnf, un promotor del operón de ATP sintasa o un promotor del operón de fosfotransacetilasa/acetato cinasa.

Un "microorganismo" es un organismo microscópico, especialmente una bacteria, arqueas, virus u hongos. Normalmente, el microorganismo es una bacteria. Como se utiliza en el presente documento, la referencia a "microorganismo" debe considerarse que abarca "bacteria".

Un "microorganismo precursor" es un microorganismo utilizado para generar un microorganismo. 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 puede modificarse para expresar o sobreexpresar una o más enzimas que no se expresaban o sobreexpresaban en el microorganismo precursor. De manera similar, el microorganismo puede modificarse para que contenga uno o más genes que no contenía el microorganismo precursor. El microorganismo también puede modificarse para no expresar o para expresar cantidades menores de una o más enzimas que se expresaban en el microorganismo precursor. En una realización, el microorganismo precursor es *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. En una realización preferida, el organismo precursor es LZ1561 de *Clostridium autoethanogenum*, que se depositó el 7 de junio de 2010 en la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ), situada 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.

La expresión "procedente de" indica que un ácido nucleico, proteína o microorganismo se modifica o adapta a partir de un ácido nucleico, proteína o microorganismo (por ejemplo, un precursor o de tipo silvestre) diferente, para producir un nuevo ácido nucleico, proteína o microorganismo. Tales modificaciones o adaptaciones generalmente incluyen inserción, eliminación, mutación o sustitución de ácidos nucleicos o genes. En general, el microorganismo

procede de un microorganismo precursor. En una realización, el microorganismo procede de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*. En una realización preferida, el microorganismo procede de LZ1561 de *Clostridium autoethanogenum*, que se deposita con el número de registro de DSMZ DSM23693.

5 El microorganismo puede clasificarse adicionalmente basándose en características funcionales. Por ejemplo, el microorganismo puede ser o proceder de un microorganismo fijador de C1, un anaerobio, un acetógeno, un etanológeno, un autótrofo, un carboxidótrofo y/o un metanótrofo. La tabla 1 proporciona una lista representativa de microorganismos e identifica sus características funcionales.

10

Tabla 1

	Fijador de C1	Anaerobio	Acetógeno	Etanológeno	Autótrofo	Carboxidótrofo	Metanótrofo
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+/- <sup>1</sup>	-	-	-
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Blautia product</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>	+	+	+	-	+	+/- <sup>2</sup>	-
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Moorella thermautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Moorella thermoacetica</i> (anteriormente <i>Clostridium thermoaceticum</i> )	+	+	+	- <sup>3</sup>	+	+	-
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>4</sup>	-
<i>Sporomusa silvacetica</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>5</sup>	-
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>6</sup>	-
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	+	+	+	-	+	-	-

<sup>1</sup> *Acetobacterium woodi* puede producir etanol a partir de fructosa, pero no a partir de gas.

<sup>2</sup> No se ha investigado si *Clostridium magnum* puede crecer en CO.

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

<sup>4</sup> No se ha investigado si *Sporomusa ovata* puede crecer en CO.

<sup>5</sup> No se ha investigado si *Sporomusa silvacetica* puede crecer en CO.

<sup>6</sup> No se ha investigado si *Sporomusa sphaeroides* puede crecer en CO.

"C1" se refiere a una molécula de un carbono, por ejemplo, CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> o CH<sub>3</sub>OH. "C1-oxigenado" se refiere a una molécula de un carbono que también comprende al menos un átomo de oxígeno, por ejemplo, CO, CO<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>OH. "Fuente de carbono C1" se refiere a una molécula de carbono que sirve como fuente de carbono parcial o única para el microorganismo. Por ejemplo, una fuente de carbono C1 puede comprender uno o más de CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>OH o CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Preferentemente, la fuente de carbono C1 comprende uno o ambos de CO y CO<sub>2</sub>. Un "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 es una bacteria fijadora de C1. El microorganismo puede proceder de un microorganismo fijador de C1 identificado en la tabla 1.

20

Un "anaerobio" es un microorganismo que no necesita oxígeno para el crecimiento. Un anaerobio puede reaccionar

negativamente o incluso morir si el oxígeno está presente por encima de un determinado umbral. Normalmente, el microorganismo es un anaerobio. El microorganismo puede proceder de un anaerobio identificado en la tabla 1.

5 Un "acetógeno" es una bacteria anaerobia obligada que utiliza la ruta de Wood-Ljungdahl como su mecanismo principal para la conservación de energía y para la síntesis de acetil-CoA y productos derivados de acetil-CoA, tales como acetato (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Los acetógenos utilizan la ruta de la acetil-CoA como un (1) mecanismo para la síntesis reductora de acetil-CoA a partir de CO<sub>2</sub>, (2) proceso terminal de aceptación de electrones y conservación de energía, (3) mecanismo para la fijación (asimilación) de CO<sub>2</sub> en la síntesis de carbono celular (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, en: *The Prokaryotes*, 3.<sup>a</sup> edición, pág. 354, Nueva York, NY, 2006). Todos los acetógenos de origen natural son fijadores de C1, anaeróbicos, autótrofos y no metanótrofos. Normalmente, el microorganismo es un acetógeno. El microorganismo puede proceder de un acetógeno identificado en la tabla 1.

15 Un "etanológico" es un microorganismo que produce o es capaz de producir etanol. Normalmente, el microorganismo es un etanológico. El microorganismo puede proceder de un etanológico identificado en la tabla 1.

20 Un "autótrofo" es un microorganismo capaz de crecer en ausencia de carbono orgánico. En cambio, los autótrofos utilizan fuentes de carbono inorgánico, tal como CO y/o CO<sub>2</sub>. Normalmente, el microorganismo es un autótrofo. El microorganismo puede proceder de un autótrofo identificado en la tabla 1.

Un "carboxidótrofo" es un microorganismo capaz de utilizar CO como única fuente de carbono. Normalmente, el microorganismo es un carboxidótrofo. El microorganismo puede proceder de un carboxidótrofo identificado en la tabla 1.

25 Un "metanótrofo" es un microorganismo capaz de utilizar metano como única fuente de carbono y energía. El microorganismo puede proceder de un metanótrofo.

De manera más amplia, el microorganismo puede proceder de cualquier género o especie identificada en la tabla 1.

30 En una realización preferida, el microorganismo puede proceder del grupo de *Clostridia* que comprende las especies *Clostridium autoethanogenum*, *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*).

35 Estas tres especies tienen muchas similitudes. En particular, estas especies son todas miembros del género *Clostridium* fijadoras de C1, anaeróbicas, acetogénicas, etanologénicas y carboxidotróficas. Estas especies tienen genotipos y fenotipos y modos de conservación de energía y metabolismo fermentativo similares. Aún más, estas especies están agrupadas en el grupo I de homología de ARNr de los clostridios con ADN de ARNr 16S que es más del 99 % idéntico, tienen un contenido G+C en el ADN de aproximadamente el 22 al 30 % en moles, son grampositivas, tienen una morfología y un tamaño similares (células en crecimiento logarítmico entre 0,5 a 0,7 × 3 a 5 µm), son mesofílicas (crecen de manera óptima de 30 a 37 °C), tienen intervalos de pH similares de aproximadamente 4 a 7,5 (con un pH óptimo de aproximadamente 5,5 a 6), carecen de citocromos y conservan energía a través de un complejo de Rnf. También, se ha demostrado la reducción de ácidos carboxílicos en sus correspondientes alcoholes en estas especies (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Cabe destacar que, estas especies también muestran un fuerte crecimiento autótrofo en gases que contienen 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.

40 Sin embargo, estas tres especies también tienen varias diferencias. Estas especies se aislaron de diferentes fuentes: *Clostridium autoethanogenum* de tripa de conejo, *Clostridium ljungdahlii* de los desechos del gallinero y *Clostridium ragsdalei* de sedimentos de agua dulce. Estas especies difieren en la utilización de diversos azúcares (por ejemplo, ramnosa, arabinosa), ácidos (por ejemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por ejemplo, arginina, histidina) y otros sustratos (por ejemplo, betaína, butanol). Aún más, estas especies difieren en auxotrofia a determinadas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina). Estas especies tienen diferencias en las secuencias de los ácidos nucleicos y de aminoácidos de los genes y proteínas de la ruta de Wood-Ljungdahl, aunque se ha encontrado que la organización general y el número de estos genes y proteínas es el mismo en todas las especies (Köpke, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011).

50 Por lo tanto, en síntesis, muchas de las características de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, o *Clostridium ragsdalei* no son específicas de esa especie, sino que son características generales de este grupo de miembros del género *Clostridium* fijadores de C1, anaeróbicos, acetogénicos, etanologénicos y carboxidotróficos. Sin embargo, ya que estas especies son, de hecho, distintas, la modificación o manipulación genética de una de estas especies puede no tener un efecto idéntico en otra de estas especies. Por ejemplo, se pueden observar diferencias en el crecimiento, el rendimiento o la producción del producto.

El microorganismo de la invención también puede proceder de un aislado o mutante de *Clostridium autoethanogenum*, *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). 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*", PhD thesis, 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).

"Sustrato" se refiere a una fuente de carbono y/o energía para el microorganismo. Normalmente, el sustrato es gaseoso y comprende una fuente de carbono C1, por ejemplo, CO, CO<sub>2</sub> y/o CH<sub>4</sub>. Preferentemente, el sustrato comprende una fuente de carbono C1 de CO o CO + CO<sub>2</sub>. El sustrato puede comprender además otros componentes no de carbono, tales como H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o electrones.

El sustrato generalmente comprende al menos alguna cantidad de CO, tal como aproximadamente el 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 el 20 al 80, 30 al 70 o 40 al 60 % en moles de CO. Preferentemente, el sustrato comprende aproximadamente el 40 al 70 % en moles de CO (por ejemplo, gas de acería o de alto horno), aproximadamente el 20 al 30 % en moles de CO (por ejemplo, gas de horno de oxígeno básico) o aproximadamente el 15 al 45 % en moles de CO (por ejemplo, gas de síntesis). El sustrato puede comprender una cantidad relativamente baja de CO, tal como aproximadamente el 1 al 10 o el 1 al 20 % en moles de CO. El microorganismo normalmente convierte al menos una porción del CO del sustrato en un producto. El sustrato puede no comprender nada o sustancialmente nada (<1 % en moles) de CO.

El sustrato puede comprender algunas cantidades de H<sub>2</sub>. Por ejemplo, el sustrato puede comprender aproximadamente el 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 30 % en moles de H<sub>2</sub>. El sustrato puede comprender una cantidad relativamente elevada de H<sub>2</sub>, tal como aproximadamente un 60, un 70, un 80 o un 90 % en moles de H<sub>2</sub>. El sustrato puede no comprender nada o sustancialmente nada (<1 % en moles) de H<sub>2</sub>.

El sustrato puede comprender algunas cantidades de CO<sub>2</sub>. Por ejemplo, el sustrato puede comprender aproximadamente el 1 al 80 o el 1 al 30 % en moles de CO<sub>2</sub>. El sustrato puede comprender menos de aproximadamente un 20, un 15, un 10 o un 5 % en moles de CO<sub>2</sub>. El sustrato puede comprender nada o sustancialmente nada (<1 % en moles) de CO<sub>2</sub>.

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

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, procesos de refinamiento de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbón, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En el presente caso, el sustrato y/o la fuente de carbono C1 puede capturarse del proceso industrial antes de ser emitido a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. El sustrato y/o la fuente de carbono C1 puede ser gas de síntesis, tal como el gas de síntesis obtenido por gasificación de carbón o residuos de refinería, gasificación de biomasa o material lignocelulósico, o reformado de gas natural. El gas de síntesis puede obtenerse a partir de la gasificación de residuos sólidos urbanos o de residuos sólidos industriales.

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 (O<sub>2</sub>) 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.

El microorganismo puede cultivarse para producir uno o más productos. Por ejemplo, *Clostridium autoethanogenum* produce o puede genomaniplarse para producir etanol (documento WO 2007/117157), acetato (documento WO 2007/117157), butanol (documento WO 2008/115080 y documento WO 2012/053905), butirato (documento WO 2008/115080), 2,3-butanodiol (documento WO 2009/151342), lactato (documento WO 2011/112103), buteno (documento WO 2012/024522), butadieno (documento WO 2012/024522), metiletilcetona (2-butanona) (documento WO 2012/024522 y documento 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

2014/0369152) y 1-propanol (documento WO 2014/0369152). Además de uno o más productos diana, el microorganismo también puede producir etanol, acetato y/o 2,3-butanodiol. La biomasa microbiana en sí puede considerarse un producto.

5 Un "producto natural" es un producto generado por un microorganismo sin modificar genéticamente. Por ejemplo, etanol, acetato y 2,3-butanodiol son productos naturales de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*. Un "producto no natural" es un producto que se genera por un microorganismo modificado genéticamente, pero no se produce por un microorganismo sin modificar genéticamente a partir del que procede el microorganismo modificado genéticamente.

10 "Selectividad" se refiere a la relación de la generación de un producto diana respecto a la generación de todos los productos de fermentación generados por un microorganismo. El microorganismo puede genomanipularse para generar productos en una determinada selectividad o en una selectividad mínima. Un producto diana puede suponer al menos aproximadamente un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 30 %, un 50 % o un 75 % de todos los productos de fermentación generados por el microorganismo. El producto diana puede suponer al menos un 10 % de todos los productos de fermentación generados por el microorganismo, de modo que el microorganismo tiene una selectividad para el producto diana de al menos un 10 %. El producto diana puede suponer al menos un 30 % de todos los productos de fermentación generados por el microorganismo, de modo que el microorganismo tiene una selectividad para el producto diana de al menos un 30 %.

15 "Que aumenta la eficacia", "eficacia aumentada", y similares incluyen, pero sin limitación, aumento de la tasa de crecimiento específico, tasa o volumen de generación de producto, volumen de producto por volumen de sustrato consumido o selectividad de producto. La eficacia puede medirse respecto al rendimiento del microorganismo precursor a partir del que procede el microorganismo.

20 Los términos "productividad" o "tasa de producción" son la productividad volumétrica de un producto. En sistemas continuos, la productividad volumétrica se calcula como la relación entre la concentración en estado estacionario del producto y el tiempo de retención de líquido. En sistemas discontinuos, la productividad volumétrica se calcula como la concentración y el tiempo necesario para producir dicha concentración en un sistema discontinuo. La productividad volumétrica se expresa como g/l/día. 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 agitado continuo (CSTR, del inglés "continuous stirred tank reactor"), un reactor de células inmovilizadas (ICR, del inglés "immobilized cell reactor"), un reactor de lecho percolador (TBR, del inglés "trickle bed reactor"), columna de burbujeo, fermentador de elevación de gases, 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 utiliza 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.

30 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 anaeróbico, tal como un medio de crecimiento microbiano anaeróbico mínimo. Los medios adecuados son bien conocidos en la materia.

45 Es deseable que el cultivo/fermentación se lleve a cabo en condiciones apropiadas para la producción del producto diana. Normalmente, el cultivo/fermentación se realiza en condiciones anaerobias. Las condiciones de reacción a considerar 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 agitado de flujo continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato gaseoso para garantizar que el gas en la fase líquida no se vuelva limitante y concentraciones máximas del producto para evitar la inhibición del producto. En particular, la tasa de introducción del sustrato puede controlarse para asegurar que la concentración de gas en la fase líquida no se vuelva limitante, dado que los productos pueden consumirse por el cultivo en condiciones limitadas de gas.

50 La operación de un biorreactor a presiones elevadas permite una tasa aumentada de transferencia de masa de gas de la fase gaseosa a la fase líquida. Por consiguiente, generalmente es preferible realizar el cultivo/fermentación a presiones mayores que la presión atmosférica. También, dado que una tasa de conversión de gas dada es, en parte, una función del tiempo de retención del sustrato y el tiempo de retención dicta 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 gasto de capital del equipo de cultivo/fermentación. Esto, a su vez, significa que el tiempo de retención, definido como el volumen líquido en el biorreactor dividido por la tasa de flujo de gas aportado, 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 operar la fermentación a presiones mayores que la presión atmosférica. También, dado que una tasa de conversión de gas dada es en parte una función del tiempo de retención del sustrato y lograr un tiempo

de retención deseado, a su vez, dicta 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.

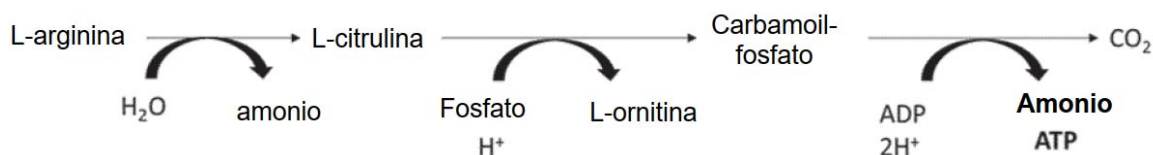
5 Los productos diana pueden separarse o purificarse a partir de un caldo de fermentación utilizando cualquier método o combinación de métodos conocidos en la materia, incluyendo, por ejemplo, destilación fraccionada, evaporación, pervaporación, extracción de gas, separación de fases y fermentación extractiva, incluyendo, por ejemplo, extracción líquido-líquido. Los productos diana pueden recuperarse del caldo de fermentación eliminando continuamente una parte del caldo del biorreactor, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración) y recuperando uno o más productos diana del caldo. Los alcoholes y/o acetona puede(n) recuperarse, por ejemplo, mediante destilación. Los ácidos pueden recuperarse, por ejemplo, por adsorción sobre carbón activado. Las células microbianas separadas se devuelven preferentemente al biorreactor. El permeado sin células que queda después de que se hayan eliminado los productos diana preferentemente se devuelve también al biorreactor. Se pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitaminas B) al permeado sin células para reponer el medio nutritivo antes de que se devuelva al biorreactor.

El uso del término "ácido", "ácidos" y similar cuando se hace referencia a la adición de un "ácido" a un cultivo o biorreactor de acuerdo con la invención debe tomarse en sentido amplio, incluyendo cualquier ácido monocarboxílico y dicarboxílico. La referencia a la adición o producción de sales equivalentes debe entenderse como una referencia al ácido, o una mezcla, por lo tanto. Por ejemplo, la referencia al término acetato debe incluir ácido acético y viceversa. La relación de ácido molecular a carboxilato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema. Ejemplos de ácidos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-pentanoico, ácido n-hexanoico y ácido benzoico.

25 Se divulgan métodos para mejorar la eficacia de la fermentación. Los inventores han descubierto que la adición de aminoácidos específicos en exceso de los requisitos celulares a un cultivo microbiano, tiene un profundo efecto en el crecimiento del cultivo. Además, los inventores han identificado que esta adición en exceso de aminoácidos permite una mayor producción de productos de fermentación, especialmente productos de fermentación con demandas de energía/ATP elevadas.

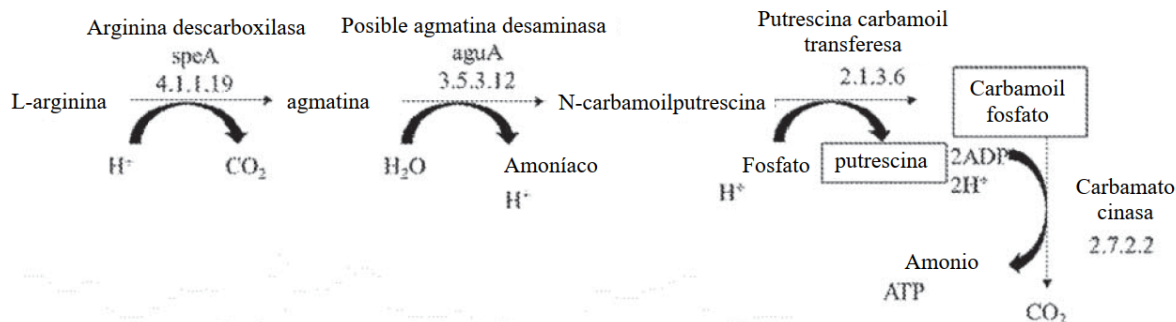
30 La presente divulgación proporciona métodos para mejorar la eficiencia de la fermentación. Los inventores han descubierto que la adición de arginina en exceso de los requisitos celulares a un cultivo microbiano, tiene un profundo efecto en crecimiento del cultivo. Además, los inventores han identificado que esta adición en exceso de arginina permite una mayor producción de productos de fermentación, especialmente productos de fermentación con demandas de energía/ATP elevadas. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que el efecto de aumento del crecimiento de la arginina proviene de la producción de ATP durante el catabolismo de la arginina por parte del microorganismo. La arginina se cataboliza a través de una ruta de arginina desiminasa (ADI) o una ruta de arginina descarboxilasa.

40 El catabolismo de la arginina a través de la arginina desiminasa ocurre por el siguiente mecanismo:



45 El catabolismo de la arginina a través de la ruta de ADI da como resultado la producción de amonio, CO<sub>2</sub> y ATP.

El catabolismo de la arginina a través de la ruta de la arginina descarboxilasa ocurre por el siguiente mecanismo:



La producción de ATP resultante del catabolismo de la arginina permite un mayor perfil de crecimiento del microorganismo.

5 Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores creen que mientras el catabolismo de la arginina proporciona el requisito de ATP del microorganismo para el crecimiento, la arginina no se utiliza como fuente de carbono por el microorganismo, más bien, la fuente de carbono utilizada es el componente de carbono en el gas que contiene C1.

10 Los procesos para la fermentación microbiana de sustratos gaseosos que contienen C1 para generar productos tales como etanol y acetato son muy conocidos en la materia. Dichos procesos proporcionan un medio para producir combustibles comercialmente útiles a partir de gases residuales industriales que comprenden fuentes de carbono C1. Estos procesos generalmente implican alimentar un sustrato gaseoso que comprende, por ejemplo, CO a un biorreactor que comprende un cultivo de al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico en un medio nutritivo líquido. El sustrato gaseoso se fermenta anaeróticamente para producir alcoholes, ácidos y mezclas de los mismos. El medio nutritivo líquido utilizado en el biorreactor, contiene normalmente varios nutrientes que mantienen el crecimiento del al menos un microorganismo carboxidotrófico acetogénico y se utilizan en rutas metabólicas del uno o más microorganismos para producir alcoholes. Los ejemplos de dichos nutrientes se incluyen MgCl, CaCl, KCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Fe, Ni, Zn, Mn, B, W, Se, etc.

20 También se sabe que las cepas de Clostridium pueden modificarse genéticamente para permitir la producción de una serie de otros productos útiles, que incluyen succinato, metil etil cetona (MEK), 2-butanol, propanodiol, 2-propanol, isopropanol, isopreno, acetoina, iso-butanol, citramalato, butadieno y ácido poliláctico, acetona, butanol, isobutileno, 3-hidroxipropionato (3HP) y ácidos grasos.

25 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el aumento de la concentración de arginina proporcionada al cultivo microbiano, aumentó el perfil de crecimiento del microorganismo y aumenta la cantidad de productos intensivos de ATP que puede producir el cultivo.

30 Un ejemplo implica proporcionar un medio nutritivo líquido con arginina, en donde la cantidad de arginina proporcionada por el medio nutritivo líquido supera los requisitos celulares del microorganismo fijador de C1. Proporcionar arginina en exceso de los requisitos celulares del microorganismo fijador de C1 tiene el efecto de aumentar la tasa de crecimiento específica del cultivo microbiano. La tasa de crecimiento específica del microorganismo fijador de C1 puede aumentarse en al menos un 10 % o al menos un 20 % o al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % o al menos un 60 % o al menos un 70 % en comparación con el microorganismo sin exceso de arginina.

35 El requisito celular de arginina por parte de un microorganismo se puede estimar mediante la determinación de la composición de aminoácidos de la biomasa después de la hidrólisis de la biomasa y el análisis de los aminoácidos.

40 Se ha demostrado que el aumento de la concentración de arginina en los medios nutritivos líquidos de igualar el requisito celular a 1000 veces (o más) por encima del requisito para la síntesis de biomasa, disminuyó el tiempo de duplicación del microorganismo. En determinados casos, el tiempo de duplicación del cultivo proporcionado con un exceso de arginina disminuyó a 3,5 h en comparación con un tiempo de duplicación de 7,3 h en un cultivo sin exceso de arginina. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores también creen que el aumento de la concentración de arginina de 2 a 80 veces (o más) por encima del requisito celular aumenta la tasa de productividad de los productos de fermentación intensivos de ATP. La arginina puede proporcionarse al cultivo de 2 a 1000 o de 2 a 800 o de 2 a 500 o de 2 a 100 o de 2 a 50 o de 2 a 10 o de 50 a 1000 o de 50 a 800 o de 50 a 600, o de 50 a 500 o de 50 a 300 o de 50 a 200 o de 50 a 100 o de 100 a 1000 o de 100 a 800 o de 100 a 600 o de 100 a 500 o de 100 a 300 o de 100 a 200 veces el requisito para la síntesis de biomasa.

50 En términos de concentración real, esta concentración puede ser una en la que la concentración de arginina en el medio nutritivo líquido sea de 20 mg/l a aproximadamente 20 g/l. La concentración de arginina se mantenga en una cantidad de al menos 20 mg/l o al menos 100 mg/l o al menos 300 mg/l o al menos 500 mg/l o al menos 1 g/l o al menos 2 g/l o al menos 3 g/l o al menos 4 g/l o al menos 5 g/l o al menos 10 g/l o al menos 20 g/l. La concentración de arginina se puede mantener entre 20 mg/l y aproximadamente 20 g/l o entre 100 mg/l y 20 g/l o entre 500 mg/l y 20 g/l o entre 500 mg/l y 10 g/l o entre 1 g/l y 10 g/l o entre 5 g/l y 10 g/l o entre 5 g/l y 20 g/l. Se puede proporcionar arginina al cultivo de manera que el consumo de arginina por parte del cultivo sea de al menos 20 mg de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 100 mg de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 1 gramo de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 5 gramos de arginina por gramo de peso celular seco o al menos 10 gramos de arginina por gramo de peso celular seco. Se puede proporcionar arginina al cultivo de manera que el consumo de arginina por el cultivo esté entre 20 mg y 20 gramos por gramo de peso celular seco o entre 100 mg y 20 gramos por gramo de peso celular seco o entre 1 gramo y 10 gramos por gramo de peso celular seco.

65 El cultivo puede consumir al menos 0,012 g de arginina para producir 1 g de biomasa. El requisito celular de arginina para la síntesis de biomasa puede estar entre 0,012 g por gramo de biomasa y aproximadamente 24 g por gramo de biomasa. El requisito de arginina para la síntesis de biomasa puede ser de al menos 0,012 g por gramo de biomasa o al menos 0,024 g por gramo de biomasa, a aproximadamente 0,048 g por gramo de biomasa o al menos 0,120 g

por gramo de biomasa o al menos 0,24 g por gramo de biomasa o al menos 0,48 g por gramo de biomasa o al menos 1,2 g por gramo de biomasa o al menos 2,4 g por gramo biomasa o al menos 4,8 g por gramo de biomasa o al menos 12 g por gramo de biomasa.

5 En algunos casos, el aumento de la concentración de arginina en el medio nutritivo líquido de 2 a 80 veces (o más) por encima del requisito celular aumenta el tiempo de duplicación del microorganismo en al menos un 10 % o al menos un 20 % o al menos un 30 % o en al menos un 40 % o al menos en un 50 % o en al menos un 60 % o en al menos un 70 %.

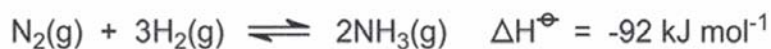
10 Cuando la arginina se aumentó por encima del requisito celular de *Clostridium autoethanogenum* se redujo la producción de acetato por parte del microorganismo. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores creen que la capacidad de *Clostridium autoethanogenum* para utilizar arginina para producir ATP para el crecimiento anula la necesidad del microorganismo de producir acetato para adquirir ATP cuando se suministra arginina.

15 Todos los microorganismos acetogénicos se describen para producir acetato (Drake, Acetogenic Prokaryotes, en The Prokaryotes, 3.<sup>a</sup> edición, páginas 354-420, Nueva York, NY, Springer, 2006), ya que la producción de acetato proporciona al microorganismo una opción para generar directamente ATP a partir de la fosforilación a nivel de sustrato a través de Pta (fosfotransacetilasa) y Ack (fosfotransacetilasa-acetato cinasa). En particular, a escala comercial, no es deseable que los microorganismos produzcan acetato (u otros ácidos orgánicos necesarios para la reacción de la CoA transferasa) como subproducto, ya que el acetato desvía el carbono de los productos diana y, por lo tanto, afecta la eficacia y el rendimiento de los productos diana. De manera adicional, el acetato puede ser tóxico para los microorganismos y/o puede servir como sustrato para el crecimiento de microorganismos contaminantes. Además, la presencia de acetato hace que sea más difícil recuperar y separar los productos diana y controlar las condiciones de fermentación para favorecer la producción de los productos diana.

25 La provisión de arginina en exceso de los requisitos celulares a un cultivo de *Clostridium autoethanogenum* da como resultado una producción de acetato muy reducida en comparación con un cultivo donde no se proporciona arginina en exceso de los requisitos celulares. Asimismo, los inventores han demostrado que la producción de acetato aumenta en un cultivo, una vez que la fuente de arginina se haya agotado por completo. La provisión de un exceso de arginina al cultivo microbiano puede reducir la producción de acetato en un 20 % o en un 30 % o en un 40 % o en un 50 % o en un 60 % o en un 70 % o en un 80 %.

Los inventores han demostrado que la arginina se convierte de manera estequiométrica en ornitina, lo que implica a la ruta de la arginina desaminasa como el mecanismo para el catabolismo de la arginina. Esta ruta convertiría la arginina en ornitina, amonio, ATP y CO<sub>2</sub>. El crecimiento mejorado se facilitaría mediante el suministro de ATP y amonio de la degradación de arginina. Se divulga un método para mejorar la viabilidad de un proceso de fermentación, en donde se proporciona arginina al cultivo microbiano en ausencia de una fuente alternativa de nitrógeno.

40 Es bien conocido en la materia que el microorganismo necesita nitrógeno para su crecimiento. Normalmente, se proporciona nitrógeno al cultivo en forma de sal de amonio o hidróxido de amonio. Normalmente, se produce amoníaco mediante el proceso de Haber, que se caracteriza por la siguiente reacción:



45 En la actualidad, se produce amoníaco principalmente a partir de gas natural y carbón. En un proceso normal de producción de amoníaco a partir de gas natural, el hidrógeno se obtiene del gas natural y el nitrógeno procede de la atmósfera. El gas natural produce gases de efecto invernadero, mientras que el amoníaco en sí mismo no produce gases de efecto invernadero, la producción de amoníaco sí. Es deseable encontrar y utilizar fuentes de amoníaco que sean completamente renovables. [[http://www.agmrc.org/renewable\\_energy/renewable\\_energy/ammonia-as-a-transportation-fuel/](http://www.agmrc.org/renewable_energy/renewable_energy/ammonia-as-a-transportation-fuel/)]. Los costes del hidróxido de amonio (28,0 a 30,0 p/p) están en el intervalo de 9600 USD por 1000 kilogramos.

55 La arginina (L-Arginina) se aisló por primera vez del extracto de plántulas de lupino en 1886. Más tarde se identificó que estaba ampliamente distribuida en alimentos y piensos. La arginina se puede producir mediante una variedad de métodos, incluida la hidrólisis de proteínas, síntesis química y síntesis microbiológica. La mayor parte de la L-arginina se produce mediante fermentación directa utilizando fuentes de carbono renovables. [[jn.nutrition.org/content/134/10/2854S.full](http://jn.nutrition.org/content/134/10/2854S.full)]

60 La ruta identificada del ejemplo 3 permite la conversión de 1 mol de arginina en 3 moles de amoníaco. Por lo tanto, la arginina puede proporcionar una fuente alternativa de nitrógeno para las bacterias, lo que aporta amoníaco directamente en el metabolismo, sin dejar de proporcionar las ventajas descritas anteriormente. Dado que 1 molécula de arginina se puede descomponer en 3 moléculas de amoníaco, las cantidades más bajas necesarias conducen a ahorros significativos debido al precio más bajo de la arginina (la arginina de grado alimenticio al 99 % cuesta alrededor de 17 a 18.000 USD/1000 kg, mientras que el amoníaco de grado industrial al 30 % cuesta ~10 a

65

11.000 USD/1000 kg de Sigma Aldrich o Fisher) y a la manipulación reducida. Además, la arginina se puede obtener de forma sostenible a partir de fuentes biológicas, por ejemplo, mediante fermentación (T. Utagawa, J. Nutr., 2004, 134, 2854S-2857).

5 La ruta de la arginina desiminasa procede a través de tres etapas enzimáticas, catalizadas por arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), una carbamoiltransferasa (ornitina carbamoiltransferasa, putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y una carbamato cinasa (EC 2.7.2.2). Se han identificado enzimas respectivas en el genoma de *C. autoethanogenum*.

10 Se divulga una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una ruta de arginina desiminasa mejorada. La bacteria fijadora de C1 genomanipulada puede comprender una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), carbamoiltransferasa (ornitina carbamoiltransferasa, putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), en donde cada enzima es una enzima endógena sobreexpresada, una enzima endógena mutada de una enzima exógena. La bacteria fijadora de C1 puede ser una bacteria *Clostridium*. La bacteria puede ser *Clostridium autoethanogenum*.

Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores creen que para aumentar el rendimiento, en particular, si se observa acumulación de intermediarios como citrulina, de la ruta, los genes respectivos se pueden sobreexpresar o los genes de otras fuentes se pueden introducir y expresar de manera heteróloga por un experto en la materia utilizando los métodos descritos anteriormente (documentos WO2012/053905, WO2012/115527 y WO2013-180584).

25 Se divulga un método para producir al menos un producto a partir de un sustrato, comprendiendo el método cultivar una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), carbamoiltransferasa (ornitina carbamoiltransferasa, putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), en donde cada enzima es una enzima endógena sobreexpresada, una enzima endógena mutada de una enzima exógena.

30 Se divulga una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en ornitina racemasa (EC 5.1.1.12), ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12) y 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores creen que los genes respectivos se pueden sobreexpresar o los genes de otras fuentes se pueden introducir y expresar de manera heteróloga por un experto en la materia utilizando los métodos descritos anteriormente (documentos WO2012/053905, WO2012/115527 y WO2013-180584). El organismo también puede adaptarse y evolucionar para utilizar la ornitina de manera más eficaz si se adapta para crecer con arginina a lo largo del tiempo. Esto está respaldado por la observación de una acumulación de ornitina.

40 Los inventores han identificado un represor de arginina que controla la expresión génica mediante la unión a una secuencia operadora palindrómica que se ubica aproximadamente 45 pb cadena arriba del codón de inicio de la arginina desiminasa. La adición de arginina provoca que el represor se desvincule de la secuencia operadora, lo que permite la transcripción de los genes cadena abajo de la secuencia operadora. Se divulga una bacteria recombinante genomanipulada que comprende al menos un gen heterólogo, proporcionándose dicho gen heterólogo cadena abajo de una secuencia operadora de unión a argR, en donde la expresión génica del al menos un gen heterólogo puede activarse mediante la adición de arginina.

45 Se divulga un método para producir al menos un producto, comprendiendo el método proporcionar una fuente de carbono a un cultivo que contiene una bacteria genomanipulada que comprende al menos un gen heterólogo, proporcionándose dicho gen heterólogo cadena abajo de una secuencia operadora de unión a argR, proporcionar al cultivo arginina y fermentar el cultivo. El al menos un gen heterólogo puede ser un gen heterólogo en la ruta de biosíntesis del producto.

50 En un ejemplo, los genes heterólogos pueden codificar una ruta metabólica que necesita ATP para la síntesis del producto. Por ejemplo, la ruta del mevalonato es una ruta heteróloga que convierte la acetil-CoA en isopentenil-difosfato a un coste de 3 moles de ATP por mol de isopentenil-difosfato. Utilizando el método descrito, la expresión de la ruta heteróloga del mevalonato podría activarse mediante la adición de arginina, que también proporcionaría ATP para la ruta del mevalonato a través de la degradación de la arginina a través de la ruta de la arginina desiminasa.

60 En otro aspecto, la arginina se puede utilizar a través de una ruta de descarboxilación de arginina. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores creen que la arginina se puede descarboxilar a agmatina y CO<sub>2</sub> mediante la enzima arginina descarboxilasa. La agmatina se puede convertir posteriormente en N-carbamoil putrescina mediante la enzima agmatina desiminasa, produciendo también amonio. La putrescina carbamoiltransferasa puede convertir N-carbamoil-putrescina más fosfato en putrescina más carbamoil-fosfato. El carbamoil fosfato más ADP se convierte en amonio + ATP + CO<sub>2</sub> por la carbamato cinasa a través del mismo mecanismo que en la ruta de la arginina desiminasa. El rendimiento neto de amonio y ATP es el mismo que el de la ruta de la arginina desiminasa pero con dos intermediarios diferentes (agmatina y N-carbamoil putrescina) y un subproducto diferente (putrescina). La

putrescina es un subproducto de mayor valor que la ornitina o la arginina y se puede utilizar como materia prima para la producción de una variedad de polímeros, incluidos el nailon-4,6 (Qian *et al.* 2009, *Biotechnol. Bioeng.* 104, págs. 651-662) y el poliuretano.

5 La bacteria puede modificarse para sobreexpresar uno o más genes endógenos, expresar uno o más genes endógenos mutados o expresar de manera heteróloga uno o más genes exógenos, codificar enzimas seleccionadas del grupo que consiste en ornitina racemasa, ornitina aminomutasa, subunidad  $\beta$  (OraE), ornitina aminomutasa, subunidad  $\alpha$  (OraS), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa, 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa, 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa, subunidad  $\beta$ , 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa, subunidad  $\alpha$  y variantes funcionalmente equivalentes de las mismas. De manera alternativa, la bacteria se puede modificar para expresar uno o más genes exógenos seleccionados del grupo que consiste en ornitina racemasa, ornitina aminomutasa, subunidad  $\beta$  (OraE), ornitina aminomutasa, subunidad  $\alpha$  (OraS), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa, 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa, 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa, subunidad  $\beta$  y 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa, subunidad  $\alpha$ . Los genes endógenos pueden proceder de *Clostridium sticklandii* (Figura 23). Sin el deseo de limitarse a teorías alguna, los inventores consideran que la sobreexpresión de estos genes dará como resultado un mayor rendimiento en la ruta de la arginina desiminasa, particularmente cuando se observa acumulación de ornitina en la cepa original. De manera alternativa, se considera que la bacteria puede adaptarse y evolucionar para utilizar la ornitina de manera más eficaz. La bacteria puede seleccionarse para crecer en arginina. La bacteria puede comprender una o más modificaciones genéticas que interrumpen un transportador de arginina:ornitina. La modificación genética puede interrumpir la expresión de CAETHG\_3023 y CAETHG\_3024 (Genbank GeneID: 17336441 y 17336442; Número de registro de proteínas Genbank: YP\_008700482.1 y YP\_008700483.1). Preferentemente, la modificación genética es una mutación de inactivación del gen. La inactivación del transportador de arginina:ornitina da como resultado una disminución de la exportación de ornitina desde la célula bacteriana y permite el metabolismo de la ornitina por parte de la célula. De manera adicional, la bacteria se puede modificar para expresar un transportador de arginina alternativo para importar arginina sin exportar ornitina. De manera alternativa, la bacteria se puede modificar para expresar un importador de ornitina para permitir la recuperación de la ornitina excretada. Cada uno de estos enfoques aumentará la capacidad de la bacteria para metabolizar ornitina.

El ejemplo 1 muestra la producción de alanina a partir de arginina mediante *C. autoethanogenum*. Se divulga un método para la producción de uno o más productos procedentes de alanina, incluyendo los productos procedentes de alanina 3-hidroxiopropionato (3-HP) o ácido acrílico. El ácido acrílico es un producto importante con usos en floculantes poliméricos, dispersantes, recubrimientos, pinturas, adhesivos y aglutinantes para cuero, papel y textil con una demanda global estimada de 5 millones de toneladas en 2014. El 3-HP es una plataforma para ácido acrílico, ácido metilacrílico, acrilamida o 1,3-propanodiol.

Se divulga una bacteria fijadora de C1 genomanipulada que comprende al menos una enzima heteróloga seleccionada del grupo que consiste en: enzimas para convertir alanina en malonil-semialdehído y 3-HP, enzimas para convertir alanina en alanil-CoA, enzimas para convertir 3-HP en acrilil-CoA, enzimas para convertir alanil-CoA en acrilil-CoA y enzimas para convertir acrilil-CoA en acrilato.

El microorganismo fijador de C1 puede ser un microorganismo carboxidotrófico acetogénico. Los ejemplos de microorganismos fijadores de C1 adecuados incluyen *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, o *Butyribacterium*. El microorganismo puede seleccionarse del grupo de microorganismos identificados en la tabla 5.

## Ejemplos

El ejemplo 4 ilustra adicionalmente la invención pero, por supuesto, no debe interpretarse como una limitación de su alcance de ninguna manera.

Tabla 1: Medios PETC-MES sin extracto de levadura

Componente	Cantidad por 1 l de medio
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES)	20 g
Acetato de sodio	0,1 g
Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Ácido nitrilotriacético	0,05 g
Resazurina (2 g/l de solución madre)	0,5 ml
Solución de oligoelementos metálicos (véase más abajo)	10 ml
Solución vitamínica de Wolfe (véase más abajo)	10 ml
Solución 1 de agente reductor (véase más abajo)	5 ml

(continuación)

Componente	Cantidad por 1 l de medio
Solución 2 de agente reductor (véase más abajo)	5 ml
pH 5,6	Ajustado con NaOH 4 N
<b>Solución de oligoelementos metálicos</b>	<b>por 1000 ml de solución madre</b>
Ácido nitrilotriacético	2 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1 g
Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O	0,56 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02 g
pH 7,6	Ajustado con KOH 5 M
<b>Solución vitamínica de Wolfe</b>	<b>por 1000 ml de solución madre</b>
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Clorhidrato de piridoxina	10 mg
Tiamina.HCl	5 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-(+)-pantotenato de calcio	5 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	0,1 mg
Ácido 4-aminobenzoico	5 mg
Ácido tióctico	5 mg
<b>Agente reductor 1 (anaeróbico de almacenamiento, oscuro)</b>	<b>por 100 ml de solución madre</b>
L-cisteína-HCl	4 g
<b>Agente reductor 2 (anaeróbico de almacenamiento, oscuro)</b>	<b>por 100 ml de solución madre</b>
NaOH	0,9 g (disolver primero)
L-cisteína-HCl	4 g (disolver después de NaOH)
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	4 g (disolver después de la cisteína)

Tabla 2: Formulaciones de aminoácidos con concentraciones finales en g/l

Aminoácido	20AA	8AA	14AA	12AA	4AA	Arginina
Triptófano	0,004		0,017			
Tirosina	0,069					
Treonina	0,022	0,088	0,088	0,176		
Valina	0,062	0,246	0,246	0,246		
Prolina	0,024					
Alanina	0,029					
Arginina	0,011	0,044	0,044	0,881	0,881	5,000
Ácido aspártico	0,010	0,076	0,076	0,761	0,761	
Asparagina	0,009					
Cisteína	0,067		0,453	0,905		
Histidina	0,011	0,042	0,042	0,849	0,849	
Isoleucina	0,026		0,105	0,105		
Ácido glutámico	0,009	0,034	0,034	0,690	0,690	
Glutamina	0,009		0,035			
Glicina	0,033					

## 5 Ejemplo 1

**Identificación de aminoácidos preferidos de acetógeno *C. autoethanogenum* y crecimiento mejorado con complementos de arginina**

- 10 Este ejemplo demuestra que la arginina, la histidina, el aspartato y el glutamato son claramente preferidos sobre otros aminoácidos y se consumen en rendimientos >80 veces más elevados que los necesarios para la síntesis de biomasa por el acetógeno DSM10061 de *C. autoethanogenum* y la complementación de arginina en un medio definido permite a *C. autoethanogenum* crecer con un tD~3 h, que es ~3 veces más rápido en comparación con la complementación con extracto de levadura (YE, del inglés "yeast extract").

15

DSM10061 de *Clostridium autoethanogenum* se obtuvo de DSMZ (The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, InhoffenstraBe 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania).

El medio PETC-MES sin YE se complementó con varias formulaciones de aminoácidos: 20AA, 7AA, 8AA, 14AA, 12AA, 4AA y Arginina (Tabla 2), para identificar si algún aminoácido está apoyando el crecimiento. Las soluciones se esterilizaron por filtración y se hicieron anóxicas rociando N<sub>2</sub>.

Primero, se diseñó un medio de 20AA basado en la composición de aminoácidos de la biomasa de *Clostridium acetobutylicum* (Lee *et al.* 2008) con concentraciones finales de aminoácidos que apoyan teóricamente la producción de 1 g PCS/l de biomasa.

Los estudios de crecimiento se llevaron a cabo en cultivos discontinuos en un volumen de 50 ml de medio en botellas de suero de 125 ml con nitrógeno en el espacio libre superior con agitación (a menos que se indique otra cosa) a 37 °C. La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm con una lectura de ~0,5 fuera de la cámara anaeróbica frente a un medio completamente oxidado como referencia.

Ácidos orgánicos, fructosa y aminoácidos analizados mediante HPLC. Análisis Los ácidos orgánicos, hidratos de carbono y alcoholes se cuantificaron mediante cromatografía de exclusión iónica con un sistema de HPLC Agilent 1200 y una columna Agilent Hiplax H (300 × 7,7 mm, PL1170-6830) con precolumna (SecurityGuard Carbo-H, Phenomenex PN: AJO-4490). En general, se controlaron los azúcares y los alcoholes con un detector de índice de refracción (Agilent RID, G1362A) ajustado en polaridad positiva y temperatura de la unidad óptica de 40 °C, mientras que los ácidos orgánicos se controlan a 210 nm (Agilent MWD, G1365B) y/o con un detector de índice de refracción. Se inyectaron 30 µl de muestra en la columna usando un inyector automático (Agilent HiPALS, G1367B) y la temperatura de la columna se mantuvo a 65 °C usando un compartimiento de columna termostatzado (Agilent TCC, G1316A). Los analitos se eluyeron de manera isocrática con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mM a 0,6 ml/min durante 26 min. La fructosa, la sacarosa y la glucosa se analizaron por separado a una temperatura de columna de 15 °C y utilizando agua de alta pureza (18,2 MΩ·cm) como fase móvil y se eluyeron de manera isocrática a 0,4 ml/min durante 21 min. Los cromatogramas se integraron usando ChemStation (Dietmair S., Timmins N. E., Gray P. P., Nielsen L. K., Kromer J. O.: Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Analytical biochemistry* 2010, 404:155-164). Los aminoácidos se midieron y cuantificaron como se describe anteriormente (R. B. McQualter, C. Bellasio, L. K. Gebbie, L. A. Petrasovits, R. W. Palfreyman, M. P. Hodson, M. R. Plan, D. M. Blackman, S. M. Brumbley y L. K. Nielsen, *Plant Biotechnol. J.*, 2015).

Aunque la DO máxima alcanzada en el medio de 20AA fue ligeramente inferior (~20 %) que en el extracto de levadura, se observó un crecimiento igualmente rápido (tiempo de duplicación tD = ~9 h; tasa de crecimiento  $\mu = 0,077$ ) al inicio del muestreo (Figura 1).

El análisis de AA mostró de manera sorprendente una utilización preferida y rápida de los AA aspartato, glutamato, serina, histidina y treonina (Figura 2). La arginina se agotó rápidamente de los medios. Más importante aún, la serina y la treonina se consumieron en >6 veces y el aspartato, el glutamato, la histidina y la arginina >20 veces más que los rendimientos necesarios para la producción de biomasa, lo que indica su utilización para fines distintos de la incorporación a la biomasa. De manera destacable, la acumulación de alanina, en lugar de su consumo, se observó en ambos medios durante el crecimiento. Basándose en estos resultados, se diseñaron medios posteriores con concentraciones 2 y 4 veces superiores para obtener un medio más mínimo, un crecimiento más rápido y una mayor DO: el medio de 14AA mediante la omisión de seis AA que no se consumían en absoluto o se consumían lentamente y el medio de 8AA mediante la reducción aún más de los aminoácidos.

En medio de 14AA con concentraciones de AA 4× aumentadas, se logró una DO máxima más elevada en comparación con el crecimiento en el extracto de levadura (Figura 3). Cabe destacar que, la DO máxima alcanzada en el medio de 8AA coincidió con la del medio de 20AA, lo que demuestra que una formulación de AA más mínima puede soportar un buen crecimiento. El aumento de las concentraciones de AA tuvo un efecto positivo en el tiempo de duplicación: se logró un crecimiento más rápido e igualmente rápido en medios de 14AA y 8AA, respectivamente, en comparación con el extracto de levadura y el medio de 20AA (Figura 4).

El análisis de AA confirmó los hallazgos anteriores y destacó aún más la importancia de los AA aspartato, glutamato, histidina y arginina (Figura 5 y figura 6). De manera destacable, la arginina fue el aminoácido más preferido ya que ya estaba agotado en la DO = 0,24. Entre los otros AA, la serina y la treonina se utilizaron más rápido. De nuevo, se observó una acumulación significativa de alanina en ambos medios. De manera interesante, también se produjo ornitina. El aspartato, el glutamato, la histidina y la arginina se consumieron en rendimientos >10 veces más a los necesarios para la producción de biomasa, lo que indica su uso para la generación de energía.

Basándose en estos resultados, se diseñaron dos medios posteriores para obtener un crecimiento más rápido: un medio de 12AA que omitía la glutamina y el triptófano del medio de 14AA y aumentaba las concentraciones de serina, treonina y cisteína 8 veces y un medio que consiste solo en los 4 AA identificados aspartato, glutamato, histidina y arginina a 80 veces en comparación con el medio de 20AA (2 y 20 veces en comparación con el medio de 14AA); el medio de 4AA que contiene solo los "4 AA top" aspartato, glutamato, histidina y arginina a concentraciones

80 veces superiores en comparación con el medio de 20AA.

El diseño del medio de 4AA admitió una DO máxima más elevada que la del medio de 12AA y coincidió con la DO máxima obtenida en el extracto de levadura y el medio de 20AA (Figura 7). Tanto en medios de 4AA como de 12AA, se midió el crecimiento rápido - tD~2,5 h - hasta una DO ~0,3, después de lo cual el crecimiento se desaceleró. Es importante tener en cuenta que el tD ~2,5 h logrado es ~4 veces más rápido en comparación con la complementación con 1 g/l de extracto de levadura como se utiliza comúnmente.

El rápido crecimiento inicial seguido de una desaceleración puede explicarse por el agotamiento de la arginina. A partir de los datos de análisis de AA del medio de 12AA, se puede ver que la arginina es el AA preferido y se agotó por completo en la DO = 0,37 (Figura 8). Estos datos también indican que la arginina aumenta fuertemente el crecimiento junto con el glutamato, el aspartato y la histidina al soportar un tD ~2,5 h como se midió entre DO 0,1 y 0,3 mientras que el crecimiento se ralentizó después de que la arginina se agotó entre DO 0,3 y 0,37. Se observó acumulación simultánea de ornitina. Nuevamente se detectó una acumulación significativa de alanina.

La desaceleración del crecimiento después del agotamiento de la arginina también es evidente en el medio de 4AA (Figura 9). Además de ornitina, también se detectó acumulación de citrulina durante el catabolismo de arginina. Además de la acumulación de alanina, por primera vez se acumularon cantidades pequeñas (~0,3 mM) de lisina y valina, mientras que también un máximo desconocido (tiempo de retención de 8,3 min) mostró áreas de máximos crecientes.

Como el rápido crecimiento inicial fue inesperado, solo se podrían utilizar un par de muestras para calcular el tD. Por lo tanto, se conectó un dispositivo de control de biomasa BugLab a una botella de suero en medio de 4AA para controlar de manera continua el aumento de biomasa antes de que se agote la arginina del medio. Este experimento confirmó el rápido crecimiento en 4AA antes del agotamiento de la arginina, ya que se calculó que el tD era ~2 h (Figura 10).

Incluso la complementación con arginina sola dio como resultado un crecimiento muy bueno con una DO máxima igualmente elevada que en medio de 4AA y extracto de levadura. El crecimiento de DSM10061 de *C. autoethanogenum* en medio PETC-MES sin YE con 5 g de arginina/l + 5 g de fructosa/l dio como resultado un crecimiento inicial rápido desde el principio (t<sub>D</sub> aproximado 3 h) seguido de un crecimiento más lento en la segunda etapa después del agotamiento de la arginina (t<sub>D</sub>~40 h) (Figura 11).

Sorprendentemente, durante la fase inicial de rápido crecimiento, se produce poco acetato. La producción de acetato vuelve a estar ligada al crecimiento de la segunda fase de crecimiento más lento (Figura 12).

La figura 13 muestra la rápida utilización de la arginina. Además de la acumulación de alanina, se produjeron cantidades pequeñas (~0,5 mM) de lisina y valina de forma similar al medio de 4AA. El mismo máximo desconocido (tiempo de retención de 8,3 min) observado en el medio de 4AA mostró áreas de máximos crecientes después del agotamiento de la arginina.

Para obtener un valor más preciso del tD en el medio de Arginina, se realizó un experimento BugLab para controlar de manera continua el aumento de biomasa antes de que se agote la arginina. Este experimento confirmó el rápido crecimiento antes de que se agote la arginina, ya que se calculó que el tD era ~3 h (Figura 14). En la figura 15 se muestra un crecimiento más rápido en Arginina en comparación con el extracto de levadura.

### Ejemplo 2

Crecimiento autótrofo mejorado con complementos de arginina

Este ejemplo demuestra una mayor tasa de crecimiento específico y una menor producción de acetato para el acetógeno DSM23693 de *Clostridium autoethanogenum* en crecimiento autótrofo cuando se complementa con arginina.

DSM23693 de *Clostridium autoethanogenum* (un derivado de DSM10061 de *Clostridium autoethanogenum*; patente de EE. UU. 2013/0217096) se obtuvo de DSMZ (The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania).

El crecimiento se llevó a cabo en medio PETC-MES sin extracto de levadura (Tabla 1) usando técnicas anaerobias convencionales (Hungate, Meth Microbiol, 3B: 117-132, 1969; Wolfe, Adv Microb Physiol, 6: 107-146, 1971) y 151,68 kPa (22 psi) de presión del espacio libre superior de la mezcla de gases CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (composición: CO al 50 %, CO<sub>2</sub> al 20 %, H<sub>2</sub> al 2 %, N<sub>2</sub> al 28 %).

Para estudiar el efecto de la complementación con arginina, se añadieron 5 g/l de arginina al medio y se comparó el crecimiento del cultivo y la producción de metabolitos durante el crecimiento autótrofo con el control sin arginina.

Se siguió el crecimiento mediante la medición de la densidad óptica con un espectrofotómetro Thermo Genesys 20. Los metabolitos acetato (ácido acético), etanol, 2,3-butanodiol o ácido láctico se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un LC Agilent con detección del índice de refracción (IR) a 35 °C. Las muestras se prepararon mediante la dilución de 400 µl con 100 µl de solución de ácido 5-sulfosalicílico (1 % p/v en ácido sulfúrico 1 M), seguido de una centrifugación de 3 minutos a 14.000 rpm; el sobrenadante se transfirió a un frasco de vidrio para su análisis. La separación se llevó a cabo con una inyección de 10 µl en una columna Alltech IOA-2000 (150 mm × 6,5 mm × 8 µm) a 0,7 ml/min y 65 °C en condiciones isocráticas, usando una fase móvil de ácido sulfúrico 5 mM.

El experimento se llevó a cabo en dos repeticiones biológicas con cultivos por triplicado (n = 3) para cada condición en un volumen de 40 ml de medio en botellas Schott de 1 l a 37 °C con agitación orbital (120 rpm, agitación orbital). En cada caso, la cepa acetogénica DSM23693 de *C. autoethanogenum* se cultivó previamente en PETC-MES sin extracto de levadura a una DO 600 nm de 0,3 y se utilizó un solo precultivo para la inoculación.

En el primer experimento a las siguientes condiciones: PETC-MES sin extracto de levadura + gas de síntesis a 151,68 kPa (22 psi) (DO600 nm inicial = 0,005) y PETC-MES sin extracto de levadura + gas de síntesis a 151,68 kPa (22 psi) + 5 g de arginina/l (DO600 nm inicial = 0,005).

En la repetición del experimento, también se inoculó un cultivo en medio complementado con arginina pero sin la adición de gas CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (151,68 kPa (22 psi) de N<sub>2</sub> al 100 % como espacio libre superior). Este experimento comprendió las siguientes tres condiciones: PETC-MES sin extracto de levadura + gas de síntesis a 151,68 kPa (22 psi) (DO600 nm inicial = 0,03), PETC-MES sin extracto de levadura + gas de síntesis a 151,68 kPa (22 psi) + 5 g de arginina/l (DO600 nm inicial = 0,003) y PETC-MES sin extracto de levadura + 5 g de arginina/l (DO600 nm inicial = 0,003). Los medios que contenían arginina se inocularon a una densidad inicial más baja que los medios sin arginina para adaptarse a la tasa de crecimiento específica sorprendentemente aumentada con arginina observada en el primer experimento.

En ambos experimentos, los cultivos con arginina crecieron de manera sorprendente rápida (4 duplicaciones en <15 h correspondientes a un tiempo de duplicación de t<sub>D</sub> = 3,5 h y una tasa de crecimiento específica  $\mu = 0,198$ ) hasta una DO600 nm  $\approx 0,8$ , mientras que el crecimiento del control fue mucho más lento, con un tiempo de duplicación t<sub>D</sub> = 7,3 h y una tasa de crecimiento específica  $\mu = 0,095$  (Figuras 16 y 17). La complementación con arginina disminuyó el tiempo de duplicación y aumentó la tasa de crecimiento específico del cultivo durante el crecimiento autótrofo, por lo tanto, en más del 50 %.

Una gráfica transformada logarítmicamente del crecimiento autótrofo de *C. autoethanogenum* demuestra claramente la disminución del tiempo de duplicación de la complementación con arginina (Figura 18). Los tiempos de duplicación calculados son t<sub>D</sub> = 7,3 h  $\pm$  0,2 para crecimiento autótrofo sin complementación con arginina y t<sub>D</sub> = 3,5 h  $\pm$  0,2 con complemento de arginina, una disminución del 52 %.

Con y sin arginina, los cultivos alcanzaron la misma densidad final durante el crecimiento autótrofo, lo que indica que la arginina no se utilizó como fuente de carbono sino que solo sirvió para aumentar la tasa de crecimiento específica (Figuras 16 y 17). Esto también se confirmó en el cultivo donde no se suministró gas, no se observó crecimiento en 48 horas en cultivos complementados con arginina pero sin la mezcla de gases CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (Figura 17). Esto apoya la hipótesis de que la arginina no se utiliza como fuente de carbono en estas condiciones, sino que es el CO/CO<sub>2</sub> el que se utiliza como fuente de carbono y el ATP se suministra por el metabolismo de la arginina.

El crecimiento autótrofo de acetógenos suele estar relacionado con la producción de acetato (ácido acético), a medida que la formación de acetato genera ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato en la reacción de acetato cinasa que es esencial para el crecimiento. Como tal, se encontró que todos los acetógenos aislados hasta la fecha producen acetato. Sin embargo, la formación de acetato no es deseable desde la perspectiva del proceso, ya que desvía el carbono de los productos diana y se sabe que es tóxico para los microorganismos ya en bajas concentraciones de un pequeño porcentaje (J. Ballongue, E. Masion, J. Amine, H. Petitdemange y R. Gay, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1987, 26, 568-573; G. Wang y D. I. Wang, Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 294-8). En el medio de crecimiento complementado con 5 g de arginina/l, sorprendentemente, no se observó producción neta de acetato hasta la pausa en el crecimiento en DO<sub>600 nm</sub>  $\approx 0,8$  solo en esta etapa se produjo acetato (Figura 19). Los resultados de este conjunto de experimentos sugieren que *C. autoethanogenum* puede utilizar arginina para producir ATP para el crecimiento y, por lo tanto, no necesita producir acetato cuando se suministra arginina.

### Ejemplo 3

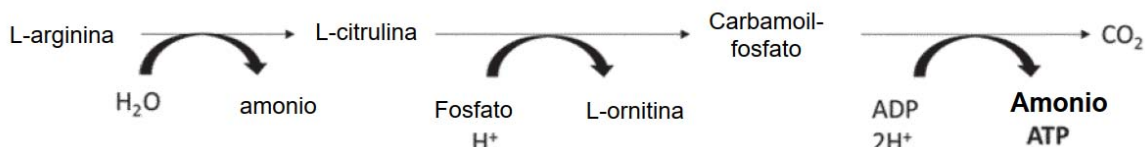
#### Identificación y optimización de las rutas de utilización de arginina

Este ejemplo demuestra cómo la arginina proporciona ATP adicional para la célula y puede alimentar el metabolismo central de los acetógenos.

Como se demuestra en el ejemplo 1, la arginina se convierte de manera estequiométrica en ornitina. También se

observó acumulación de citrulina en algunos puntos temporales. Sin desear quedar ligados a esta teoría, esta observación implica la ruta de la arginina desiminasa como mecanismo.

- 5 Esta ruta convertiría la arginina en ornitina, amonio, ATP y CO<sub>2</sub>. El crecimiento mejorado se facilitaría mediante el suministro de ATP y amonio de la degradación de arginina. Este suministro de ATP también elimina la necesidad de acetógenos para producir acetato.



- 10 La ruta de la arginina desiminasa procede a través de tres etapas enzimáticas, catalizadas por arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (putrescina carbamoiltransferasa) (EC 2.1.3.3) y una carbamato cinasa (EC 2.7.2.2). Se han identificado enzimas respectivas (incluidos dos genes/enzimas transportadores de arginina/ornitina) en el genoma de *C. autoethanogenum*, la ornitina carbamoiltransferasa y la carbamato cinasa están presentes en múltiples copias (Tabla 4). Las enzimas que pueden catalizar las mismas reacciones también
- 15 están presentes en otros organismos, incluidos muchos acetógenos que incluyen *C. ljungdahlii*, *C. scatologenes*, *C. drakei* y *Acetoneuma longum* (Tabla 5). Esta ruta también está presente en *C. stricklandii* o *E. coli*.

Tabla 4: Genes/enzimas identificados de la ruta de la arginina desiminasa en *C. autoethanogenum*

Nombre	Secuencia de nucleótidos (número de registro ID génica de Genbank, marcador Locus)	Secuencia de aminoácidos (número de registro ID proteica de Genbank)
arginina desiminasa	17336439, CAETHG_3021	AGY77224
ornitina carbamoiltransferasa	17336440, CAETHG_3022	AGY77225
	17334022, CAETHG_0591	AGY74820
transportador de arginina/ornitina	17336441, CAETHG_3023	AGY77226
	17336442, CAETHG_3024	AGY77227
carbamato cinasa	17336443, CAETHG_3025	AGY77228
	17333852, CAETHG_0421	AGY74650
	17333876, CAETHG_0445	AGY74674
	17337050, CAETHG_3632	AGY77835
	17335507, CAETHG_2081	AGY76300

- 20 Tabla 5: Genes/enzimas identificados de la ruta de la desiminasa en otros organismos

Arginina desiminasa	
Organismo	Número de registro
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM	ADK13995.1
<i>Clostridium scatologenes</i>	AKA70116.1
<i>Clostridium drakei</i>	WP_032076790.1
<i>Propionispira raffinovorans</i>	WP_026329241.1
<i>Acetoneuma longum</i>	WP_040292494.1
<i>Clostridium perfringens</i>	WP_003479447.1
<i>Clostridium sticklandii</i>	WP_013361144.1
<i>Clostridium cadaveris</i>	WP_051196258.1
<i>Clostridium colicanis</i>	WP_002599585.1
<i>Caldisalibacter kiritimatiensis</i>	WP_006311966.1
<i>Caloranaerobacter azorensis</i>	WP_035161638.1
<i>Halothermothrix orenii</i>	WP_012635610.1
<i>Filifactor alocis</i>	WP_014262361.1
<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	WP_005659654.1
<i>Aminomonas paucivorans</i>	WP_006299755.1
<i>Clostridiisalibacter paucivorans</i>	WP_026893703.1

(continuación)

<i>Thermanaerovibrio velox</i>	WP_006582950.1
<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	WP_012870198.1
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	WP_004823213.1
<i>Borrelia hermsii</i>	WP_038443653.1
<i>Borrelia hermsii</i> YBT	AHH12878.1
<i>Borrelia hermsii</i>	WP_043924507.1
<i>Borrelia hermsii</i> HS1	AAX17338.1
<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	WP_010766746.1
<i>Vagococcus lutrae</i>	WP_023606773.1
<i>Borrelia hermsii</i>	WP_025400143.1
<i>Borrelia parkeri</i>	WP_025375819.1
<i>Brachyspira alvinipulli</i>	WP_028331136.1
<i>Borrelia persica</i>	WP_038363688.1
<i>Borrelia hispanica</i>	WP_038359270.1
<i>Borrelia coriaceae</i>	WP_025408405.1
<i>Borrelia turicatae</i>	WP_011772777.1
<i>Fervidicella metallireducens</i>	WP_035377985.1
<i>Carnobacterium divergens</i>	WP_034570618.1
<i>Borrelia crocidurae</i>	WP_038442698.1
<i>Borrelia duttonii</i>	WP_038366702.1
<i>Borrelia duttonii</i>	WP_012538581.1
<i>Borrelia crocidurae</i>	WP_014696655.1
<i>Thermobrachium celere</i>	WP_018660497.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	WP_048941938.1
<i>Enterococcus faecalis</i> CBRD01	ESU74366.1
<i>Borrelia recurrentis</i>	WP_012539214.1
<i>Caloramator</i> sp. ALD01	WP_027308491.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	WP_002410400.1
<i>Caloramator australicus</i>	WP_008907964.1
<i>Atopobacter phocae</i>	WP_025729241.1
<i>Clostridium sulfidigenes</i>	WP_035132876.1
<i>Borrelia anserina</i>	WP_025419989.1
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	WP_014125833.1
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	WP_010761089.1
<i>Streptococcus marimammalium</i>	WP_018369865.1
<i>Tetragenococcus muriaticus</i>	WP_038024314.1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	WP_029486596.1
<i>Clostridium dakareense</i>	WP_042277345.1
<i>Borrelia miyamotoi</i>	WP_020955199.1
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	WP_014757694.1
<i>Streptococcus parauberis</i>	WP_003104748.1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	WP_010748983.1
<i>Clostridium botulinum</i>	WP_011987187.1
<i>Streptococcus porcinus</i>	WP_003083226.1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	WP_005230691.1
<i>Borrelia miyamotoi</i>	WP_025443390.1
<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>xylanolyticum</i>	WP_013786994.1
<i>Streptococcus ictaluri</i>	WP_007892646.1
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	WP_017413713.1

(continuación)

<i>Clostridium tunisiense</i>	
<b>Ornitina carbamoiltransferasa</b>	
<b>Organismo</b>	<b>Número de registro</b>
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	WP_013239445.1
<i>Propionispira raffinovorans</i>	WP_019552618.1
<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_046066002.1
<i>Acetonema longum</i>	WP_004092025.1
<i>Clostridium senegalense</i>	WP_010298035.1
<i>Clostridium argentino</i>	WP_039635916.1
<i>Clostridium argentino</i>	WP_039634993.1
<i>Candidatus Cloacimonas acidaminovorans</i>	WP_015423864.1
<i>Clostridium senegalense</i>	WP_010293963.1
<i>Clostridium botulinum</i>	WP_041345924.1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	WP_053016198.1
<i>Clostridium tunisiense</i>	WP_017413712.1
<i>Staphylococcus simulans</i>	WP_023016208.1
<i>Clostridium sporogenes</i>	WP_058009868.1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	WP_053030082.1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	WP_012664052.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	WP_049386361.1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	WP_053464819.1
<i>Clostridium drakei</i>	WP_032079337.1
<i>Staphylococcus capitis</i>	WP_002452600.1
<i>Bacillus rubiinfantis</i>	WP_042357582.1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	WP_046100679.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	WP_031891031.1
<i>Lactobacillus rennini</i>	WP_057873389.1
<i>Staphylococcus microti</i>	WP_044360832.1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	WP_000793624.1
<i>Lactobacillus parabrevis</i>	WP_020089358.1
<b>Carbamato cinasa</b>	
<b>Organismo</b>	<b>Número de registro</b>
<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_029954845.1
<i>Clostridium drakei</i>	WP_032079746.1
<i>Clostridium argentino</i>	WP_039633500.1
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	WP_007061333.1
<i>Clostridium drakei</i>	WP_032075357.1
<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_029162276.1
<i>Thermoanaerobacter thermocopriae</i>	WP_028991790.1
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	WP_013149923.1
<i>Thermoanaerobacter italicus</i>	WP_012994659.1
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	WP_022588163.1
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	WP_011024959.1
<i>Acetonema longum</i>	WP_004092029.1
<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i>	WP_006569095.1
proteína hipotética [ <i>Propionispira raffinovorans</i> ]	WP_019552620.1
<i>Thermoanaerobacter thermocopriae</i>	WP_054644772.1
<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i>	WP_014062398.1
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	WP_049684636.1
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	WP_013298601.1

(continuación)

<i>Caldisaliniibacter kiritimatiensis</i>	WP_006311968.1
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	WP_015312281.1
<i>Eubacterium nodatum</i>	WP_034819233.1
<i>Thermanaerovibrio velox</i>	WP_006584132.1
<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	WP_012869022.1
<i>Aminiphilus circumscriptus</i>	WP_026369063.1
<i>Clostridium argentino</i>	WP_039635912.1
<i>Anaerovorax odorimutans</i>	WP_027398659.1
<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>	WP_013787463.1
<i>Clostridium aerotolerans</i>	WP_026892136.1
<i>Fervidicella metallireducens</i>	WP_035377990.1
<i>Clostridium argentino</i>	WP_039636739.1
<i>Clostridium senegalense</i>	WP_010298030.1
<i>Clostridium sphenoides</i>	WP_054791734.1
Taxón oral de la bacteria Clostridiales 876	WP_021654611.1
<i>Clostridium perfringens</i>	WP_025648248.1
<i>Clostridium</i> sp. KNHs214	WP_035294990.1
<i>Clostridium perfringens</i>	WP_003457589.1
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	WP_014759446.1
<i>Clostridium celerecrescens</i>	WP_038281265.1
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	WP_049765320.1
<i>Clostridium botulinum</i>	WP_024932088.1
<i>Clostridium algidicarnis</i>	WP_029453364.1
<i>Clostridium botulinum</i>	WP_012669533.1
<i>Clostridium drakei</i>	WP_032077363.1
<i>Clostridium sticklandii</i>	WP_013361146.1

5 Para aumentar el rendimiento, en particular, si se observa acumulación de productos intermedios como la citrulina, de la ruta, los genes respectivos se den sobreexpresar o los genes de otras fuentes se pueden introducir y expresar de manera heteróloga por un experto en la materia utilizando métodos descritos anteriormente [Documentos US 2013/344547, US 2013/330809, US 2013/323820, US 2013/224838, US 2013/224839, US 2011/256600, US 2011/236941].

10 La propia ornitina se puede convertir además en alanina, que se ha demostrado que se acumula también en el ejemplo 1. Esta conversión también genera equivalentes reductores adicionales NADP(H), así como otra molécula de amoníaco y el bloque de construcción fundamental acetyl-CoA de CoA.

15 Como se muestra en la figura 23, la conversión de ornitina en alanina y acetyl-CoA se realiza a través de etapas enzimáticas ornitina racemasa (EC 5.1.1.12), ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5), 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12) y 2-amino-4-oxopentanoato tiolasa (EC 2.3.1.B10). Las enzimas respectivas se han descrito, por ejemplo, a partir de *Clostridium sticklandii* o se han identificado muestras ambientales y homólogos en *C. autoethanogenum* (Tabla 6).

**Tabla 6: Genes/enzimas identificados de la ruta de conversión de ornitina a alanina y acetyl-CoA de *C. sticklandii* o muestras ambientales y homólogos de *C. autoethanogenum*.**

Nombre	Secuencia de nucleótidos (número de registro ID génica de Genbank, marcador locus)	Secuencia de aminoácidos (número de registro ID proteica de Genbank)
ornitina racemasa	9854830, CLOST 1288	CBH21408
ornitina aminomutasa, subunidad β (OraE)	9854831, CLOST_1290 17333626, CAETHG 0193	CBH21410 AGY74426
ornitina aminomutasa, subunidad α (OraS)	9856217, CLOST_1291	CBH21411
2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa	CU695246	CAQ42978.1

(continuación)

Nombre	Secuencia de nucleótidos (número de registro ID génica de Genbank, marcador locus)	Secuencia de aminoácidos (número de registro ID proteica de Genbank)
2-amino-4-oxopentanoato tiolasa, subunidad $\beta$	CU695248	CAQ42980.1
2-amino-4-oxopentanoato tiolasa, subunidad $\alpha$	CU695247	CAQ42979.1

5 Para aumentar el rendimiento de la ruta, en particular porque se observó acumulación de ornitina, los genes respectivos de *C. autoethanogenum* se pueden sobreexpresar o los genes de *C. sticklandii* o las muestras ambientales de la tabla 6 se pueden introducir y expresar de manera heteróloga por un experto en la materia utilizando los métodos descritos anteriormente (Documentos W2012/053905, WO2012/115527, WO2013/180584). El organismo también puede adaptarse y evolucionar para utilizar la ornitina de manera más eficaz si se adapta para crecer con arginina a lo largo del tiempo.

10 Para lograr el flujo en la ruta, también puede ser necesario inactivar el transportador de arginina:ornitina (CAETHG\_3023-24) para evitar que la ornitina se exporte fuera de la célula. Dichas inactivaciones se pueden lograr por alguien experto en la materia utilizando los métodos descritos anteriormente (Documentos W2012/053905, WO2012/115527, y WO2013/180584). Además, puede ser necesario añadir un transportador de arginina alternativo. Un enfoque alternativo para inactivar el transportador de arginina:ornitina podría ser introducir un importador de  
15 ornitina, para que la ornitina se pueda metabolizar aún más.

Las rutas identificadas también se simularon en una reconstrucción del modelo a escala del genoma para mostrar el efecto del metabolismo y confirmar las rutas identificadas.

20 Una reconstrucción metabólica a escala del genoma para *C. autoethanogenum* se generó en base a métodos publicados (L.-E. Quek y L. K. Nielsen, *Genome Inform.*, 2008, 21, 89-100; C. G. de Oliveira Dal'Molin, L.-E. Quek, R. W. Palfreyman, S. M. Brumbley y L. K. Nielsen, *Plant Physiol.*, 2010, 152, 579-89; C. Licon-Cassani, E. Marcellin, L.-E. Quek, S. Jacob y L. K. Nielsen, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 102, 493-502.). El núcleo del modelo a escala del genoma se reconstruyó utilizando la línea de anotación del modelo SEED (C. S. Henry, M. DeJongh, A. A. Best, P. M. Frybarger, B. Linsay y R. L. Stevens, *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28, 977-82). La reconstrucción retuvo todos los atributos de reacción del modelo SEED, incluidas las reacciones únicas, los  
25 identificadores de compuestos y la reversibilidad de las reacciones. El modelo se completó de manera manual en Excel (Microsoft Corporation) para facilitar la anotación y el comentario, en particular, se seleccionaron de manera manual el metabolismo central y las rutas de utilización de arginina identificadas anteriormente. A partir de esta base de datos centrada en genes, se generó una representación SBML (System Biology Markup Language, <http://www.sbml.org>) centrada en la reacción 2D utilizando una aplicación Java (Oracle Corporation). El análisis y la reconstrucción basada en restricciones se realizaron con la caja de herramientas COBRA (<http://opencobra.sourceforge.net/>) (J. Schellenberger, R. Que, R. M. T. Fleming, I. Thiele, J. D. Orth, A. M. Feist, D. C. Zielinski, A. Bordbar, N. E. Lewis, S. Rahmanian, J. Kang, D. R. Hyduke y B. Ø. Palsson, *Nat. Protoc.*, 2011, 6,  
30 1290-307). Un conjunto de *scripts* para el modelado basado en restricciones que se ejecutan dentro del entorno MATLAB. Se utilizó un análisis de balance de flujo (Orth *et al.*, 2010) para predecir los nutrientes esenciales para el crecimiento y se realizó un análisis de precio sombra para investigar los efectos beneficiosos de los aminoácidos (AA) en *Clostridium autoethanogenum*, y determinar qué AA tienen el mayor impacto en la producción de ATP. El análisis de balance de flujo (FBA, del inglés "Flux balance analysis") se ha utilizado para predecir los nutrientes  
35 esenciales para el crecimiento (Fan *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2008), los efectos de la complementación con AA en la síntesis del producto diana (Licon-Cassani *et al.*, 2012) y junto con el análisis de precios sombra (Hillier y Lieberman, 2010) para determinar los sustratos que tienen el mayor efecto en la producción de ATP (Teusink *et al.*, 2006).

45 El análisis de precios sombra convencional puede ser engañoso con los AA. Si el análisis del precio sombra se realiza en condiciones autotróficas (es decir, con una absorción cero), mostrará el coste de oportunidad de la síntesis de AA, es decir, los recursos que podrían liberarse si un AA determinado fuera suministrado por el medio. El AA más caro de sintetizar no es necesariamente el mejor sustrato para la producción de ATP. Por ejemplo, puede que no haya una ruta de degradación disponible.

50 Para superar este problema, se realizó un análisis de precio sombra compensado. A cada uno de los 20 AA se le permitió un flujo máximo de 1,4 mmol/g PCS/h mientras se maximizaba el rendimiento de biomasa. Este flujo es la máxima tasa específica de absorción de fructosa observada de DSM10061 de *C. autoethanogenum* durante experimentos preliminares de crecimiento en medio PETC-MES convencional (incluido el extracto de levadura (YE)) y fructosa. Los AA sin ruta de degradación no pueden utilizar el flujo máximo permitido y, por lo tanto, tendrán un  
55 precio sombra cero. El análisis de precios sombra identificó nueve AA: glutamina, histidina (HIS), cisteína (CYS), treonina, aspartato (ASP), arginina (ARG), glicina, serina y glutamato (GLU), de los 20 convencionales que *C. autoethanogenum* debería preferir, ya que conducen a un crecimiento más rápido.

La predicción del modelo de AA se confirmó en un medio de 20AA para ocho de los nueve AA previstos (Figura 2), excluyendo solo la glicina. De manera destacable, la absorción de ASP, GLU, HIS y ARG por biomasa fue más de 20 veces mayor que lo necesario para la síntesis de biomasa. La absorción de AA por gramo de biomasa se comparó con la concentración esperada en la biomasa (el requisito celular), en base a las medidas tomadas en *Clostridium acetobutylicum* (Lee *et al.*, 2008).

Sorprendentemente, en otro medio de 12AA diseñado, se encontró que la absorción de ASP, GLU, HIS y ARG eran más de 120 veces superior a lo necesario para la síntesis de biomasa y permitía un crecimiento significativamente más rápido. Esto indica la posible participación de ASP, GLU, HIS y ARG en generación de energía. De manera interesante, junto con el consumo de arginina durante la fase de rápido crecimiento, se detectó una acumulación de ornitina (Figura 8), lo que apunta hacia la posible participación de la ruta de la arginina desiminasa (ADI) en el suministro de ATP adicional a las células. Hay que destacar que el crecimiento rápido observado inicialmente ( $t_D = 2,5 \pm 0,1$  h) está muy cerca del crecimiento previsto con 20 AA ( $t_D = 2,9$  h).

De manera interesante, se observó una producción de acetato por biomasa sustancialmente menor en medios que contenían ASP, GLU, HIS y ARG (medio 4AA) ( $8,2 \pm 0,2$  mmol/g PCS) y medio que contiene solo arginina (medio ARG) ( $6,7 \pm 0,7$  mmol/g PCS) durante el crecimiento cuando la arginina era abundante en comparación con YE ( $36,6$  mmol/g PCS). La producción de acetato aumentó considerablemente después del agotamiento de la arginina ( $46,5 \pm 11,2$  y  $34,5 \pm 9,3$  mmol/g PCS para el medio de 4AA y el medio de ARG, respectivamente), lo que demuestra que la posibilidad de catabolizar la arginina reduce considerablemente la necesidad de un acetógeno para producir acetato.

Los cultivos heterótrofos de *C. autoethanogenum* cultivados en medio de 12AA acumularon ornitina de manera simultánea con el consumo de arginina (Figura 8). Lo mismo se observó en experimentos de biorreactores con medio de 4AA y medio de arginina solamente con una fracción elevada (aproximadamente un 60 %) del carbono consumido excretado como ornitina (Figura 22). Además, se detectó un flujo de carbono significativo a  $CO_2$  y también una acumulación notable de citrulina. Otros subproductos menores incluyeron acetato, alanina y etanol. En conjunto, los flujos de carbono significativos a ornitina,  $CO_2$  y citrulina sugieren que la arginina se catabolizó a través de la ruta de ADI, lo que explica su efecto potenciador del crecimiento a través del suministro de ATP (Figura 21). Además, la conversión estequiométrica completa de arginina en ornitina,  $CO_2$  y la citrulina implica que la arginina se metabolizaba estrictamente para generar energía y no para sintetizar biomasa. Esto es coherente con el resultado de que no se observó crecimiento cuando solo se complementó con arginina a las botellas Schott que contenían PETC-MES sin YE presurizadas con gas  $N_2$ .

La implicación de la ruta de ADI para facilitar un crecimiento más rápido fue prevista por las simulaciones iniciales *in silico* en medio de 4AA y arginina solamente. La tasa de producción específica total de ATP ( $q_{atp}$ ; mmol ATP/g PCS/h) fue aproximadamente 6 veces superior en las últimas condiciones (SIM 4 y 5) en comparación con los cálculos con fructosa (SIM 1) como única fuente de carbono (Tabla 7). Lo mismo se observó cuando el modelo se restringió con tasas de absorción de sustrato y secreción de producto determinadas experimentalmente (excluyendo citrulina y  $CO_2$ ) de los experimentos del biorreactor en medios de 4AA (SIM 6 y 9) y solo con arginina (SIM 12 y 15), con una  $q_{atp}$  aproximadamente 3 a 4 veces superior de lo previsto únicamente en la fructosa. El crecimiento más rápido observado ( $t_D \sim 3$  a 4 h) con AA en comparación con el crecimiento previsto sin la complementación con AA ( $t_D \sim 14$  h) puede explicarse por una producción de energía significativamente mayor a partir de la fosforilación a nivel de sustrato durante el catabolismo de la arginina (por la carbamato cinasa de la ruta de ADI) e indirectamente a través de la generación de una fuerza motriz de protones por la producción y excreción de  $NH_4^+$ . Esto último también es beneficioso para disminuir los costes del bioproceso por la menor necesidad de neutralizar el pH con la adición de  $NH_4OH$ .

**Tabla 7: Simulaciones de modelos para predecir la tasa de crecimiento específica, las tasas de producción de ATP y los productos durante el crecimiento heterótrofo con y sin complementos de arginina:**

	SIM 1	SIM 4	SIM 5	SIM 6	SIM 7	SIM 9	SIM 10	SIM 12	SIM 13	SIM 15	SIM 16
<b>Tasa de absorción de sustrato específico (mmol/g PCS/h)</b>											
Fructosa	1,40	1,40	1,40	1,99	1,99	1,48	1,48	1,43	1,43	1,40	1,40
Aspartato	0,00	1,40	0,00	0,76	0,76	0,85	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00
Histidina	0,00	1,40	0,00	0,13	0,13	0,41	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
Glutamato	0,00	1,40	0,00	0,63	0,63	0,63	0,63	0,39	0,39	0,00	0,00
Cisteína	0,00	1,40	1,40	3,95	3,95	2,09	2,09	1,30	1,30	1,06	1,06
Arginina	0,00	10,00	10,00	19,11	19,11	13,10	13,10	10,22	10,22	11,99	11,99
<b>Tasa de excreción específica del producto (mmol/g PCS/h)</b>											
Acetato	3,15	35,97	28,15	2,03	55,01	1,97	37,78	1,38	28,47	1,14	31,77
Etanol	0,00	0,00	0,00	0,89	0,00	0,82	0,00	0,97	0,00	0,65	0,00
Dióxido de carbono	0,11	9,06	5,38	22,51	13,75	15,58	9,82	11,45	6,56	12,48	7,16
Ornitina	0,00	0,00	0,00	19,10	0,00	12,71	0,00	9,49	0,00	11,02	0,00
Alanina	0,00	0,00	0,00	0,89	0,00	0,71	0,00	0,66	0,00	0,69	0,00
Lactato	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Citrulina	0,00	0,00	0,00	1,05	0,00	0,81	0,00	0,45	0,00	0,46	0,00
2,3-butanodiol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-oxobutarato	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00	0,27	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
Formamida	0,00	1,38	0,00	0,11	0,09	0,39	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
Tasa de crecimiento específica (h <sup>-1</sup> )	0,05	0,28	0,17	0,25	0,54	0,24	0,43	0,19	0,31	0,19	0,32
<b>Tasa de producción de ATP específico total (mmol/g PCS/h)</b>	<b>6,80</b>	<b>45,57</b>	<b>38,55</b>	<b>34,81</b>	<b>72,08</b>	<b>23,82</b>	<b>49,11</b>	<b>18,92</b>	<b>37,70</b>	<b>20,83</b>	<b>42,40</b>

El rápido crecimiento y la baja síntesis de acetato lograda a través de la complementación con arginina es relevante para la industria biotecnológica, ya que la disminución del flujo de carbono al subproducto no deseado acetato y la producción de ATP adicional a partir de rutas alternativas es esencial para expandir el espectro de productos de acetógenos.

5 Los modelos a escala del genoma se pueden utilizar para estimar los patrones de flujo metabólico intracelular y calcular los balances de carbono, redox y energía mediante la restricción del modelo con datos medidos de manera experimental (Bordbar *et al.*, 2014; Dash *et al.*, 2016; O'Brien *et al.*, 2015). Se utilizó un modelo metabólico a escala de genoma de *C. autoethanogenum* similar al descrito por Marcellin (Low carbon fuels and commodity chemicals from waste gases - Systematic approach to understand energy metabolism in a model acetogen, Green Chem, 2016). El análisis del modelo a escala de genoma se realiza para los experimentos heterótrofos en medio de AA y medio solo de arginina mediante la realización de cálculos de análisis de balance de flujo como se describe anteriormente. El modelo se limitó adicionalmente con la absorción de sustrato específico y las tasas de secreción del producto (que excluye citrulina y CO<sub>2</sub>) y el tD celular. La maximización de la disipación de ATP (es decir, los costes de ATP no contabilizados; véase a continuación) se utilizó como la función diana para realizar FBA (aquí no se incluyeron costes de energía de mantenimiento).

El crecimiento rápido en medio de 4AA y medio de ARG se facilitó por la  $q_{ATP}$  aproximadamente 3 a 4 veces superior (29,3 ± 5,5 y 19,9 ± 1,0 mmol ATP/g PCS/h para medio de 4AA y medio de ARG, respectivamente; (SIM 6 y 9, y SIM 12 y 15 en la tabla 7) en comparación con el valor de 6,8 mmol ATP/g PCS/h previsto para el crecimiento únicamente con fructosa (SIM 1). Los inventores consideran que el crecimiento más rápido observado en el medio de 4AA en comparación con el medio ARG se explica por el flujo específico 2 veces superior a través de la reacción de la acetato cinasa productora de ATP (Figura 24). Sin embargo, en ambos medios se produjo ~53 % de ATP a través de la ruta de ADI (Figura 24) que muestra que el catabolismo de la arginina reorganizó completamente el metabolismo energético. De manera interesante, aunque el consumo de arginina se ve favorecido en muchas bacterias (Abdelal, 1979; Adamberg *et al.*, 2006; Lahtvee *et al.*, 2011; Mehmeti *et al.*, 2011), su contribución a la producción de energía es variable.

También se analizó el patrón de flujo óptimo previsto durante el crecimiento heterótrofo en fructosa y AA. Cuando se restringe el modelo con las tasas de absorción de sustrato medidas de manera experimental y los costes de ATP no contabilizados calculados previamente, y se maximiza el rendimiento de biomasa, estos cálculos predijeron un crecimiento más rápido (medio de 4AA  $t_D = 1,4 \pm 0,2$  h, SIM 7 y 10; medio de ARG  $t_D = 2,2 \pm 0,1$  h, SIM 13 y 16) en comparación con lo observado de manera experimental ( $t_D = 2,8 \pm 0,1$  h y  $t_D = 3,7 \pm 0,0$  h, respectivamente). Además, en las simulaciones, la ornitina producida durante el catabolismo de la arginina se catabolizó a GLU, lo que demuestra que es posible metabolizar aún más la ornitina a través de la ruta de la ornitina descrita anteriormente. Por lo tanto, el crecimiento más rápido previsto proviene del catabolismo de GLU a piruvato utilizando la ruta del metilaspártato (como se señaló anteriormente) y su posterior conversión a acetyl-CoA y acetato que producen Fd y ATP reducidos.

#### 40 Ejemplo 4

##### **Crecimiento en arginina como única fuente de nitrógeno**

Este ejemplo demuestra la sustitución del amonio como fuente de nitrógeno por arginina.

45 El nitrógeno es un nutriente esencial para las bacterias y, por lo general, el amonio se utiliza en fermentaciones y también se utiliza como fuente de nitrógeno en formulaciones de medios publicadas para acetógenos (M. Köpke, C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Wollherr, A. Ehrenreich, W. Liebl, G. Gottschalk y P. Dürre, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A., 2010, 107, 13087-92; J. Mock, Y. Zheng, A. P. Mueller, S. Ly, L. Tran, S. Segovia, S. Nagaraju, M. Köpke, P. Dürre y R. K. Thauer, J. Bacteriol., 2015, 197, 2965-2980; H. Richter, M. E. Martin y L. T. Angenent, Energies, 2013, 6, 3987-4000; J. L. Cotter, M. S. Chinn y A. M. Grunden, Bioprocess Biosyst. Eng., 2009, 32, 369-80. M. Straub, M. Demler, D. Weuster-Botz y P. Dürre, J. Biotechnol., 2014.). Sin embargo, la producción de amonio depende de abundantes suministros de energía, predominantemente gas natural o gases licuados de petróleo (GLP) a través del proceso Haber-Bosch ([www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/ammoinia.html](http://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/ammoinia.html)) y, por lo tanto, no es una fuente sostenible. Además, los iones de amonio influyen en el pH de la fermentación.

La ruta identificada del ejemplo 3 permite la conversión de 1 mol de arginina en 3 moles de amoníaco. Por lo tanto, la arginina puede proporcionar una fuente alternativa de nitrógeno para las bacterias, lo que aporta amoníaco directamente en el metabolismo, sin dejar de proporcionar las ventajas descritas anteriormente. Dado que 1 molécula de arginina se puede descomponer en 3 moléculas de amoníaco, las cantidades más bajas necesarias conducen a ahorros significativos debido al precio más bajo de la arginina (la arginina de grado alimenticio al 99 % cuesta alrededor de 17 a 18.000 USD/1000 kg, mientras que el amoníaco de grado industrial al 30 % cuesta ~10 a 11.000 USD/1000 kg de Sigma Aldrich o Fisher) y a la manipulación reducida. Además, la arginina se puede obtener de forma sostenible a partir de fuentes biológicas, por ejemplo, mediante fermentación (T. Utagawa, J. Nutr., 2004, 134, 2854S-2857).

Para demostrar que la arginina se puede utilizar como única fuente de nitrógeno para el acetógeno DSM23693 *Clostridium autoethanogenum*, el organismo se cultiva en medio PETC-MES libre de YE que omite 1 g/l de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) con 0,33 g/l de monoclóhidrato de L-arginina no sintético (Sigma Aldrich; A6969).

5 *Ejemplo 5*

**La complementación con arginina conduce a una mayor producción de productos no naturales a partir de rutas heterólogas, en particular, rutas de consumo de ATP**

10 Este ejemplo demuestra que la complementación con arginina aumenta la producción de productos no naturales de rutas heterólogas.

Se ha demostrado la producción de varios productos no naturales en acetógenos a partir de gas [Documentos W2012053905, WO2012115527, WO2013180584, WO2013185123, WO2013191567]. Por lo general, se observa algún nivel de acetato como subproducto, a medida que el organismo genera ATP a partir de la fosforilación a nivel de sustrato a través de la reacción de acetato cinasa. Este es, en particular, el caso de las rutas que requieren ATP como, por ejemplo, pero sin limitarse a, las rutas de producción de isopreno u otros terpenoides (ruta del mevalonato), o la producción de productos procedentes de ácidos grasos como el biodiésel (a través de la biosíntesis de ácidos grasos). Sin embargo, también es el caso de otras rutas de fermentación que no requieren directamente ATP pero tampoco producen la misma cantidad de ATP por acetyl-CoA que la formación de acetato, por ejemplo, pero sin limitación, la producción de isopropanol, acetona, butanol (a través de la ruta ABE).

La producción de isopropanol a partir de gas se simuló utilizando el análisis de balance de flujo (FBA) con el modelo a escala de genoma de *C. autoethanogenum* (descrito en el ejemplo 3). Se añadieron rutas heterólogas (tabla 4) al modelo y se realizaron simulaciones sobre el rendimiento teórico máximo con y sin complementación con arginina (tabla 5).

Tabla 8: Rutas heterólogas

<b>Ruta del mevalonato e isopreno sintasa</b>	
<b>nombre</b>	<b>ecuación</b>
tiolasa	2 Acetilo=CoA <=> CoA + Acetoacetilo=CoA
3-HMG-CoA sintasa	(S)=3=Hidroxi=3=metilglutaril=CoA + CoA <=> Acetilo=CoA + Acetoacetilo=CoA
3-HMG-CoA reductasa (NADH)	(R)=Mevalonato + CoA + 2 NAD+ <=> (S)=3=Hidroxi=3=metilglutaril=CoA + 2 NADH
3-HMG-CoA reductasa reductasa (NADPH)	(R)=Mevalonato + CoA + 2 NADP+ <=> (S)=3=Hidroxi=3=metilglutaril=CoA + 2 NADPH
Mevalonato cinasa (ATP)	ATP + (R)=Mevalonato => ADP + (R)=5=Fosfomevalonato
Mevalonato cinasa (CTP)	CTP + (R)=Mevalonato => CDP + (R)=5=Fosfomevalonato
Mevalonato cinasa (GTP)	GTP + (R)=Mevalonato => GDP + (R)=5=Fosfomevalonato
Mevalonato cinasa (UTP)	UTP + (R)=Mevalonato => UDP + (R)=5=Fosfomevalonato
Fosfomevalonato cinasa	ATP + (R)=5=Fosfomevalonato => ADP + (R)=5=Difosfomevalonato
Difosfomevalonato descarboxilasa	ATP + (R)=5=Difosfomevalonato => ADP + Ortofosfato + Isopentenil_difosfato + CO <sub>2</sub>
Isopentenil-difosfato Delta-isomerasa	Isopentenil_difosfato <=> Dimetilalil_difosfato
Isopreno sintasa	Dimetilalil_difosfato => Isopreno + PP
Transporte de isopreno	Isopreno (cit) => Isopreno (ext)
<b>ruta del isopropanol</b>	
<b>nombre</b>	<b>ecuación</b>
tiolasa	2 Acetilo=CoA <=> CoA + Acetoacetilo=CoA
CoA transferasa	Acetoacetil=CoA + Acetato <=> Acetoacetato + Acetil-CoA
acetoacetato descarboxilasa	Acetoacetato => Acetona + CO <sub>2</sub>
alcohol deshidrogenasa secundaria	Acetona + NADPH => Isopropanol
transporte de isopropanol	Isopropanol (cit) => Isopropanol (ext)

Tabla 9: Análisis FBA de los rendimientos teóricos máximos de los productos diana isopreno o isopropanol a partir de CO y CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> con y sin complementos de arginina en mmol/g PS/h:

Producto diana	CO CO 60 mmol/g PS/h		
	Producto	Acetato	Etanol
Isopropanol	5,061008	0	2,408488
Isopreno	1,967815	2,209201	3,935631
Producto diana	CO + arginina CO 60 mmol + arginina 2 mmol/g PS/h		
	Producto	Acetato	Etanol
Isopropanol	6,41679498	0	2,041474197
Isopreno	2,576176316	2,254853944	4,152352632
Producto diana	CO + arginina CO 48 mmol + arginina 2 mmol/g PS/h		
	Producto	Acetato	Etanol
Isopropanol	5,404593388	0	1,559776585
Isopreno	2,182613259	1,813013818	3,365226517
Producto diana	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>		
	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> 60 mmol/g PS/h		
Producto	Acetato	Etanol	
Isopropanol	5,00758257	0	2,408488
Isopreno	1,26220128	2,209201	3,935631
Producto diana	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> + arginina CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> 60 mmol + arginina 2 mmol/g PS/h		
	Producto	Acetato	Etanol
Isopropanol	6,361290323	0	2,041474
Isopreno	1,83911141	2,254854	4,152353
Producto diana	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> + arginina CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> 48 mmol + arginina 2 mmol/g PS/h		
	Producto	Acetato	Etanol
Isopropanol	5,359773808	0	1,559777
Isopreno	1,586671154	1,813014	3,365227

- 5 La simulación muestra que la complementación con arginina puede aumentar de manera significativa los rendimientos de producción teóricos máximos de los compuestos diana isopropanol e isopreno tanto en CO como en CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>. La producción máxima de isopropanol a partir de CO podría aumentar de manera significativa en más del 20 % de 5,06 mmol/g PS/h a 6,42 mmol/g PS/h ya con pequeñas cantidades de absorción de arginina (2 mM, 0,34 g/l). Para la ruta del mevalonato que consume ATP para la producción de isopreno a partir de CO, la producción máxima podría incrementarse aún de manera más significativa en más del 30 % de 1,97 mmol/g PS/h a 2,58 mmol/g PS/h. El efecto es aún más pronunciado con CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, donde la producción máxima de isopropanol se puede aumentar en más del 25 % de 5,0 mmol/g PS/h a 6,36 mmol/g PS/h y la producción de isopreno en un 45 % de 1,26 mmol/g PS/h a 1,83 mmol/g PS/h. Esto demuestra claramente que la arginina se puede utilizar para impulsar la producción de moléculas diana no naturales.
- 10
- 15 La simulación también muestra que cuando se utilizan de manera conjunta arginina 2 mM, la producción incluso aumenta con una menor absorción de CO, lo que demuestra que la complementación con arginina mejora la eficacia del carbono en una molécula diana.

#### Ejemplo 6

#### 20 Uso del represor de arginina como interruptor genético para impulsar la expresión de rutas heterólogas

Este ejemplo demuestra que la arginina se puede utilizar como interruptor genético para impulsar la expresión de rutas heterólogas.

- 25 Se encontró que todos los genes en la ruta de arginina desiminasa identificada del ejemplo 3 estaban agrupados y también se encontró un represor de la arginina ArgR. Se han identificado secuencias operadoras (secuencias de ADN a las que se une la proteína argR para evitar la transcripción génica) en una variedad de microorganismos que incluyen *E. coli* (Tian *et al.* 1992, *J. Mol. Biol.* 226, págs. 387-397) y el sitio de unión generalmente se conserva a través de linajes bacterianos (Makarova *et al.* 2001, *Genome Biol.* 2, págs. 1-8).
- 30

El represor de arginina controla la expresión génica mediante la unión a una secuencia operadora palindrómica que se encuentra aproximadamente 45 pb cadena arriba del codón de inicio de la arginina desiminasa. La adición de

arginina provoca que el represor se desvincule de la secuencia operadora, lo que permite la transcripción de los genes cadena abajo de la secuencia operadora. En un ejemplo profético, la expresión génica heteróloga se puede activar mediante la adición de arginina. La expresión génica heteróloga se reprimirá por la proteína argR si la secuencia operadora de unión a argR se añade a la región cadena arriba de los genes heterólogos. Posteriormente, la expresión génica se puede activar mediante la adición de arginina.

En un ejemplo, los genes heterólogos pueden codificar una ruta metabólica que necesita ATP para la síntesis del producto. Por ejemplo, la ruta del mevalonato es una ruta heteróloga que convierte la acetil-CoA en isopentenil-difosfato a un coste de 3 moles de ATP por mol de isopentenil-difosfato. Utilizando el método descrito, la expresión de la ruta heteróloga del mevalonato podría activarse mediante la adición de arginina, que también proporcionaría ATP para la ruta del mevalonato a través de la degradación de la arginina a través de la ruta de la arginina desiminasa.

*Ejemplo 7*

**Optimización de la eficacia de la utilización conjunta de arginina con sustratos gaseosos de CO y/o H<sub>2</sub> y/o CO<sub>2</sub>**

Para lograr una utilización conjunta eficiente de la arginina con sustratos gaseosos de CO y/o H<sub>2</sub> y/o CO<sub>2</sub>, puede ser necesario eliminar la regulación. Esto podría lograrse mediante la inactivación del represor de arginina ArgR descrito anteriormente para eliminar la represión de los genes de la ruta de la arginina desiminasa. Dichas inactivaciones se pueden lograr por alguien experto en la materia utilizando métodos descritos anteriormente [Documentos W2012053905, WO2012115527, WO2013180584]. Sin embargo, la eliminación del represor de arginina no permite activar la expresión génica heteróloga mediante la adición de arginina como se describe anteriormente. Un método alternativo sería eliminar las secuencias de unión al operador descritas anteriormente cadena arriba del operón de la ruta de la arginina desiminasa o reemplazar la región cadena arriba del operón de la ruta de la arginina desiminasa que incluye la secuencia operadora y la secuencia promotora con un promotor constitutivo o sintético. Dichas modificaciones se pueden lograr por alguien experto en la materia utilizando métodos descritos anteriormente [Documentos W2012053905, WO2012115527, WO2013180584]. Los promotores constitutivos y sintéticos adecuados son, por ejemplo, pero sin limitación, el promotor de ferredoxina Pfdx, promotor de acetato cinasa Ppta, o Ptet o PIPL12 que se han descrito anteriormente [Documento US 20160160223; Nagaraju *et al.*, Genome editing of Clostridium autoethanogenum using CRISPR/Cas9, Biotechnol Biofuels. 2016; 9: 219].

De manera similar, las regiones promotoras de genes responsables de la utilización de CO y/o H<sub>2</sub> y/o CO<sub>2</sub>, tal como el grupo Wood-Ljungdahl o el operón Hyt (Brown *et al.* Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of Clostridium autoethanogenum and analysis of CRISPR systems in industrial relevant Clostridia. Biotechnology for Biofuels 2014 7:40) se pueden reemplazar con promotores constitutivos y sintéticos o los respectivos reguladores inactivados o atenuados. Los expertos en la materia podrán identificar dichos reguladores a partir de datos transcriptómicos como se describe en el ejemplo 10.

*Ejemplo 8*

**Ruta alternativa de utilización de arginina y producción de putrescina**

Este ejemplo demuestra una ruta alternativa de utilización de arginina que puede generar putrescina como subproducto.

Otra ruta posible para la utilización de arginina es a través de la descarboxilación de arginina en lugar de la desaminación: la arginina se puede descarboxilar a agmatina y CO<sub>2</sub> mediante la enzima arginina descarboxilasa. La agmatina se puede convertir posteriormente en N-carbamoil putrescina mediante la enzima agmatina desiminasa, produciendo también amonio. La putrescina carbamoiltransferasa puede convertir N-carbamoil-putrescina más fosfato en putrescina más carbamoil-fosfato. El carbamoil fosfato más ADP se convierte en amonio + ATP + CO<sub>2</sub> por la carbamato cinasa a través del mismo mecanismo que en la ruta de la arginina desiminasa. El rendimiento neto de amonio y ATP es el mismo que el de la ruta de la arginina desiminasa pero con dos intermediarios diferentes (agmatina y N-carbamoil putrescina en lugar de citrulina) y un subproducto diferente (putrescina en lugar de ornitina).

La putrescina es un subproducto de mayor valor que la ornitina o la arginina y se puede utilizar como materia prima en la producción de una variedad de polímeros, incluidos el nailon-4,6 (Qian *et al.* 2009, Biotechnol. Bioeng. 104, pág. 651-662) y el poliuretano (Dahiyat *et al.* 1993, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 4, págs. 529-543).

Tabla 10.

Nombre del gen	Número EC	Identificadores
Arginina descarboxilasa	EC 4.1.1.9	AGY76455, CAETHG 2244
Agmatina desiminasa	EC 3.5.3.12	AGY76293.1, CAETHG 2074
Putrescina carbamoiltransferasa	EC 2.3.1.6	EKU86922, WP 003731415.1, AGY76301
Carbamato cinasa	EC 2.7.2.2	AGY77835, CAETHG 3632

*Ejemplo 9***Producción de alanina y conversión a 3-HP o ácido acrílico a través de rutas heterólogas**

Este ejemplo demuestra la conversión de alanina en 3-hidroxipropionato o ácido acrílico.

En el ejemplo 1 se ha demostrado la producción de alanina a partir de arginina por *C. autoethanogenum*. La alanina se puede convertir además en productos de alto valor 3-hidroxipropionato (3-HP) o ácido acrílico.

La conversión de alanina a acrilato se ha demostrado en *Clostridium propionicum* (Dalal R. K., Akedo M., Cooney C. L., Sinskey A. J. (1980) A microbial route for acrylic acid production. Biosources Dig 2:89-97). La conversión se puede realizar mediante malonil-semialdehído y 3-HP, o mediante alanil-CoA. Tanto el 3-HP como la alanil-CoA se pueden convertir en acrilil-CoA y después en acrilato. Se pueden introducir genes/enzimas aisladas de *C. propionicum* y expresar de manera heteróloga por un experto en la materia utilizando métodos descritos anteriormente para producir 3-hidroxipropionato o acilato [Documentos W2012053905, WO2012115527, WO2013180584].

*Ejemplo 10***Análisis transcriptómico**

El análisis del transcriptoma de los cultivos biológicos en biorreactor duplicados de *C. autoethanogenum* que crecían de manera heterótrofa en medio 4AA (véase la tabla 2 para más detalles) se llevó a cabo con secuenciación de ARN. Durante la fase de crecimiento equilibrado y la absorción de todos los 4AA, se recogieron aproximadamente 35 ml de cultivo 0,3 g PCS/l, se sedimentó (5000 × g durante 3 min a 4 °C) y se resuspendido en 5 ml de RNAlater (Qiagen). La muestra se almacenó a 4 °C durante la noche, se centrifugó (4000 × g durante 10 min a 4 °C) y el sedimento se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento. Los sedimentos congelados se descongelaron, se extrajo el ARN total y se prepararon bibliotecas de ARNm como se describe en Marcellin *et al.*, 2013. La secuenciación se realizó con un secuenciador Illumina HiSeq-2000.

Los patrones de expresión génica en medio 4AA se compararon con los datos de RNA-seq de la misma cepa de *C. autoethanogenum* (DSM10061) cultivada de manera heterótrofa en PETC-MES convencional (incluido YE) y publicada previamente (Marcellin *et al.*, 2016). Las lecturas de secuenciación de ambas condiciones heterótrofas se recortaron para evitar errores de lectura y después se alinearon/realinearon con el genoma usando TopHat2 (Kim *et al.*, 2013) con dos desapareamientos permitidos por alineación de lectura. Las abundancias de transcritos se estimaron utilizando la función FPKM de Cufflinks utilizando la normalización del cuartil superior. Se utilizó CuffDiff para estimar los transcritos expresados de manera diferencial y Cuffnorm para la normalización de datos. Se utilizó un valor q inferior a 0,05 (utilizando la tasa de hallazgo falso; Benjamini y Hochberg, 1995) para determinar cambios significativos en la expresión génica.

Se realizó un análisis del transcriptoma mediante secuenciación de ARN (RNA-seq, del inglés "RNA-sequencing") para obtener más pruebas confirmatorias de la implicación de la ruta de ADI a nivel de expresión génica. Para ello, se tomaron muestras de cultivos biológicos en biorreactor duplicados de *C. autoethanogenum* que crecían de manera heterótrofa en medio 4AA durante la fase de crecimiento equilibrado. Este conjunto de datos de RNA-seq se comparó con el conjunto de datos publicado anteriormente (Marcellin *et al.*, 2016) de la misma cepa de *C. autoethanogenum* (DSM10061) cultivada de manera heterótrofa (fructosa) en el medio PETC-MES convencional que contiene YE.

El análisis del transcriptoma demostró el papel de la ruta de ADI, ya que todos los genes de la ruta de ADI estaban regulados al alza en más de 500 veces (valores q de <0,001) cuando las células se cultivaron en PETC-MES complementado con 4AA en comparación con YE). Además, se observó una regulación al alza de más de 380 veces (valores q de <0,001) de posibles genes antiportadores de arginina-ornitina (CAETHG\_3023 y 3024). De los cuatro genes asociados con la degradación de citrulina en carbamoilfosfato y ornitina en *C. autoethanogenum* los presentes datos indican que la ornitina carbamoiltransferasa (CAETHG\_3022) es la proteína catalizadora de flujo (regulación al alza de 645 veces; q <0,001) durante el catabolismo de ARG en *C. autoethanogenum* ya que sus isoenzimas estaban reguladas a la baja (CAETHG\_0449 y 0591) o no mostraban cambios (CAETHG\_2082) entre las condiciones comparadas. De manera similar, de los cinco genes asociados con la degradación del carbamoil-fosfato en CO<sub>2</sub>, la carbamato cinasa de CAETHG\_3025 parece ser la proteína catalizadora de flujo (regulación al alza de 623 veces; q <0,001) ya que su valor FPKM es 1000 veces superior que los valores FPKM de sus isoenzimas.

*Ejemplo 11***Optimización de la eficacia de la incorporación de arginina en el metabolismo central**

El análisis transcriptómico identificó genes que en el metabolismo natural determinan el flujo de utilización e

incorporación de arginina en el metabolismo central como ornitina carbamoiltransferasa (CAETHG\_3022) y carbamato cinasa (CAETHG 3025). Para mejorar la eficacia, estos genes se pueden sobreexpresar usando promotores fuertes o inducibles, por ejemplo, pero sin limitación, el promotor de ferredoxina Pfdx, promotor de acetato cinasa Ppta, o Ptet o PIPL12 que se han descrito anteriormente [Documento US 20160160223; Nagaraju *et al.*, Genome editing of Clostridium autoethanogenum using CRISPR/Cas9, Biotechnol Biofuels. 2016; 9: 219].

5  
10  
15  
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. Las expresiones "que comprende(n)", "que tiene(n)", "que incluye(n)", y "que contiene(n)" se han de interpretar como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye(n), aunque no de forma limitativa"), salvo que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento meramente pretende servir como método abreviado de hacer referencia de manera individual a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, salvo que se indique lo contrario en el presente documento y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se enumerara de manera individual en el presente documento.

20  
Todos los métodos que se describen en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa 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, tiene por objeto simplemente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. 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.

25  
30  
Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en el presente documento. 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 en la materia empleen tales variaciones como adecuadas y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo diferente que el específicamente descrito en el presente documento. Aún más, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las posibles variaciones de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar un microorganismo fijador de C1, que comprende hacer fluir un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> a un biorreactor que contiene un cultivo de un microorganismo fijador de C1 en un medio nutritivo líquido; en donde se proporciona arginina al cultivo como única fuente de nitrógeno; además, en donde el microorganismo fijador de C1 es un microorganismo modificado de manera genética recombinante que comprende una ruta del metabolismo de la arginina; y además en donde el microorganismo fijador de C1 es *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la ruta del metabolismo de la arginina comprende una ruta de la arginina desiminasa y/o una ruta de la arginina descarboxilasa, en donde la ruta de la arginina desiminasa comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (EC 2.1.3.3) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2), y en donde la ruta de la arginina descarboxilasa comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19), agmatina desiminasa (EC 3.5.3.12), putrescina carbamoiltransferasa (EC 2.1.3.6) y carbamato cinasa (EC 2.7.2.2).
3. El método de la reivindicación 2, en donde la ruta de la arginina desiminasa comprende una o más de una enzima endógena sobreexpresada, una enzima endógena mutante o una enzima exógena.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de arginina en el biorreactor es al menos 300 mg/l.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el cultivo no produce acetato.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la arginina se cataboliza por la ruta del metabolismo de la arginina para producir amonio, en donde el microorganismo fijador de C1 utiliza amonio como fuente de nitrógeno.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el microorganismo fijador de C1 comprende una o más modificaciones genéticas en la ruta del metabolismo de la arginina, en donde la una o más modificaciones genéticas se seleccionan del grupo que consiste en (i) una mutación interruptora de elementos reguladores y (ii) un reemplazo de sitios de unión a operadores o promotores naturales por promotores constitutivos o sintéticos.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la mutación interruptora es una inactivación del represor de arginina argR.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el reemplazo es un reemplazo de un promotor del operón de la ruta de la arginina desaminasa por un promotor constitutivo o sintético.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el microorganismo fijador de C1 comprende una mutación interruptora en un transportador de arginina:ornitina.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el microorganismo fijador de C1 es LZ1561 de *Clostridium autoethanogenum*, que se deposita con el número de registro de DMSZ DSM23693.

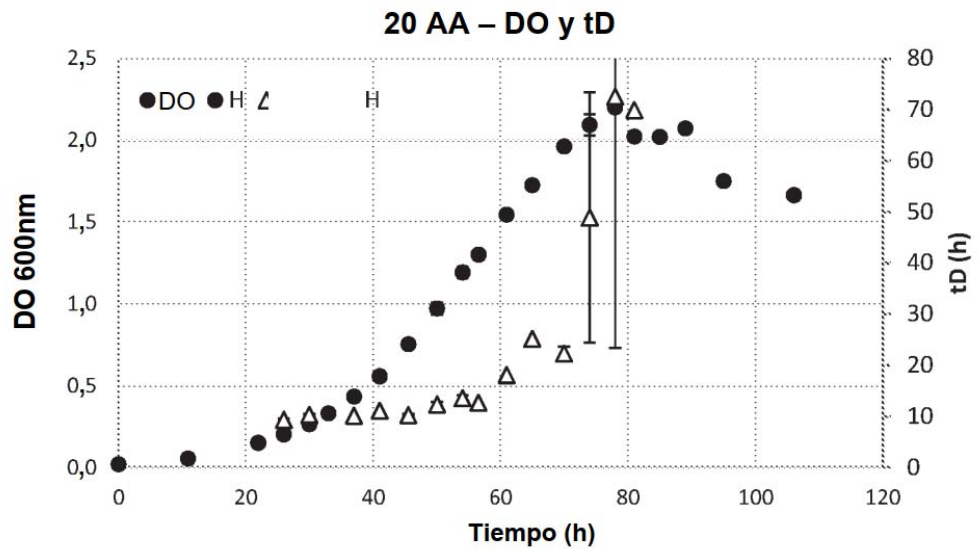


Fig. 1

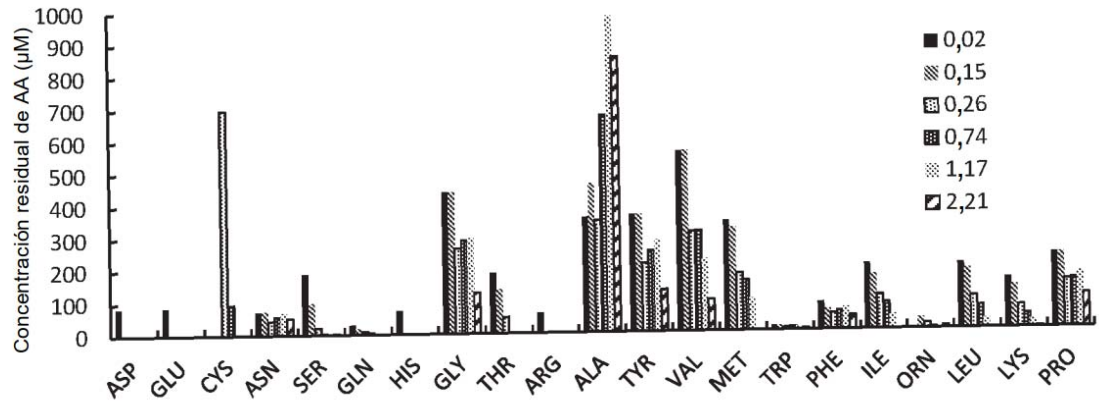


Fig. 2

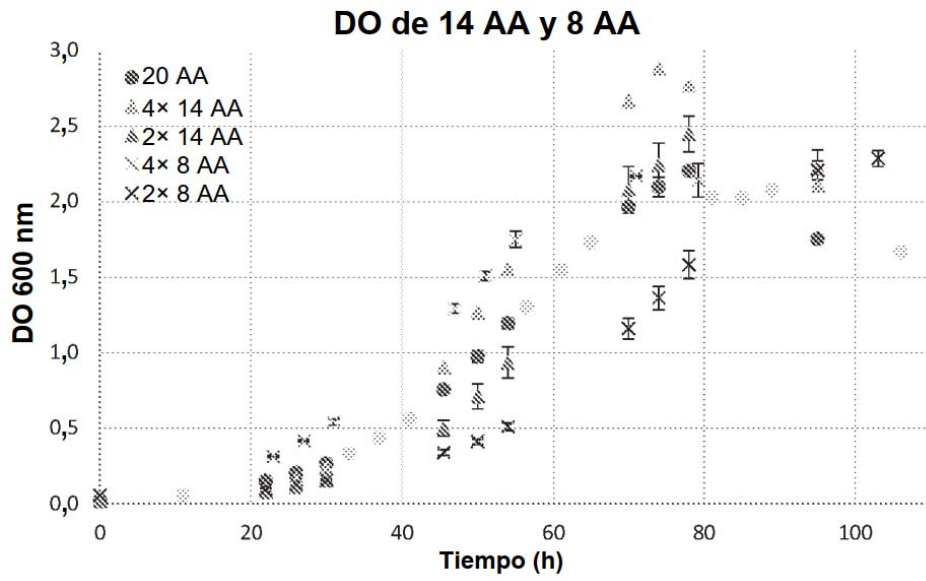


Fig. 3

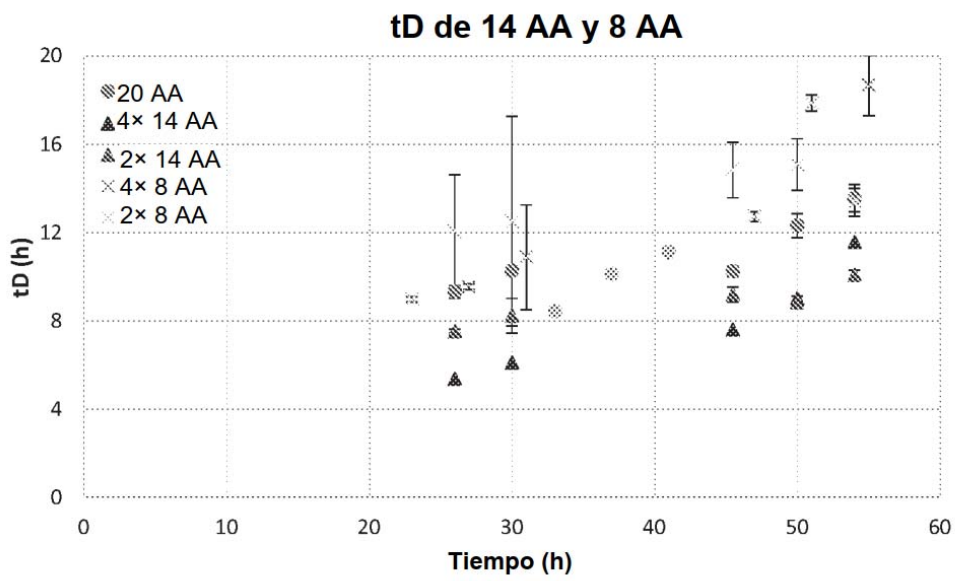


Fig. 4

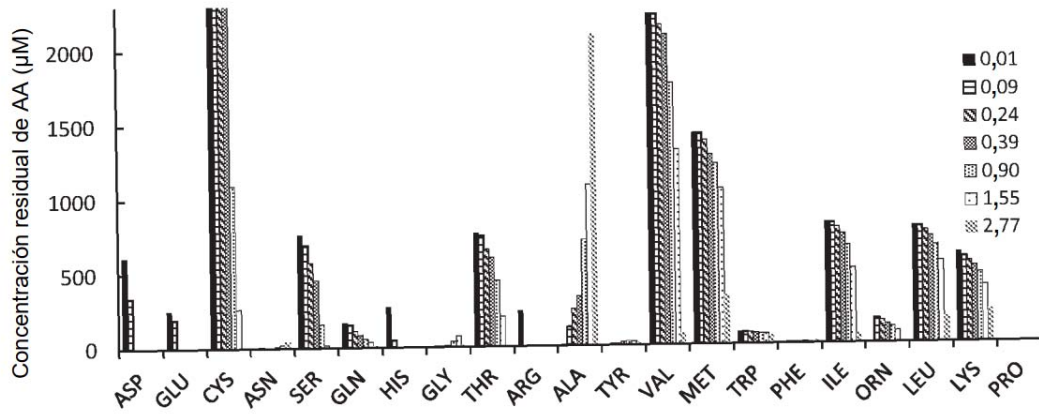


Fig. 5

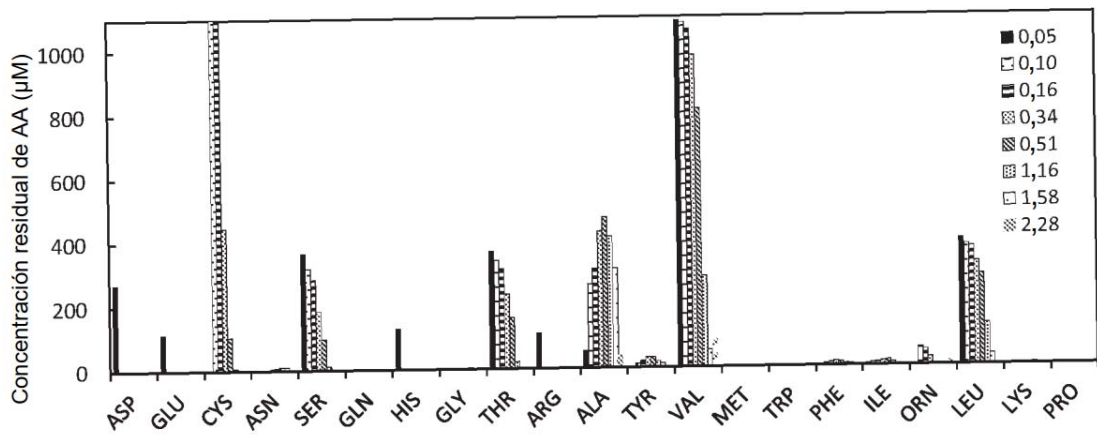


Fig. 6

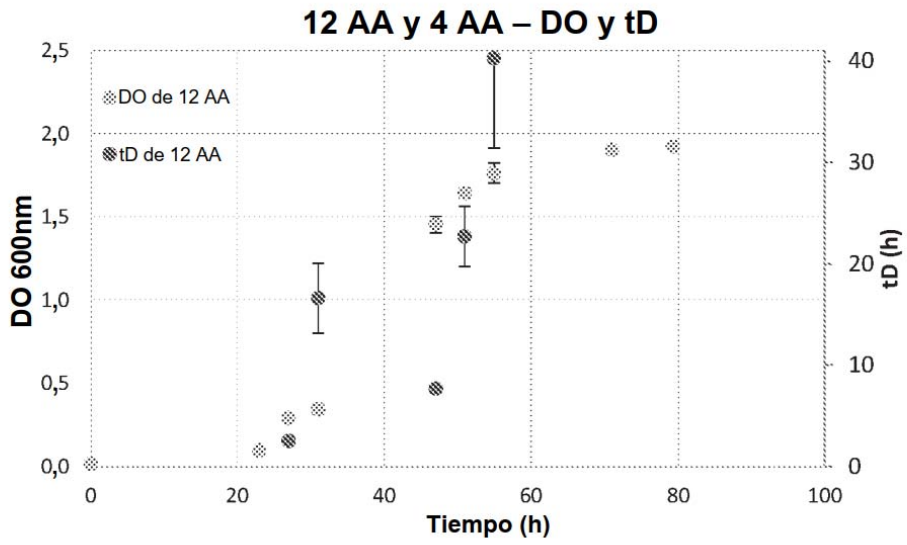


Fig. 7

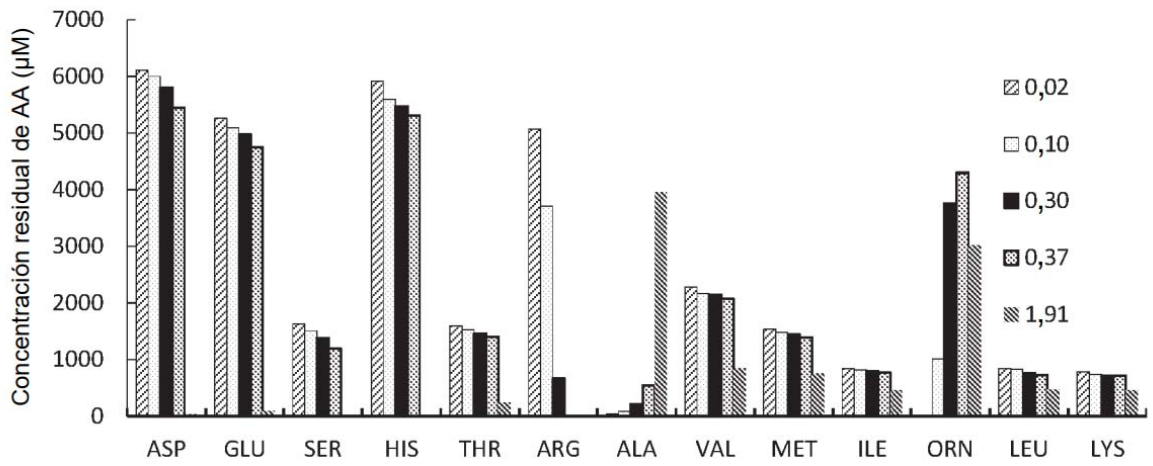


Fig. 8

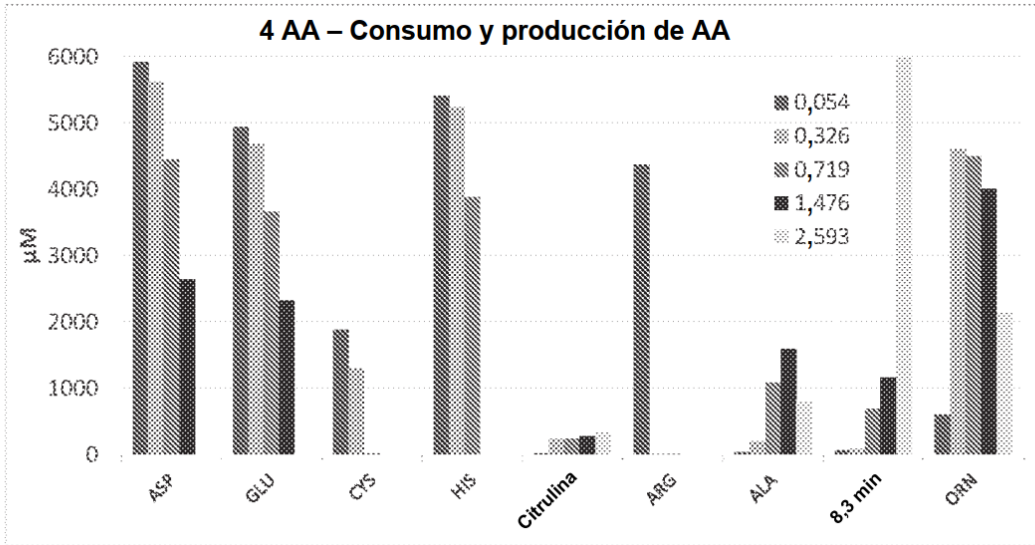


Fig. 9

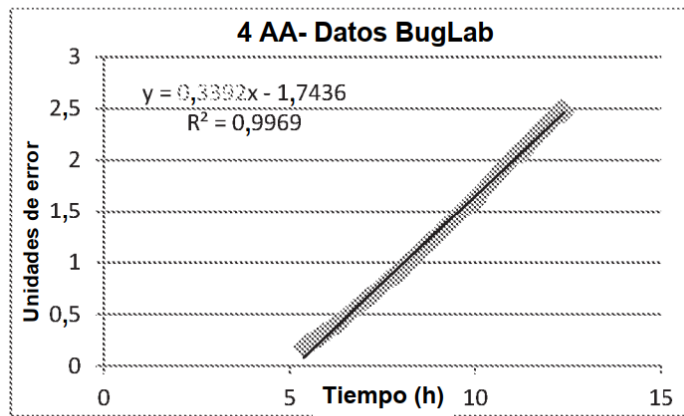


Fig. 10

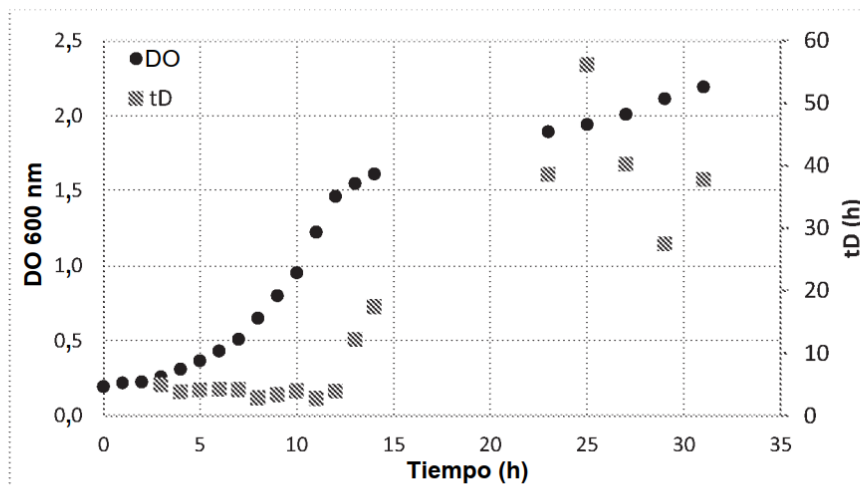


Fig. 11

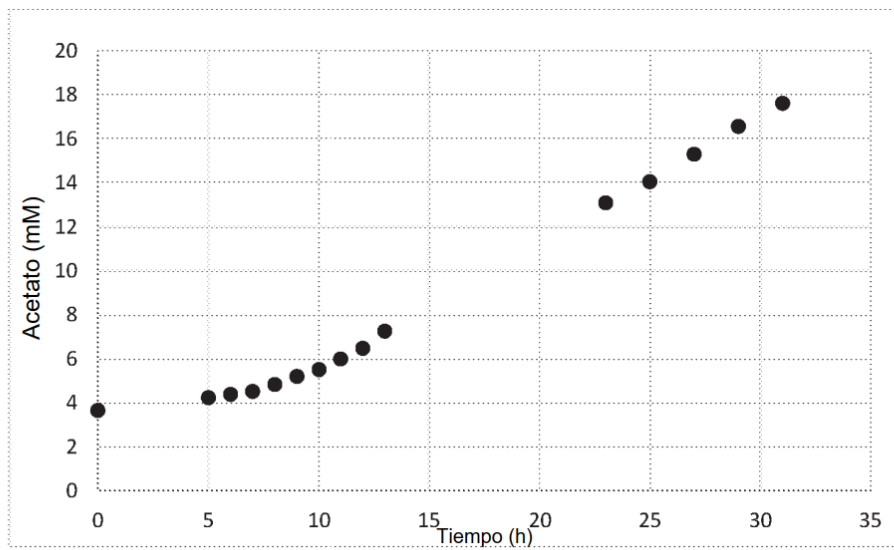


Fig. 12

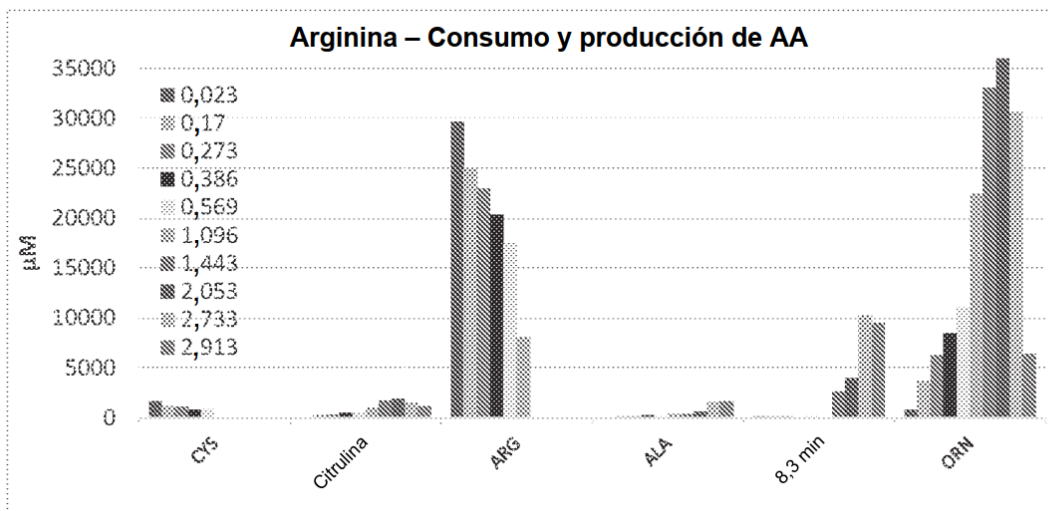


Fig. 13

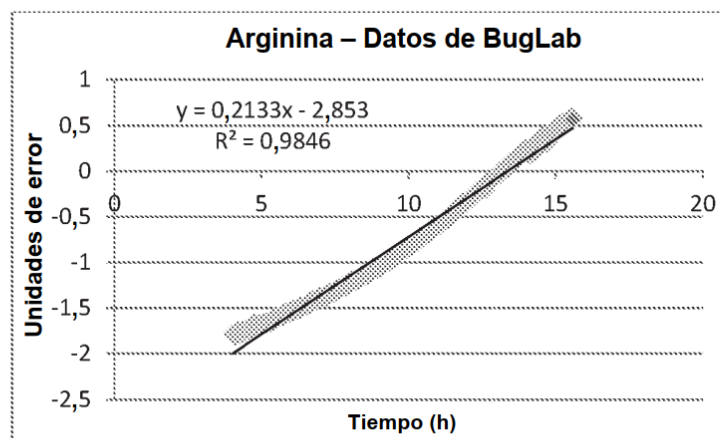


Fig. 14

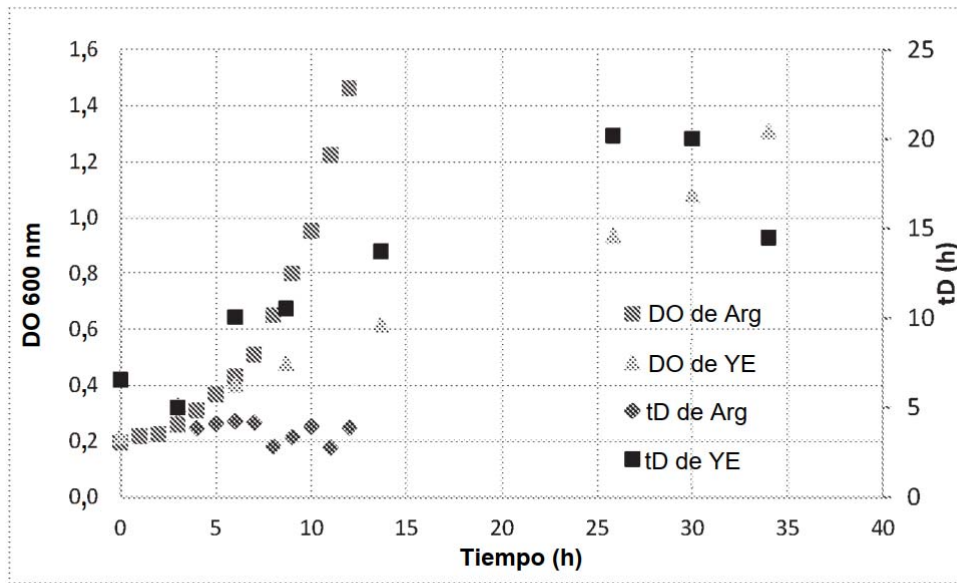
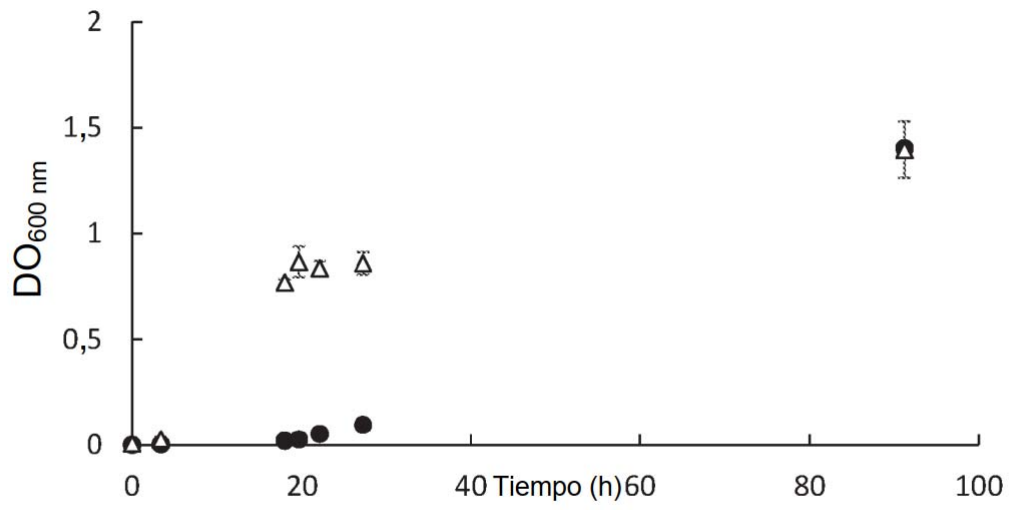
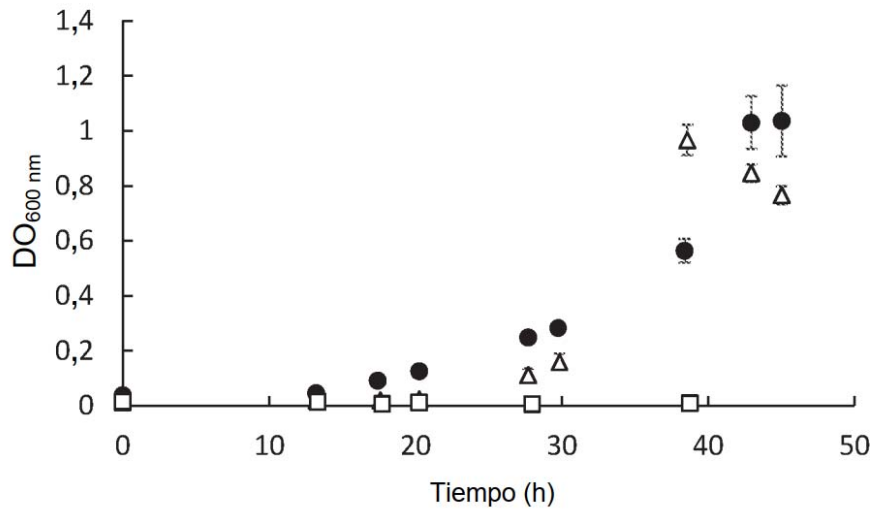


Fig. 15



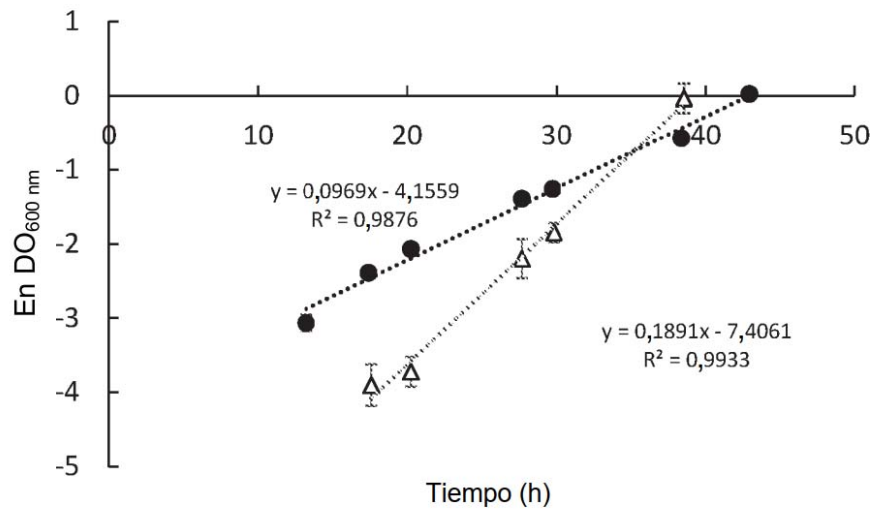
Con (Δ) y sin (●) complemento de arginina (n = 3, media ± DT)

Fig. 16



Con (Δ) arginina; sin (●) arginina; solo arginina (□) (n = 3, media ± DT)

Fig. 17



DSM23693 de *C. autoethanogenum* con (Δ) y sin (●) complemento de arginina

Fig. 18

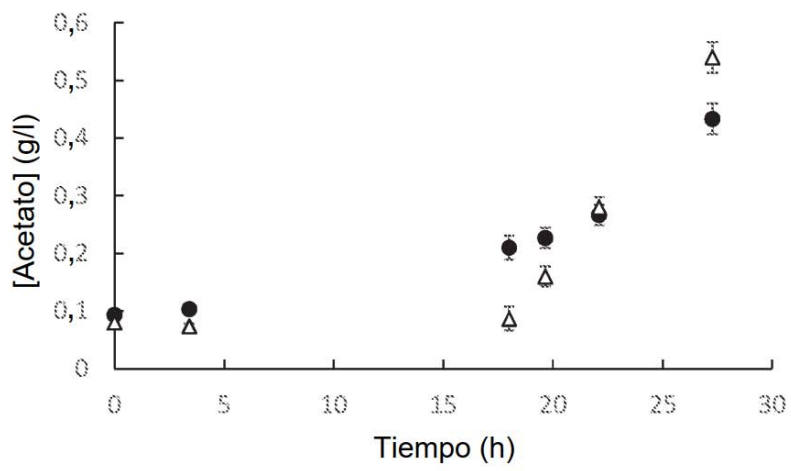


Fig. 19

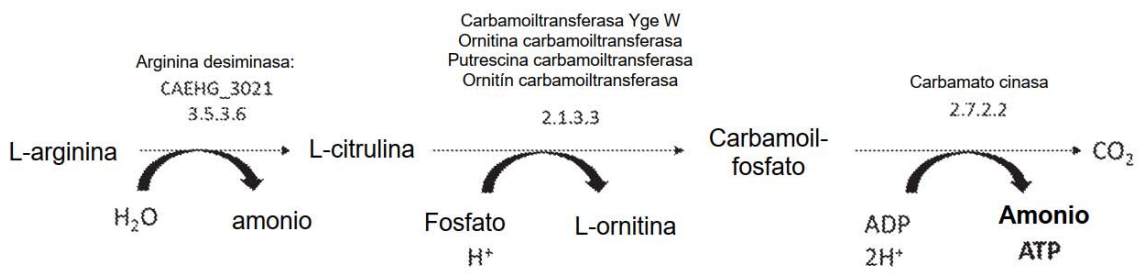


Fig. 20

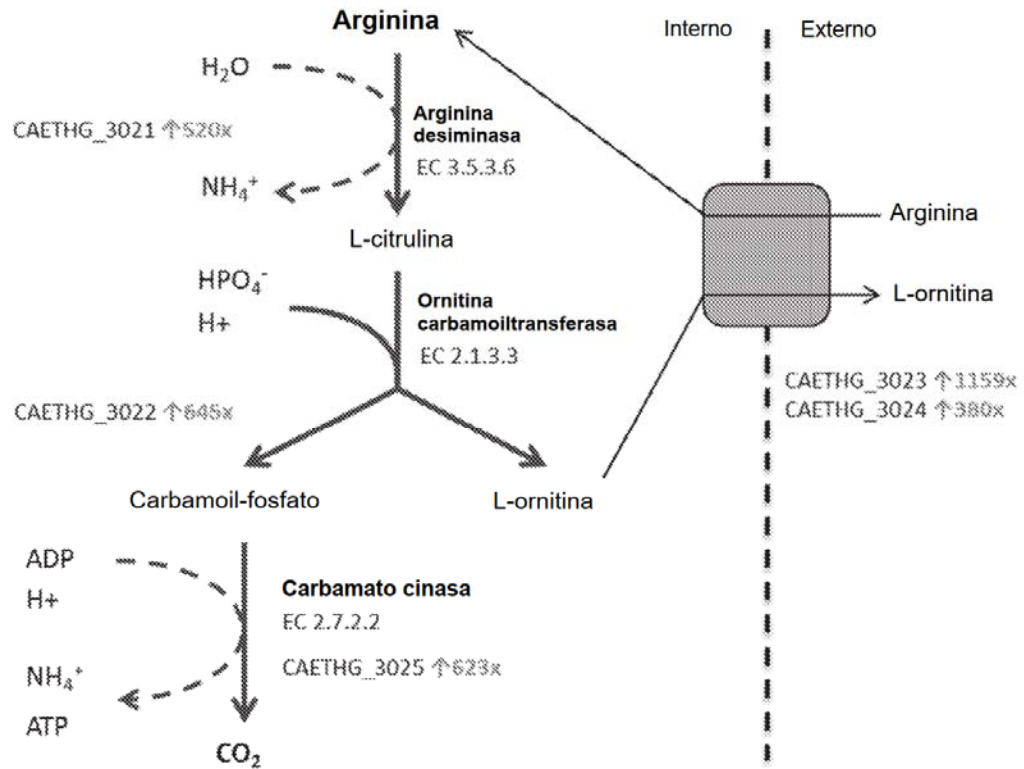
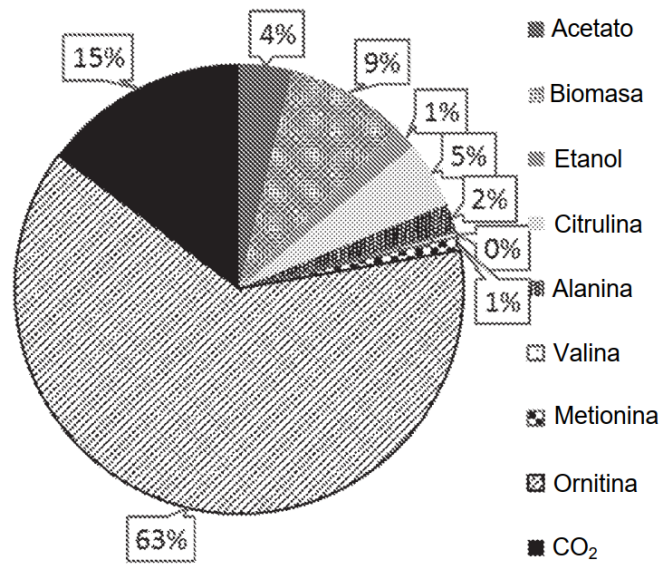
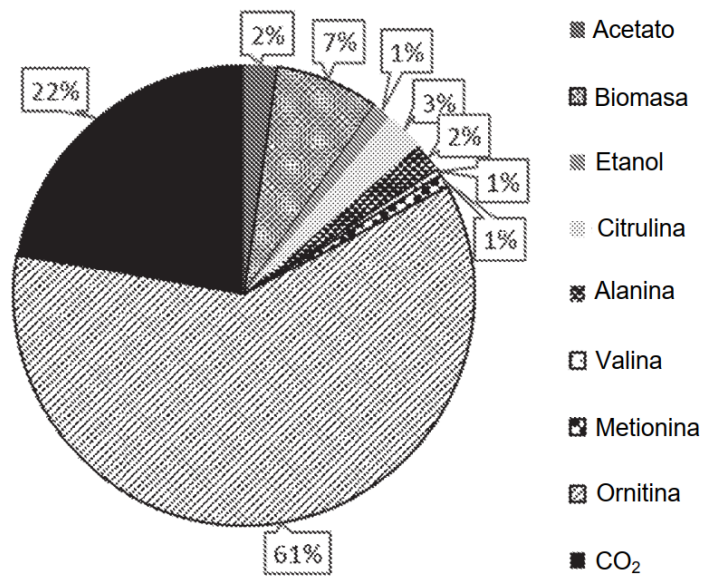


Fig. 21



4 AA

Fig. 22A



ARG

Fig. 22B

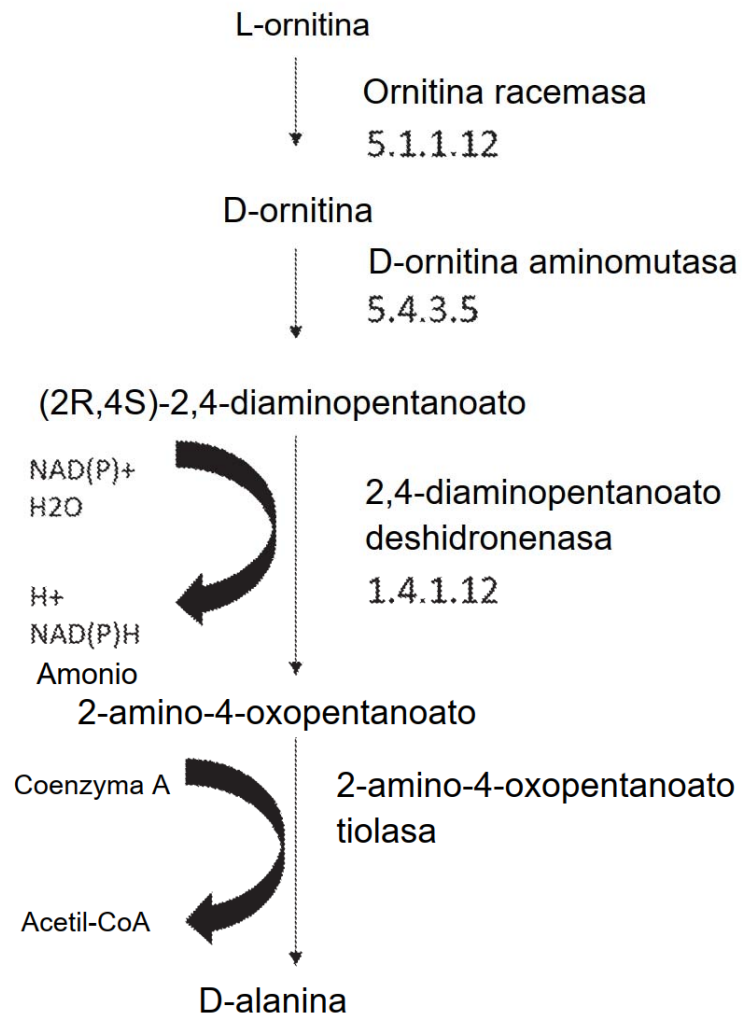


Fig. 23

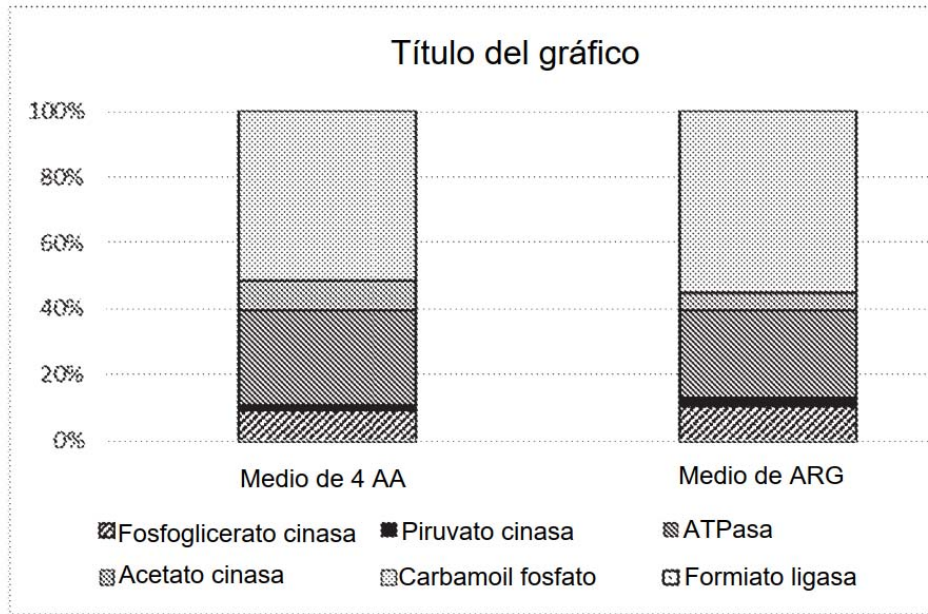


Fig. 24