

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 214**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C10L 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2013 PCT/NZ2013/000108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13191567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2013 E 13806177 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2864470**

54 Título: **Microorganismos recombinantes que producen biodiesel**

30 Prioridad:

21.06.2012 US 201261662467 P

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

19.02.2018

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)
24 Balfour Road Parnell
Auckland 1052, NZ**

72 Inventor/es:

**LIEW, FUNGMIN y
KOEPE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 214 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

Microorganismos recombinantes que producen biodiésel

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a microorganismos recombinantes y a métodos para la producción de biodiésel por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO.

Antecedentes de la invención

Las bacterias incluyendo los acetógenos carboxidotróficos *Clostridium autoethanogenum* o *C. ljungdahlii* producen ácidos grasos en la biosíntesis de lípidos y membranas celulares.

10 En las cepas de Clostridia de tipo salvaje, el flujo hacia abajo de la ruta de los ácidos grasos es significativo representando los lípidos típicamente el 5-6 % (p/p) de la masa celular seca (respectivamente 1-1,5% (p/p) de la masa celular húmeda) (Lepage et al., 1987, Microbiology 133: 103-1 10). Típicamente, más del 95% de los lípidos están en un intervalo de longitud de cadena C16-C18 bien definido (Lepage et al., 1987, Microbiology 133: 103-1 10), estando presentes ácidos grasos 12:0, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 17Δ, 18:0, 18:1, 19Δ.

15 Los ácidos grasos (FA) y sus derivados son densos energéticamente y por lo tanto tienen potencial como biocombustibles para uso como un combustible de sustitución directa de transporte/pesado y/o para la producción de otros compuestos químicos industriales. Los ejemplos de derivados de ácidos grasos incluyen biodiésel, ácidos grasos libres, alquenos y alcanos.

20 El biodiésel es un mono-alquil éster y puede usarse solo en motores diésel estándar, o puede mezclarse con petrodiésel. También puede usarse como una alternativa baja en carbón del gasoil de calefacción. En 2009 se usaron, en todo el mundo, más de 3,5 billones de galones de biodiésel. El biodiésel normalmente se deriva químicamente de grasa vegetal o animal por transesterificación de lípidos en presencia de alcohol para rendir glicerina y un mono-alquil éster. El biodiésel producido por este proceso puede dar lugar sin embargo a daño en los motores diésel debido a variaciones en los aceites de varias fuentes animales y vegetales que no están muy definidos con un amplio intervalo de longitud de cadena carbonada (Fukuda et al., 2001, Biosci Bioeng 92: 405-416).
25 Los puntos críticos son dilución del aceite del motor, coquización de los anillos del pistón, corrosión de componentes hidráulicos, y deposiciones en el sistema de inyección, que resulta del proceso de producción y envejecimiento del combustible, que resulta en que algunos fabricantes de coches rechacen el uso de biodiésel derivado de animales o vegetales en algunos de sus modelos (Köpke et al., 2011, The Past, Present, and Future of Biofuels - Biobutanol as Promising Alternative, En: dos Santos Bernades (Ed.) Biofuel Production-Recent Developments and Prospects, InTech, 451-486).
30

La generación actual de biocombustibles que usan bien cosechas alimentarias o alimentarias para producir materias primas base basadas en azúcar o celulosa pueden tener inconvenientes referidos al uso de la tierra, seguridad alimentaria, volatilidad de suministro y problemas medioambientales.

35 Es un objeto de la invención superar estos problemas y proporcionar un método de producción de biodiésel, o al menos proporcionar al público una elección útil.

Resumen de la invención

La invención proporciona generalmente, *inter alia*, métodos para la producción de biodiésel por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, y microorganismos recombinantes para usar en dichos métodos.

40 En un primer aspecto, la invención proporciona un microorganismo acetogénico carboxidotrófico recombinante capaz de producir biodiésel y opcionalmente uno o más otros productos por fermentación de un sustrato que comprende CO.

45 En una realización particular, el microorganismo se adapta para expresar una o más enzimas exógenas en la ruta de biosíntesis de biodiésel no presentes en un microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante (puede referirse en la presente memoria como una enzima exógena). En otra descripción, el microorganismo se adapta para sobreexpresar una o más enzimas endógenas en la ruta de síntesis de biodiésel que están presentes en un microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante (puede referirse en la presente memoria como una enzima endógena).

En una realización, el microorganismo recombinante se adapta para producir una mayor cantidad de biodiésel de la que se produciría por un microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante.

50 En una realización, la una o más enzimas que el microorganismo adaptado expresa o sobreexpresa es una aciltransferasa.

En una descripción, la enzima es una enzima aciltransferasa como se define en SEQ ID NO: 1, o una variante

funcionalmente equivalente de ésta.

En una descripción, el microorganismo parental es capaz de fermentar un sustrato que comprende CO para producir un alcohol, pero no para convertir el alcohol en biodiésel y el microorganismo recombinante se adapta para expresar una o más enzimas implicadas en la conversión de etanol en biodiésel.

- 5 En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para incrementar la expresión de uno o más ácidos nucleicos endógenos y dichos uno o más ácidos nucleicos endógenos codifican una o más de las enzimas como se hace referencia en la presente memoria anteriormente.

10 En una realización, el uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para incrementar la expresión es un elemento regulador. En una realización, el elemento regulador es un promotor. En una realización, el promotor es un promotor constitutivo. En una realización, el promotor se selecciona del grupo que comprende agrupación génica Wood-Ljungdahl, un promotor de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, un promotor del operón del complejo Rnf, promotor del operón de ATP sintasa y promotores del operón de Fosofotransacetilasa/Acetato quinasa.

15 En una realización, el microorganismo acetogénico carboxidotrófico recombinante se adapta adicionalmente para expresar una o más enzimas exógenas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En un aspecto adicional, el microorganismo se adapta para sobreexpresar una o más enzimas endógenas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos.

20 En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar una o más de las enzimas referidas anteriormente en la presente memoria. En una realización, los microorganismos comprenden uno más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar al menos dos de las enzimas. En otras realizaciones, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar cinco o más de las enzimas.

En una realización, el uno o más ácidos nucleicos exógenos es una construcción o vector de ácido nucleico, en una realización particular un plásmido, que codifican una o más de las enzimas referidas anteriormente en la presente memoria en cualquier combinación.

- 25 En una realización, el ácido nucleico exógeno es un plásmido de expresión.

30 En una realización particular, el microorganismo parental se selecciona del grupo de bacterias acetogénicas carboxidotróficas que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

En una realización, el microorganismo parental es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 un derivado de la cepa DSM10061. En otra realización particular, el microorganismo es *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).

- 35 En un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una o más enzimas que cuando se expresa en un microorganismo permite al microorganismo producir biodiésel por fermentación de un sustrato que comprende CO.

En una realización, el ácido nucleico codifica dos o más enzimas que cuando se expresan en un microorganismo permiten al microorganismo producir biodiésel por fermentación de un sustrato que comprende CO.

- 40 En una realización, los ácidos nucleicos de la invención codifican cinco o más de dichas enzimas.

En una realización, las enzimas se eligen del grupo que consiste en acil transferasa y una variante funcionalmente equivalente de ésta.

En una realización, el ácido nucleico que codifica acil transferasa es SEQ ID NO: 1 o es una variante funcionalmente equivalente de ésta.

- 45 En una realización, los ácidos nucleicos de la invención comprenden además un promotor. En una realización, el promotor permite la expresión constitutiva de los genes bajo su control. En una realización particular, se usa un promotor de la agrupación Wood-Ljungdahl. En otras realizaciones particulares, se usa un promotor de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, un promotor del operón del complejo Rnf, promotor del operón de ATP sintasa o un promotor del operón de Fosofotransacetilasa/Acetato quinasa. En una realización particular, el promotor es de *C. autoethanogenum*.

50 En un tercer aspecto, la invención proporciona una construcción o vector de ácido nucleico que comprende uno o más ácidos nucleicos del segundo aspecto.

En una realización particular, la construcción o vector de ácido nucleico es una construcción o vector de expresión.
En una realización particular, la construcción o vector de expresión es un plásmido.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un organismo huésped que comprende uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos del segundo aspecto o vectores o construcciones del tercer aspecto.

- 5 En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una construcción o vector de expresión como se refiere en el tercer aspecto de la invención y una construcción o vector de metilación.

Preferiblemente, la composición es capaz de producir un microorganismo recombinante según el primer aspecto de la invención.

- 10 En una realización particular, la construcción/vector de expresión y/o la construcción/vector de metilación es un plásmido.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para la producción de biodiésel y opcionalmente uno o más otros productos por fermentación microbiana que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando un microorganismo recombinante del primer aspecto de la invención.

En una realización el método comprende las etapas de:

- 15 a. proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención; y
b. fermentar anaerómicamente el cultivo en el biorreactor para producir biodiésel.

En una realización, el método comprende las etapas de:

- a. capturar gas que contiene CO producido como resultado de un proceso industrial
20 b. fermentación anaeróbica del gas que contiene CO para producir biodiésel por un cultivo que contiene uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención.

En descripciones particulares de los aspectos del método, la fermentación ocurre en un medio de cultivo acuoso.

En realizaciones particulares de los aspectos del método, la fermentación del sustrato tiene lugar en un biorreactor.

- 25 Preferiblemente, el sustrato que comprende CO es un sustrato gaseoso que comprende CO. En una realización, el sustrato comprende un gas residual industrial. En determinadas realizaciones, el gas es gas residual de acería o gas de síntesis.

- 30 En una descripción, el sustrato contendrá típicamente una proporción mayor de CO, tal como al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% CO en volumen, de 20% a 70% CO en volumen, de 30% a 60% CO en volumen, y de 40% a 55% CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% CO, o aproximadamente 55% CO, o aproximadamente 60% CO en volumen.

En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además la etapa de recuperar el biodiésel y opcionalmente uno o más otros productos del caldo de fermentación.

- 35 En un séptimo aspecto, la invención proporciona biodiésel cuando se produce por el método del sexto aspecto.

- 40 La descripción proporciona un método para la producción de un microorganismo del primer aspecto de la invención que comprende transformar un microorganismo parental acetogénico carboxidotrófico por la introducción de uno o más ácidos nucleicos de manera que el microorganismo es capaz de producir biodiésel, o producir una cantidad incrementada de biodiésel comparado con el microorganismo parental, y opcionalmente uno o más otros productos por fermentación de un sustrato que comprende CO, en el que el microorganismo parental no es capaz de producir biodiésel, o produce biodiésel a un nivel menor que el microorganismo recombinante, por fermentación de un sustrato que comprende CO.

- 45 Un microorganismo parental puede transformarse por la introducción de uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de biodiésel. Un microorganismo parental puede transformarse además por la introducción de uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Un microorganismo parental puede transformarse además por la expresión o sobreexpresión de uno o más ácidos nucleicos endógenos adaptados para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Un microorganismo parental puede transformarse con uno o más ácidos nucleicos adaptados para sobreexpresar una o más enzimas endógenas en la ruta de biodiésel que
50 están presentes naturalmente en el microorganismo parental.

En determinadas realizaciones, la una o más enzimas son como se han descrito anteriormente en la presente memoria.

En una realización, una bacteria acetogénica carboxidotrófica preparada por ingeniería genética comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una acetiltransferasa no específica (éster de cera sintasa/acil Coenzima A:diacilglicerol aciltransferasa). La bacteria puede ser un *Clostridium*, incluyendo, pero no limitado a *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, y *Clostridium magnum*. Otras especies de *Clostridia* que pueden usarse, no obstante no acetogénicas, incluyen, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum*, *C. phytofermentans*, *C. kluyveri*, y *C. pasterianum*.

La bacteria también puede ser, por ejemplo, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia product*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii*, o *Thermoanaerobacter kiwi*. La acetil transferasa no específica exógena puede ser acetil transferasa no específica de *Acinetobacter baylyi*. El ácido nucleico puede estar en un plásmido. El ácido nucleico que codifica la acetiltransferasa no específica puede estar optimizado en codones para *C. autoethanogenum* o para otra bacteria huésped.

Otra realización es un proceso para convertir CO y/o CO₂ en biodiésel. Un sustrato gaseoso que contiene CO y/o que contiene CO₂ se pasa a un biorreactor que contiene un cultivo de bacterias acetogénicas carboxidotróficas en un medio de cultivo. Las bacterias comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica una acetiltransferasa no específica (éster de cera sintasa/acil Coenzima A:diacilglicerol aciltransferasa). Las bacterias convierten el CO y/o CO₂ directamente en biodiésel, sin la necesidad de suministrar alcoholes (por ejemplo, etanol o butanol) o ácidos grasos. El biodiésel se recupera del biorreactor. El sustrato puede comprender un gas residual industrial. El cultivo puede crecerse y mantenerse estrictamente como anaerobio. El biodiésel puede comprender ésteres de etilo de ácidos grasos y/o ésteres de butilo de ácidos grasos.

Otra realización es un plásmido que se replica en una bacteria acetogénica carboxidotrófica. El plásmido comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una acetiltransferasa no específica (éster de cera sintasa/acil Coenzima A:diacilglicerol aciltransferasa). El ácido nucleico que codifica la acetiltransferasa no específica puede estar optimizado en codones para *C. autoethanogenum*. Opcionalmente, el plásmido puede estar metilado, por ejemplo, por paso a través de una bacteria que contiene una metilasa deseada.

La invención también puede decirse que consiste ampliamente en las partes, elementos y características referidas o indicadas en la memoria descriptiva de la solicitud, individualmente o colectivamente, en cualquiera o todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características, y en el que los números enteros específicos que se mencionan en la presente memoria tienen equivalentes conocidos en la técnica a la que se refiere la invención, dichos equivalentes conocidos se considera que están incorporados en la presente memoria como si se mostraran individualmente.

Descripción breve de las figuras

Éstos y otros aspectos de la presente invención, que deberían considerarse en todos sus aspectos nuevos, serán evidentes a partir de la descripción siguiente, que se proporciona sólo como ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1: Conversión de monóxido de carbono y/o hidrógeno en un alcohol tal como etanol o butanol, después conversión posterior del alcohol y un éster de ácido graso-CoA en un aciléster de ácido graso (biodiésel) por una aciltransferasa no específica

Figura 2: Mapa genético del plásmido de expresión pMTL85245-atf

Figura 3: Resultado de GC-MS que confirma la producción de biodiésel a partir de CO.

Descripción detallada de la invención

Lo siguiente es una descripción de la presente invención, incluyendo realizaciones preferidas de ésta, proporcionada en términos generales. La invención se elucida además a partir de la descripción proporcionada bajo el encabezamiento "Ejemplos" en la presente memoria más adelante, que proporciona datos experimentales que apoyan la invención, ejemplos específicos de varios aspectos de la invención, y medios para llevar a cabo la invención.

Como se hace referencia en la presente memoria, un "caldo de fermentación" es un medio de cultivo que comprende al menos un medio nutriente y células bacterianas.

Como se hace referencia en la presente memoria, un "microorganismo lanzadera" es un microorganismo en el que se expresa una enzima metiltransferasa y es distinto del microorganismo de destino.

Como se hace referencia en la presente memoria, un "microorganismo de destino" es un microorganismo en el que se expresan los genes incluidos en la construcción/vector de expresión y es distinto del microorganismo lanzadera.

El término "producto principal de la fermentación" se pretende que signifique el producto de la fermentación que se produce en la mayor concentración y/o rendimiento.

- 5 Los términos "incrementar la eficiencia", "eficiencia incrementada" y semejantes, cuando se usan en relación con un proceso de fermentación, incluyen, pero no están limitados a, incrementar uno o más de la velocidad de crecimiento de los microorganismos que catalizan la fermentación, la velocidad de crecimiento y/o producción de producto a concentraciones de producto elevadas, el volumen de producto deseado producido por volumen de sustrato consumido, la velocidad de producción o nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido comparado con otros subproductos de la fermentación.

10 La expresión "sustrato que comprende monóxido de carbono" y términos semejantes debería entenderse que incluye cualquier sustrato en el que el monóxido de carbono está disponible para una o más cepas de bacterias para crecimiento y/o fermentación, por ejemplo.

15 La expresión "sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" y expresiones y términos semejantes incluye cualquier gas que contiene un nivel de monóxido de carbono. El sustrato puede contener al menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% CO en volumen, de 20% a 70% CO en volumen, de 30% a 60% CO en volumen, y de 40% a 55% CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% CO, o aproximadamente 55% CO, o aproximadamente 60% CO en volumen.

20 Aunque no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H₂ no debería ser perjudicial para la formación del producto según métodos de la invención. La presencia de hidrógeno puede resultar en una eficiencia global mejorada de la producción de alcohol. Por ejemplo, el sustrato puede comprender una proporción de aprox 2:1, ó 1:1, ó 1:2 de H₂:CO. El sustrato puede comprender aproximadamente 30% o menos H₂ en volumen, 20% o menos H₂ en volumen, aproximadamente 15% o menos H₂ en volumen o aproximadamente 10% o menos H₂ en volumen. La corriente de sustrato puede comprender concentraciones bajas de H₂, por ejemplo, menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o carecer sustancialmente de hidrógeno. El sustrato también puede contener algo de CO₂ por ejemplo, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 80% CO₂ en volumen, ó 1% a aproximadamente 30% CO₂ en volumen. El sustrato puede comprender menos de o igual a aproximadamente 20% CO₂ en volumen. El sustrato puede comprender menos de o igual a aproximadamente 15% CO₂ en volumen, menos de o igual a aproximadamente 10% CO₂ en volumen, menos de o igual a aproximadamente 5% CO₂ en volumen o sustancialmente no comprende CO₂.

25 En la descripción que sigue, las realizaciones de la invención se describen en términos de administrar y fermentar un "sustrato gaseoso que contiene CO". Sin embargo, debe apreciarse que el sustrato gaseoso puede proporcionarse en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato gaseoso que contiene CO puede proporcionarse disuelto en un líquido. Esencialmente, un líquido está saturado con un gas que contiene monóxido de carbono y entonces ese líquido se añade al biorreactor. Esto puede conseguirse usando metodología estándar. Como ejemplo, podría usarse un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volumen 101, Número 3 / Octubre, 2002). Como ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO puede adsorberse en un soporte sólido. Dichos métodos alternativos están englobados por el uso del término "sustrato que contiene CO" y semejantes.

30 En realizaciones particulares de la invención, el sustrato gaseoso que contiene CO es un gas de desecho o residual industrial. Los "gases residuales o de desecho industriales" deben tomarse como que incluyen ampliamente cualesquiera gases que comprenden CO producidos por un proceso industrial e incluyen gases producidos como resultado de la fabricación de productos metálicos ferrosos, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinado del petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbón, y fabricación de coque. Los ejemplos adicionales pueden proporcionarse en otro lugar de la presente memoria.

35 A no ser que el contexto requiera otra cosa, las expresiones "fermentando", "proceso de fermentación" o "reacción de fermentación" y semejantes, tal y como se usan en la presente memoria, se pretende que engloben tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del proceso. Como se describirá adicionalmente en la presente memoria, en algunas realizaciones, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, la adición de metales o composiciones a una reacción de fermentación debería entenderse que incluye la adición a uno o ambos de estos reactores.

40 El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o disposición de torres o tuberías, que incluye el Reactor de Tanque Agitado Continuo (CSTR), Reactor de Célula Inmovilizada (ICR), Reactor de Lecho de Goteo (TBR), Columna de Burbujas, Fermentador de Inyección de Gas, Mezclador Estático, u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para contacto gas-líquido. En algunas realizaciones, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal,

cuando se hace referencia a la adición de sustrato al biorreactor o reacción de fermentación debe entenderse que incluye la adición a uno o ambos de estos reactores cuando sea apropiado.

"Ácidos nucleicos exógenos" son ácidos nucleicos que se originan fuera del microorganismo en el que se introducen. Los ácidos nucleicos exógenos pueden derivar de cualquier fuente apropiada, incluyendo, pero no limitado a, el microorganismo en el que se van a introducir (por ejemplo, en un microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante), cepas o especies de microorganismos que se diferencian del organismo en el que se van a introducir, o pueden crearse artificialmente o recombinantemente. En una realización, los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico que están presentes naturalmente en el microorganismo en el que se van a introducir, y se introducen para incrementar la expresión de o para sobreexpresar un gen particular (por ejemplo, mediante el incremento del número de copias de la secuencia (por ejemplo, un gen), o mediante la introducción de un promotor fuerte o constitutivo para incrementar la expresión). En otra realización, los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico que no están presentes naturalmente en el microorganismo en el que se van a introducir y permiten la expresión de un producto que no está presente naturalmente en el microorganismo o expresión incrementada de un gen nativo para el microorganismo (por ejemplo, en el caso de la introducción de un elemento regulador tal como un promotor). El ácido nucleico exógeno puede adaptarse para integrarse en el genoma del microorganismo en el que se va a introducir o permanecer en un estado extra-cromosómico.

"Exógeno" también puede usarse para hacer referencia a proteínas. Esto se refiere a una proteína que no está presente en el microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante.

El término "endógeno" tal y como se usa en la presente memoria en relación con un microorganismo recombinante y un ácido nucleico o proteína se refiere a cualquier ácido nucleico o proteína que está presente en un microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante.

"Biodiésel" como se hace referencia en la presente memoria se refiere a un éster de alquilo de ácido graso por ejemplo que comprende bien éster de etilo de ácido graso (FAEE) y/o éster de butilo de ácido graso (FABE). El biodiésel producido puede ser una mezcla de ésteres de alquilo de ácidos grasos.

La "ruta de biosíntesis de biodiésel" como se hace referencia en la presente memoria se refiere a la ruta desde acil graso CoA a biodiésel. Las enzimas ejemplares en esta ruta incluyen pero no están limitadas a acil transferasa [EC:2.3.-.] y acil-CoA sintetasa/ácido graso de cadena larga □CoA ligasa [EC:6.2.3.1].

La "ruta de biosíntesis de ácidos grasos" se refiere a la ruta desde acetil CoA a la producción de un acil graso CoA. Las enzimas ejemplares en esta ruta incluyen pero no están limitadas a acetil-CoA carboxilasa/biotina carboxilasa [EC:6.3.4.14/EC:6.4.1.2/EC:6.4.1.3], maloniltransferasa/malonato descarboxilasa [EC:2.3.1.39], ácido graso sintasa [EC:2.3.1.85/EC:2.3.1.86/EC:2.3.1.-], 3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa [EC:2.3.1.41/EC:2.3.1.179/EC:2.3.1.180], 3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] reductasa [EC: 1.1.1.100], 3-hidroximiristoil ACP deshidratación [EC:4.2.1.-], 3-hidroxiacil-[proteína transportadora de acilo] deshidratación [EC:4.2.1.60], enoil-[proteína transportadora de acilo] reductasa [EC: 1.3.1.9, EC:1.3.1.-, EC: 1.3.1.-], acil graso-ACP tioesterasa [EC:3.1.2.- 3.1.2.14], oleoil-[proteína de acilo] hidrolasa [EC:3.1.2.14], acil-[proteína transportadora de acilo] desaturasa [EC: 1.14.19.2], acetil-CoA aciltransferasa [EC:2.3.1.16], 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa [EC:1.1.1.35], enoil-CoA hidratasa / 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga [EC: 1.1.1.211, EC:4.2.1.17], enoil-CoA hidratasa [EC:4.2.1.17], trans-2-enoil-CoA reductasa [EC: 1.3.1.38], palmitoil-proteína tioesterasa [EC:3.1.2.22], proteína de elongación de ácidos grasos [EC:2.3.1.-], 3-cetoacil-CoA sintasa [EC:2.3.1.-], beta-ceto reductasa [EC: 1.1.1.-], 3-hidroxi acil-CoA deshidratación [EC:4.2.1.-], enoil reductasa [EC: 1.3.1 .-], palmitoil-CoA hidrolasa [EC:3.1.2.2].

Debe apreciarse que la invención puede llevarse a la práctica usando ácidos nucleicos cuya secuencia varía de las secuencias ejemplificadas específicamente en la presente memoria siempre que realicen sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína o péptido, esto significa que la proteína o péptido codificado tiene sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácidos nucleicos que representan secuencias de promotor, la secuencia variante tendrá la capacidad de estimular la expresión de uno o más genes. Dichos ácidos nucleicos pueden referirse en la presente memoria como "variantes funcionalmente equivalentes". Como ejemplo, las variantes funcionalmente equivalentes de un ácido nucleico incluyen variantes alélicas, fragmentos de un gen, genes que incluyen mutaciones (delección, inserción, sustituciones de nucleótidos y semejantes) y/o polimorfismos y semejantes. Los genes homólogos de otros microorganismos también pueden considerarse como ejemplos de variantes funcionalmente equivalentes de las secuencias ejemplificadas específicamente en la presente memoria. Éstos incluyen genes homólogos en especies tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *C. ljungdahlii*, *Acinetobacter baylyi* detalles de los cuales están disponibles públicamente en sitios de internet tales como Genbank o NCBI. La expresión "variantes funcionalmente equivalentes" también debe tomarse que incluye ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de la optimización de codones para un organismo particular. Las "variantes funcionalmente equivalentes" de un ácido nucleico en la presente memoria tendrán preferiblemente al menos aproximadamente 70%, preferiblemente aproximadamente 80%, más preferiblemente aproximadamente 85%, preferiblemente aproximadamente 90%, preferiblemente aproximadamente 95% o mayor, identidad de secuencia de ácido nucleico con el ácido nucleico

identificado.

También debería apreciarse que la invención puede llevarse a la práctica usando polipéptidos cuya secuencia varía de las secuencias de aminoácidos ejemplificadas específicamente en la presente memoria. Estas variantes pueden referirse en la presente memoria como "variantes funcionalmente equivalentes". Una variante funcionalmente equivalente de una proteína o un péptido incluye aquellas proteínas o péptidos que comparten al menos 40%, preferiblemente 50%, preferiblemente 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 75%, preferiblemente 80%, preferiblemente 85%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95% o mayor, identidad de aminoácidos con la proteína o péptido identificado y tiene sustancialmente la misma función que el péptido o proteína de interés. Dichas variantes incluyen en su alcance fragmentos de una proteína o péptido en los que el fragmento comprende una forma truncada del polipéptido en el que las deleciones pueden ser de 1 a 5, a 10, a 15, a 20, a 25 aminoácidos, y pueden extenderse de residuo 1 a 25 en cualquiera de los extremos del polipéptido, y en el que las deleciones pueden ser de cualquier longitud en la región; pueden estar en una localización interna. Las variantes funcionalmente equivalentes de los polipéptidos específicos en la presente memoria también deben tomarse que incluyen polipéptidos expresados por genes homólogos en otras especies de bacterias, por ejemplo, como se ejemplifica en el párrafo anterior.

"Sustancialmente la misma función" tal y como se usa en la presente memoria se pretende que signifique que el ácido nucleico o polipéptido es capaz de realizar la función del ácido nucleico o polipéptido del que es una variante. Por ejemplo, una variante de una enzima de la invención será capaz de catalizar la misma reacción que esa enzima. Sin embargo, no debe tomarse que significa que la variante tiene el mismo nivel de actividad que el polipéptido o ácido nucleico del que es una variante.

Se puede evaluar si una variante funcionalmente equivalente tiene sustancialmente la misma función que el ácido nucleico o polipéptido del que es una variante usando métodos conocidos para un experto en la técnica. Sin embargo, como ejemplo, los ensayos para ensayar para actividad aciltransferasa se describen en Kalscheuer et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol., 70: 71 19-25; Stöveken et al., 2005, J. Bacteriol., 187: 1369-76.

"Sobreexpresar", "sobreexpresión" y términos y expresiones semejantes cuando se usan en relación con la invención deben tomarse que incluyen ampliamente cualquier incremento en la expresión de una o más proteínas (incluyendo la expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican las mismas) comparado con el nivel de expresión de la proteína (incluyendo ácidos nucleicos) de un microorganismo parental en las mismas condiciones. No debe tomarse que significa que la proteína (o ácido nucleico) se expresa a ningún nivel particular.

Un "microorganismo parental" es un microorganismo usado para generar un microorganismo recombinante de la invención. El microorganismo parental puede ser uno que aparece en la naturaleza (es decir, un microorganismo de tipo salvaje) o uno que se ha modificado previamente pero que no expresa o sobreexpresa una o más de las enzimas objeto de la presente invención. De acuerdo con esto, los microorganismos recombinantes de la invención pueden haber sido modificados para expresar o sobreexpresar una o más enzimas que no se expresaban o sobreexpresaban en el microorganismo parental.

Los términos "construcciones" o "vectores" de ácidos nucleicos y términos semejantes deben tomarse que incluyen ampliamente cualquier ácido nucleico (incluyendo ADN y ARN) adecuado para uso como un vehículo para transferir material genético en una célula. Los términos deben tomarse que incluyen plásmidos, virus (incluyendo bacteriófago), cósmidos y cromosomas artificiales. Las construcciones o vectores pueden incluir uno o más elementos reguladores, un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y/o un marcador seleccionable. En una realización particular, las construcciones o vectores están adaptados para permitir la expresión de uno o más genes codificados por la construcción o vector. Las construcciones o vectores de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos desnudos, así como ácidos nucleicos formulados con uno o más agentes para facilitar la administración a una célula (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico).

Los inventores han mostrado sorprendentemente que un microorganismo recombinante puede prepararse por ingeniería para producir biodiésel a partir de un sustrato que contiene CO. Los inventores han preparado por ingeniería organismos recombinantes y han inventado métodos para uso de éstos para la producción del biodiésel derivado de ácidos grasos. Los inventores también contemplan que otros derivados de ácidos grasos incluyendo ácidos grasos libres, alcanos y alquenos podrían producirse como parte de la invención. Todos estos productos pueden derivar de intermedios clave de ácidos grasos de acil-CoA de ácidos grasos (tioésteres con CoA) o ACP de ácidos grasos (Proteínas transportadoras de acilo).

El biodiésel producido por la invención es un compuesto energéticamente denso de cadena larga, y su síntesis requiere que la célula invierta energía en la forma de nucleósidos trifosfato tal como ATP. En un proceso aeróbico y/o usando azúcar como un sustrato requiere un suministro de energía suficiente de la glicolisis para rendir varias moléculas de ATP. La producción de biodiésel a través de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en un proceso aeróbico y/o usando azúcar como un sustrato se produce de una manera relativamente directa debido a las moléculas de C5 pentosa y C6 hexosa que se convierten en ácidos grasos de cadena más larga dirigido por la alta disponibilidad de ATP, aunque se requiere un número mayor de reacciones. La presente invención puede tener

ventajas sobre la producción de biocombustibles a partir de sustratos basados en azúcar y proporciona un medio alternativo para la producción de biodiésel utilizando gases residuales incluyendo monóxido de carbono de procesos industriales.

5 Para los acetógenos anaerobios que usan un sustrato C1 como CO o CO₂, es más difícil producir moléculas largas tales como ácido grasos ya que a diferencia de la glicolisis, no se gana energía neta a partir de la fosforilación a nivel de sustrato en la ruta de fijación de carbono Wood-Ljungdahl, de hecho la activación de CO₂ a formato incluso requiere una molécula de ATP y se requiere un gradiente de membrana. Hasta ahora, el producto con más átomos de carbono reportado en acetógenos (organismos tanto nativos como recombinantes) son los compuestos C4 butanol y 2,3-butanodiol.

10 Los inventores han mostrado que es posible producir estas moléculas de ácido graso de cadena más larga tal como biodiésel usando la materia prima base de C1 CO mediante el intermedio acetil CoA. Como el sustrato CO o CO₂ está en la ruta Wood-Ljungdahl canalizada directamente en acetil-CoA (el punto de partida de la biosíntesis de ácidos grasos), son necesarias menos reacciones y enzimas que de azúcares mediante glicolisis, haciendo que el proceso sea más rápido y más eficiente incluso cuando está disponible menos ATP. Aunque está disponible menos
15 ATP en los acetógenos carboxidotróficos, los inventores consideran que esta ruta más directa puede sostener un mayor flujo metabólico (debido a una mayor fuerza motriz química de reacciones intermedias).

En una realización particular de la invención, los inventores han encontrado que la producción de biodiésel (un éster de alquilo de ácidos grasos) por un microorganismo recombinante de la invención se permite por la introducción en el microorganismo de una acil transferasa exógena. Los métodos de producción tradicionales de biodiésel implican la transesterificación de un lípido (triglicérido) en presencia de alcohol para rendir glicerina y biodiésel. Sin embargo, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante que es capaz de co-producir tanto alcohol (incluyendo etanol y/o butanol) como ácido graso. Los inventores creen que esta co-producción proporciona los sustratos requeridos para proporcionar una fuerza directriz para la producción *in vivo* de biodiésel que comprende bien FAEE (Ésteres de etilo de ácidos grasos) y/o FABE (Ésteres de butilo de ácidos grasos).
20

25 Para conseguir una realización de la invención, una aciltransferasa no específica (éster de cera sintasa/acil Coenzima A:diacilglicerol aciltransferasa) de *Acinetobacter baylyi* se introdujo en el microorganismo acetogénico. El microorganismo produce un alcohol (por ejemplo, etanol o butanol) y un acil graso-CoA que se convierten en un éster de alquilo de ácido graso (es decir, biodiésel) (Fig. 1) (Kalscheuer et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol., 70: 71 19-25; Stöveken et al., 2005, J. Bacteriol., 187: 1369-76). Las acil-CoA de ácido graso son un producto directo de ácidos grasos y se producen por la acción de por ejemplo acil-CoA sintetasa (ácido graso de cadena larga--CoA ligasa) que puede estar presente en acetógenos carboxidotróficos. La producción *in vivo* de FAEE usando esta enzima no se ha mostrado excepto con el suministro de ácidos grasos o alcohol suplementarios a la reacción externamente (Kalscheuer et al., 2006, Microbiology, 152, 2529-36). Aunque todos los organismos producen precursores de ácidos grasos, para los organismos que no producen (altas cantidades de) alcoholes como *E. coli*, son necesarias modificaciones genéticas adicionales. La producción bacteriana de FABE no se ha demostrado previamente en absoluto. La presente invención no requiere dicho suministro externo de alcohol por lo tanto puede proporcionar varias ventajas. Incluidas en estas ventajas está la reducción del coste de la materia prima base, una reducción significativa de la complejidad del equipo y control de parámetros y etapas de manejo y separación limitadas requeridas por el proceso.
30

35 Aunque los inventores han demostrado la eficacia de la invención en *Clostridium autoethanogenum*, contemplan que la invención es aplicable al grupo más amplio de microorganismos acetogénicos carboxidotróficos y se discute adicionalmente en la presente memoria.

Microorganismos

45 Como se ha discutido anteriormente en la presente memoria, la invención proporciona un microorganismo recombinante capaz de producir biodiésel, y opcionalmente uno o más otros productos, por fermentación de un sustrato que comprende CO.

En una realización particular, el microorganismo se adapta para expresar una o más enzimas exógenas en la ruta de biosíntesis de biodiésel. En otra realización, el microorganismo se adapta para sobreexpresar una o más enzimas endógenas en la ruta de biosíntesis de biodiésel.

50 En una realización, el microorganismo recombinante se adapta para producir una mayor cantidad de biodiésel de la que se produciría por un microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante.

En una realización, el microorganismo parental a partir del que se deriva el microorganismo recombinante es capaz de fermentar un sustrato que comprende CO para producir un alcohol, pero no para convertir el alcohol en un biodiésel, y el microorganismo recombinante se adapta para expresar una o más enzimas implicadas en la conversión de etanol a biodiésel.
55

En una realización, el microorganismo acetogénico carboxidotrófico recombinante se adapta además para expresar una o más enzimas exógenas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En un aspecto adicional, el microorganismo

se adapta además para sobreexpresar una o más enzimas endógenas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos.

El microorganismo puede adaptarse para expresar o sobreexpresar la una o más enzimas por cualquier número de métodos recombinantes incluyendo, por ejemplo, incrementar la expresión de genes endógenos (por ejemplo, mediante la introducción de un promotor más fuerte o constitutivo para dirigir la expresión de un gen), incrementar el número de copias de un gen que codifica una enzima particular mediante la introducción de ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar la enzima, o mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno que codifica y está adaptado para expresar una enzima que no está presente naturalmente en el microorganismo parental.

En determinadas realizaciones, el microorganismo parental puede transformarse para proporcionar una combinación de a) expresión incrementada o sobreexpresión de uno o más genes endógenos y b) introducción de uno o más genes exógenos. Por ejemplo, uno o más genes que codifican una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de biodiésel y opcionalmente de ácidos grasos pueden ser nativos para el microorganismo parental, pero pueden no incluir uno o más otros genes que codifican una o más otras enzimas en la ruta.

En una realización, la una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de biodiésel se eligen del grupo que consiste en acil transferasa y una variante funcionalmente equivalente de ésta. Sólo como ejemplo, se proporciona información de secuencia para acil transferasa.

Las enzimas y variantes funcionales para uso en los microorganismos de la invención pueden derivar de cualquier fuente apropiada, incluyendo diferentes géneros y especies de bacterias, u otros organismos. Sin embargo, en una realización, la acil transferasa es la derivada de *Acinetobacter baylyi* como se describe en SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente de ésta. En una realización particular, la acil transferasa tiene las características identificativas de la aciltransferasa no específica YP_045555.1; Gene ID: 2879218 de *Acinetobacter baylyi*. Una acil-CoA sintetasa/ácido graso de cadena larga-CoA ligasa se proporciona por ejemplo con los números de acceso P69451 o GenelD: 946327.

En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para incrementar la expresión de uno o más ácidos nucleicos nativos para el microorganismo parental y dichos uno o más ácidos nucleicos codifican una o más de las enzimas como se hace referencia en la presente memoria anteriormente. En una realización, el uno o más ácido nucleico exógeno adaptado para incrementar la expresión es un elemento regulador. En una realización, el elemento regulador es un promotor. El promotor puede ser un promotor constitutivo que es preferiblemente altamente activo en condiciones de fermentación apropiadas. También podrían usarse promotores inducibles. El promotor puede seleccionarse del grupo que comprende agrupación génica Wood-Ljungdahl, un promotor de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, un promotor del operón del complejo Rnf, promotor del operón de ATP sintasa o promotores del operón de Fosfotransacetilasa/Acetato quinasa. Los expertos en la técnica apreciarán que otros promotores que puedan dirigir la expresión, preferiblemente un alto nivel de expresión en las condiciones de fermentación apropiadas, también serían efectivos como alternativas a las realizaciones ejemplificadas.

En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar una o más de las enzimas como se hace referencia en la presente memoria anteriormente. En una realización, los microorganismos comprenden uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar al menos dos de las enzimas. En otras realizaciones, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógeno que codifican y está adaptados para expresar tres de las enzimas. En otras realizaciones, el microorganismo comprende uno o más ácido nucleicos exógenos que codifican y está adaptados para expresar cinco de las enzimas.

En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una acil transferasa o una variante funcionalmente equivalente de ésta.

En una realización, la acil transferasa está codificada por la secuencia de ácido nucleico ejemplificada en SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente de ésta.

El microorganismo puede comprender uno o más ácidos nucleicos exógenos. Cuando es deseable transformar el microorganismo parental con dos o más elementos genéticos (tales como genes o elementos reguladores (por ejemplo, un promotor)) éstos pueden estar contenidos en uno o más ácidos nucleicos exógenos.

En una realización, el uno o más ácidos nucleicos exógenos es una construcción o vector de ácido nucleico, en una realización particular un plásmido, que codifica una o más de las enzimas referidas anteriormente en la presente memoria en cualquier combinación.

Los ácidos nucleicos exógenos pueden permanecer en estado extra-cromosómico después de la transformación del microorganismo parental o pueden integrarse en el genoma del microorganismo parental. De acuerdo con esto, pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga e integración dirigida en el genoma del huésped) o expresión y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otros elementos o

secuencias reguladoras).

En una realización, los ácidos nucleicos exógenos que codifican una o más enzimas como se menciona en la presente memoria anteriormente comprenderán además un promotor adaptado para estimular la expresión de una o más enzimas codificadas por los ácidos nucleicos exógenos. El promotor puede ser un promotor constitutivo que es preferiblemente altamente activo en condiciones de fermentación apropiadas. También podrían usarse promotores inducibles. El promotor puede seleccionarse del grupo que comprende agrupación génica Wood-Ljungdahl, un promotor de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, un promotor del operón del complejo Rnf, promotor del operón de ATP sintasa y promotores de Fosfoacetilasa/Acetato quinasa. Los expertos en la técnica apreciarán que otros promotores que puedan dirigir la expresión, preferiblemente un alto nivel de expresión en condiciones de fermentación apropiadas, serían efectivos como alternativas a las realizaciones ejemplificadas.

En una realización, el ácido nucleico exógeno es un plásmido de expresión.

En una realización, el microorganismo acetogénico carboxidotrófico parental se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia product*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

En una realización particular del primer o segundo aspectos, el microorganismo parental se selecciona del grupo de Clostridia carboxidotrófica que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*.

En una realización, el microorganismo se selecciona de una agrupación de Clostridia carboxidotrófica que comprende las especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y "*C. ragsdalei*" y aislados relacionados. Éstos incluyen pero no están limitados a cepas *C. autoethanogenum* JAI-1^T (DSM10061) (Abrini, Naveau, y Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO/2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC^T (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, y Yang, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (patente US 5.593.886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (patente US 6.368.819), *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (patente US 6.368.819), o "*C. ragsdalei* P11Tm" (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), y aislados relacionados tal como "*C. coskatii*" (patente US 2011/0229947), "*Clostridium* sp. MT351" (Michael Tyurin y Kiriukhin, 2012) y cepas mutantes de éstas tal como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. tesis de doctorado, North Carolina State University, 2010).

Estas cepas forman una subagrupación en la agrupación I de ARNr de Clostridia (Collins et al., 1994), que tiene al menos 99% de identidad a nivel de gen de ARNr 16S, aunque son especies distintas como se determina por reasociación de ADN-ADN y experimentos de huella de ADN (WO 2008/028055, patente US 2011/0229947).

Las cepas de esta agrupación se definen por características comunes, teniendo tanto un genotipo como fenotipo similar, y todas comparten el mismo modo de conservación de energía y metabolismo fermentativo. Las cepas de esta agrupación carecen de citocromos y conservan la energía a través de un complejo Rnf.

Todas las cepas de esta agrupación tienen un tamaño de genoma de alrededor de 4,2 MBp (Köpke et al., 2010) y una composición en GC de alrededor de 32% en moles (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2010; Tanner et al., 1993) (WO 2008/028055; patente US 2011/0229947), y operones de genes clave esenciales conservados que codifican enzimas de la ruta Wood-Ljungdahl (Monóxido de carbono deshidrogenasa, Formil-tetrahidrofolato sintetasa, Metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, Formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, Metileno-tetrahidrofolato reductasa, y Monóxido de carbono deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa), hidrogenasa, formato deshidrogenasa, complejo Rnf (*rnfCDGEAB*), piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, aldehído:ferredoxina oxidorreductasa (Köpke et al., 2010, 2011). Se ha encontrado que la organización y número de genes de la ruta Wood-Ljungdahl, responsables de la captación de gas, es la misma en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos (Köpke et al., 2011).

Todas las cepas tienen una morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico son entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilas (temperatura de crecimiento óptima entre 30-37°C) y estrictamente anaerobias (Abrini et al., 1994; Tanner et al., 1993) (WO 2008/028055). Además, todas comparten los mismos rasgos filogenéticos principales, tal como mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), crecimiento autotrófico fuerte en gases que contienen CO con velocidades de crecimiento similares, y un perfil metabólico con etanol y ácido acético como producto final de fermentación principal, con pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formadas en determinadas condiciones (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2011 ; Tanner et al., 1993). Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización de sustrato de varios azúcares (por ejemplo, ramnosa, arabinosa), ácidos (por ejemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por ejemplo, arginina, histidina), u otros sustratos (por ejemplo, betaína, butanol). Se encontró que algunas de las especies eran auxótrofas para determinadas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina) mientras otras no lo eran. La reducción de ácidos carboxílicos a sus alcoholes correspondientes se ha mostrado en un rango de estos organismos (Perez, Richter, Loftus, y Angenent, 2012).

Los rasgos descritos son por lo tanto no específicos para un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino que son rasgos generales para Clostridia carboxidotróficas que sintetizan etanol. Así, puede anticiparse que la invención funciona en todas estas cepas, aunque puede haber diferencias en el rendimiento.

5 Los microorganismos acetogénicos carboxidotróficos recombinantes de la invención pueden prepararse a partir de un microorganismo acetogénico carboxidotrófico parental y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquier número de técnicas conocidas en la técnica para producir microorganismos recombinantes. Sólo como ejemplo, la transformación (incluyendo transducción o transfección) puede conseguirse por electroporación, electrofusión, ultrasonificación, transformación mediada por polietilén glicol, conjugación, o competencia química y natural. Las técnicas de transformación adecuadas se describen por ejemplo en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989.

10 La electroporación se ha descrito para varios acetógenos carboxidotróficos como *C. ljungdahlii* (Köpke et al., 2010; Leang, Ueki, Nevin, y Lovley, 2012) (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *C. autoethanogenum* (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *Acetobacterhim woodii* (Strätz, Sauer, Kuhn, y Dürre, 1994) o *Moorella thermoacetica* (Kita et al., 2012) y es un método estándar usado en muchas Clostridia tal como *C. acetobutylicum* (Mermelstein, Welker, Bennett, y Papoutsakis, 1992), *C. cellulolyticum* (Jennert, Tardif, Young, y Young, 2000) o *C. thermocellum* (MV Tyurin, Desai, y Lynd, 2004).

La electrofusión se ha descrito para *Clostridium sp.* acetogénica MT351 (Tyurin y Kiriukhin, 2012).

20 La inducción de profagos se ha descrito para acetógeno carboxidotrófico así como en el caso de *C. scatologenes* (Prasanna Tamarapu Parthasarathy, 2010, Development of a Genetic Modification System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 for Generation of Mutants, Masters Project Western Kentucky University).

La conjugación se ha descrito como método de elección para el acetógeno *Clostridium difficile* (Herbert, O'Keeffe, Purdy, Elmore, y Minton, 2003) y muchas otras Clostridia incluyendo *C. acetobutylicum* (Williams, Young, y Young, 1990).

En una realización, la cepa parental usa CO como su única fuente de carbono y energía.

25 En una realización, el microorganismo parental es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693. En otra realización particular, el microorganismo es *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).

Ácidos nucleicos

30 La invención también proporciona uno o más ácidos nucleicos o construcciones de ácido nucleico para uso en la generación de un microorganismo recombinante de la invención.

35 En una realización, los ácidos nucleicos comprenden secuencias que codifican una o más de las enzimas en la ruta de biosíntesis de biodiésel, que cuando se expresan en un microorganismo permiten que el microorganismo produzca biodiésel por fermentación de un sustrato que comprende CO. En una realización particular, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica dos o más enzimas que cuando se expresan en un microorganismo permiten que el microorganismo produzca biodiésel por fermentación de un sustrato que comprende CO. En una realización, los ácidos nucleicos de la invención codifican tres de dichas enzimas, o cinco de dichas enzimas.

En una realización particular, las enzimas se eligen del grupo que consiste en acil transferasa y una variante funcionalmente equivalente de ésta.

40 Las secuencias de aminoácidos y secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican enzimas descritas en la presente memoria se proporcionan en la presente memoria o pueden obtenerse de GenBank como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente secuencias de ácidos nucleicos alternativas que codifican las enzimas o variantes funcionalmente equivalentes de éstas, teniendo en cuenta la información contenida en la presente memoria, en GenBank y otras bases de datos, y el código genético.

45 En una realización, la acil transferasa está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de ésta.

En una realización, el ácido nucleico codifica además una o más enzimas exógenas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En un aspecto adicional, el ácido nucleico codifica además una o más enzimas endógenas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos.

50 Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender además un promotor. El promotor puede permitir la expresión constitutiva de los genes bajo su control. Sin embargo, también pueden emplearse promotores inducibles. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente promotores para uso en la invención. Preferiblemente, el promotor puede dirigir un alto nivel de expresión en condiciones de fermentación apropiadas. Puede usarse un promotor de la agrupación Wood-Ljungdahl. Puede usarse un promotor de Fosfoacetilasa/Acetato quinasa. El promotor puede

ser de *C. autoethanogenum*.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden permanecer en estado extra-cromosómico después de la transformación de un microorganismo parental o pueden adaptarse para integración en el genoma del microorganismo. De acuerdo con esto, los ácidos nucleicos de la invención pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar en la integración (por ejemplo, una región que permita la recombinación homóloga e integración dirigida en el genoma del huésped) o expresión estable y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otras secuencias reguladoras).

En una realización, el ácido nucleico es una construcción o vector de ácido nucleico. En una realización particular, la construcción o vector de ácido nucleico es una construcción o vector de expresión, sin embargo, otras construcciones y vectores, tales como las usadas para clonar están englobadas por la invención. En una realización particular, la construcción o vector de expresión es un plásmido.

Se apreciará que una construcción/vector de expresión de la presente invención puede contener cualquier número de elementos reguladores además del promotor, así como genes adicionales adecuados para la expresión de proteínas adicionales, si se desea. La construcción/vector de expresión puede incluir un promotor. La construcción/vector de expresión puede incluir dos o más promotores. La construcción/vector de expresión puede incluir un promotor para cada gen que se va a expresar. La construcción/vector de expresión puede incluir uno o más sitios de unión ribosomales, preferiblemente un sitio de unión ribosomal para cada gen que se va a expresar

Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de ácido nucleico y secuencias de construcción/vector descritas en la presente memoria pueden contener nucleótidos conectores estándar tales como los requeridos para sitios de unión al ribosoma y/o sitios de restricción. No debería interpretarse que dichas secuencias conectoras se requieren y no proporcionan una limitación en las secuencias definidas.

Los ácidos nucleicos y construcciones de ácido nucleico, incluyendo construcciones/vectores de expresión de la invención pueden construirse usando cualquier número de técnicas estándar en la técnica. Por ejemplo, puede usarse síntesis química o técnicas recombinantes. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al (Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Las técnicas adicionales ejemplares se describen en la sección de Ejemplos en la presente memoria posteriormente. Esencialmente, los genes individuales y elementos reguladores se unirán de forma operativa entre sí de manera que los genes pueden expresarse para formar las proteínas deseadas. Los vectores adecuados para uso en la invención serán apreciados por los expertos en la técnica. Sin embargo, como ejemplo, pueden ser adecuados los vectores siguientes: vectores pMTL80000, pIMP1, pJIR750, y los plásmidos ejemplificados en la sección de Ejemplos en la presente memoria posteriormente.

Debe apreciarse que los ácidos nucleicos de la invención pueden estar en cualquier forma apropiada, incluyendo ARN, ADN, o ADNc.

La descripción también proporciona organismos huésped, particularmente microorganismos, e incluyendo virus, bacterias, y levaduras, que comprenden uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

Método para producir microorganismos

El uno o más ácidos nucleicos exógenos pueden administrarse a un microorganismo parental como ácidos nucleicos desnudos o pueden formularse con uno o más agentes para facilitar el proceso de transformación (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico). El uno o más ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, o combinaciones de éstos, según sea apropiado. Pueden usarse inhibidores de restricción; véase, por ejemplo, Murray, N.E. et al. (2000) Microbial. Molec. Biol. Rev. 64, 412.)

Los microorganismos de la invención pueden prepararse a partir de un microorganismo parental y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquier número de técnicas conocidas en la técnica para producir microorganismos recombinantes. Sólo como ejemplo, la transformación (incluyendo transducción o transfección) puede conseguirse por electroporación, ultrasonificación, transformación mediada por polietilén glicol, competencia química o natural, transformación de protoplastos, inducción de profago o conjugación. Las técnicas de transformación adecuadas se describen, por ejemplo, en, Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989.

La electroporación se ha descrito para varios acetógenos carboxidotróficos como *C. ljungdahlii* (Köpke et al. 2010, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 107: 13087-92; PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *C. autoethanogenum* (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), o *Acetobacterium woodii* (Straetz et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60:1033-37) y es un método estándar usando en muchas Clostridia tal como *C. acetobutylicum* (Mermelstein et al. 1992, Biotechnology, 10, 190-195), *C. cellulolyticum* (Jennert et al., 2000, Microbiology, 146: 3071-3080) o *C. thermocellum* (Tyurin et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol. 70: 883-890). La inducción de profago se ha demostrado para acetógeno carboxidotrófico, así como en el caso de *C. scatologenes* (Prasanna Tamarapu Parthasarathy, 2010, Development of a Genetic Modification System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 for Generation of Mutants,

Masters Project Western Kentucky University), mientras la conjugación se ha descrito como método de elección para muchas Clostridia incluyendo *Clostridium difficile* (Herbert et al., 2003, FEMS Microbiol. Lett. 229: 103-110) o *C. acetobutylicum* (Williams et al., 1990, J. Gen. Microbiol. 136: 819-826) y podría usarse de una forma similar para acetógenos carboxidotróficos.

5 En determinadas realizaciones, debido a los sistemas de restricción que son activos en el microorganismo que se va a transformar, es necesario metilar el ácido nucleico que se va a introducir en el microorganismo. Esto puede hacerse usando una variedad de técnicas, incluyendo las descritas más adelante, y ejemplificadas adicionalmente en la sección de Ejemplos en la presente memoria posteriormente.

10 Como ejemplo, en una realización, un microorganismo recombinante de la invención se produce por un método que comprende las etapas siguientes:

introducción en un microorganismo lanzadera de (i) una construcción/vector de expresión como se describe en la presente memoria y (ii) una construcción/vector de metilación que comprende un gen de metiltransferasa;

expresión del gen de metiltransferasa;

aislamiento de una o más construcciones/vectores del microorganismo lanzadera; e,

15 introducción de la una o más construcciones/vectores en un microorganismo de destino.

En una realización, el gen de metiltransferasa se expresa constitutivamente. En otra realización, la expresión del gen de metiltransferasa es inducida.

20 El microorganismo lanzadera es un microorganismo, preferiblemente un microorganismo negativo para restricción, que facilita la metilación de las secuencias de ácido nucleico que constituyen la construcción/vector de expresión. En una realización particular, el microorganismo lanzadera es una *E. coli*, *Bacillus subtilis*, o *Lactococcus lactis* negativo para restricción.

La construcción/vector de metilación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una metiltransferasa.

25 Una vez la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación se introducen en el microorganismo lanzadera, el gen de metiltransferasa presente en la construcción/vector de metilación se induce. La inducción puede ser por cualquier sistema de promotor adecuado, aunque en una descripción particular, la construcción/vector de metilación comprende un promotor lac inducible y se induce por la adición de lactosa o un análogo de ésta, más preferiblemente isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG). Otros promotores adecuados incluyen el sistema ara, tet, o T7. El promotor de la construcción/vector de metilación puede ser un promotor constitutivo.

30 En una realización particular, la construcción/vector de metilación tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo lanzadera de manera que cualesquiera genes presentes en la construcción/vector de metilación se expresan en el microorganismo lanzadera. Preferiblemente, la construcción/vector de expresión tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo de destino de manera que cualesquiera genes presentes en la construcción/vector de expresión se expresan en el microorganismo de destino.

35 La expresión de la enzima metiltransferasa resulta en la metilación de los genes presentes en la construcción/vector de expresión. La construcción/vector de expresión puede aislarse a partir del microorganismo lanzadera según uno cualquiera de un número de métodos conocidos. Sólo como ejemplo, la metodología descrita en la sección de Ejemplos descrita en la presente memoria posteriormente puede usarse para aislar la construcción/vector de expresión.

En una realización particular, ambos construcción/vector se aíslan simultáneamente.

40 La construcción/vector de expresión puede introducirse en el microorganismo de destino usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, como ejemplo, puede usarse la metodología descrita en la sección de Ejemplos descrita en la presente memoria posteriormente. Como la construcción/vector de expresión está metilada, las secuencias de ácido nucleico presentes en la construcción/vector de expresión pueden ser incorporadas en el microorganismo de destino y expresarse con éxito.

45 Se prevé que un gen de metiltransferasa puede introducirse en un microorganismo lanzadera y sobreexpresarse. Así, en una realización, la enzima metiltransferasa resultante puede recogerse usando métodos conocidos y usarse *in vitro* para metilar un plásmido de expresión. La construcción/vector de expresión puede introducirse entonces en el microorganismo de destino para expresión. En otra realización, el gen de metiltransferasa se introduce en el genoma del microorganismo lanzadera seguido de la introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo lanzadera, aislamiento de una o más construcciones/vectores del microorganismo lanzadera y después introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo de destino.

50 Se prevé que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación como se ha definido anteriormente pueden combinarse para proporcionar una composición de materia. Dicha composición tiene una

utilidad particular para sortear los mecanismos de barrera de restricción para producir los microorganismos recombinantes de la invención.

En una realización particular, la construcción/vector de expresión y/o la construcción/vector de metilación son plásmidos.

5 Los expertos en la técnica apreciarán un número de metiltransferasas adecuadas para uso en la producción de los microorganismos de la invención. Sin embargo, como ejemplo, pueden usarse la metiltransferasa del fago $\Phi T1$ de *Bacillus subtilis* y la metiltransferasa descrita en los Ejemplos en la presente memoria posteriormente. En una realización, la metiltransferasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o es una variante funcionalmente equivalente de ésta. Los ácidos nucleicos que codifican metiltransferasas adecuadas se apreciarán
10 fácilmente teniendo en cuenta la secuencia de la metiltransferasa deseada y el código genético. En una realización, el ácido nucleico que codifica una metiltransferasa es como se describe en los Ejemplos en la presente memoria posteriormente (por ejemplo, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 17, o es una variante funcionalmente equivalente de ésta).

15 Puede usarse cualquier número de construcciones/vectores adaptados para permitir la expresión de un gen de metiltransferasa para generar la construcción/vector de metilación. Sin embargo, como ejemplo, puede usarse el plásmido descrito en la sección de Ejemplos en la presente memoria posteriormente (por ejemplo, SEQ ID NO: 14).

Métodos de producción

20 La invención proporciona un método para la producción de biodiésel, y opcionalmente uno o más otros productos, por fermentación microbiana que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando un microorganismo recombinante de la invención. Los métodos de la invención pueden usarse para reducir las emisiones atmosféricas totales de carbono de un proceso industrial.

Preferiblemente, la fermentación comprende las etapas de fermentar anaeróbicamente un sustrato en un biorreactor para producir al menos biodiésel usando un microorganismo recombinante de la invención.

En una realización el método comprende las etapas de:

- 25 a. proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos de la invención; y
b. fermentar anaeróbicamente el cultivo en el biorreactor para producir al menos biodiésel.

En una realización, el método comprende las etapas de:

- a. capturar el gas que contiene CO producido como resultado de un proceso industrial;
30 b. fermentación anaeróbica del gas que contiene CO para producir biodiésel por un cultivo que contiene uno o más microorganismos de la invención.

En una realización de la invención, el sustrato gaseoso fermentado por el microorganismo es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato gaseoso puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como un subproducto de un proceso industrial, o de alguna otra fuente tal como de gases de escape de automóviles. En determinadas
35 realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de productos metálicos ferrosos, tal como una acería, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinado 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 estas realizaciones, el gas que contiene CO puede capturarse del proceso industrial antes de que sea emitido en la atmósfera, usando cualquier método conveniente. El CO puede ser un
40 componente de gas de síntesis (gas que comprende monóxido de carbono e hidrógeno). El CO producido a partir de procesos industriales normalmente se queman para producir CO₂ y por lo tanto la invención tiene una utilidad particular en la reducción de las emisiones del gas invernadero CO₂ y producción de biodiésel para uso como un biocombustible. Dependiendo de la composición del sustrato gaseoso que contiene CO, también puede ser deseable tratarlo para eliminar cualesquiera impurezas no deseadas, tal como partículas de polvo antes de introducirlo en la
45 fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o lavarse usando métodos conocidos.

Se apreciará que para que se produzca el crecimiento de las bacterias y la producción de biodiésel, además del gas sustrato que contiene CO, se necesitará alimentar al biorreactor un medio nutriente líquido adecuado.

En realizaciones particulares de los aspectos del método, la fermentación se produce en un medio de cultivo acuoso. En realizaciones particulares de los aspectos del método, la fermentación del sustrato tiene lugar en un biorreactor.

50 El sustrato y los medios pueden alimentarse en el biorreactor de una forma continua, discontinua o de lecho discontinuo. Un medio nutriente contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo usado. Los medios anaeróbicos adecuados para fermentación usando CO son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los medios adecuados se describen en Biebel (2001). En una realización de la invención, los medios

son como se describen en la sección de Ejemplos en la presente memoria posteriormente.

La fermentación se llevará a cabo de forma deseable en condiciones de fermentación apropiadas para que se produzca la producción de biodiésel. Las condiciones de reacción que deberían considerarse incluyen presión, temperatura, velocidad de flujo de gas, velocidad de flujo de líquido, pH del medio, potencial redox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de gas sustrato para asegurar que el CO en la fase líquida no se vuelva limitante, y concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición por producto.

Además, frecuentemente es deseable incrementar la concentración de CO de una corriente de sustrato (o presión parcial de CO en un sustrato gaseoso) y así incrementar la eficiencia de las reacciones de fermentación en las que CO es un sustrato. La operación a presiones incrementadas permite un incremento significativo en la velocidad de transferencia de CO desde la fase gas a la fase líquida donde puede ser captado por el micro-organismo como una fuente de carbono para la producción de fermentación. Eso significa a su vez que el tiempo de retención (definido como el volumen de líquido en el biorreactor dividido por la velocidad de flujo del gas de entrada) puede reducirse cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de presión atmosférica. Las condiciones óptimas de reacción dependerán parcialmente del micro-organismo particular de la invención usado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se realice a una presión mayor que la presión ambiental. También, como una velocidad de conversión dada de CO-a-biodiésel es en parte función del tiempo de retención del sustrato, y el conseguir un tiempo de retención deseado dicta a su vez el volumen requerido de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en gran medida el volumen del biorreactor requerido, y consecuentemente, el coste de capital del equipo de fermentación. Según los ejemplos proporcionados en la Patente US No. 5.593.886, el volumen del reactor puede reducirse en proporción lineal con incrementos en la presión de operación del reactor, es decir, los biorreactores operados a 10 atmósferas de presión sólo necesitan un décimo del volumen de aquellos operados a 1 atmósfera de presión.

Como ejemplo, se han descrito los beneficios de llevar a cabo una fermentación de gas-a-etanol a presiones elevadas. Por ejemplo, WO 02/08438 describe fermentaciones de gas-a-etanol realizadas bajo presiones de 30 psig y 75 psig, proporcionando productividades de etanol de 150 g/l/día y 369 g/l/día, respectivamente. Sin embargo, se encontró que las fermentaciones de ejemplo realizadas usando medios y composiciones de gas de entrada similares a presión atmosférica producen entre 10 y 20 veces menos de etanol por litro por día.

También es deseable que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que se asegure que la concentración de CO en la fase líquida no se vuelva limitante. Esto es porque una consecuencia de condiciones limitantes de CO puede ser que uno o más productos se consuman por el cultivo.

La composición de las corrientes de gas usadas para alimentar una reacción de fermentación puede tener un impacto significativo en la eficiencia y/o costes de esa reacción. Por ejemplo, el O₂ puede reducir la eficiencia de un proceso de fermentación anaeróbica. El procesamiento de gases no deseados o no necesarios en los estadios de un proceso de fermentación antes o después de la fermentación puede incrementar la carga en dichos estadios (por ejemplo, cuando la corriente de gas se comprime antes de entrar en un biorreactor, puede usarse energía innecesaria para comprimir gases que no son necesarios en la fermentación). De acuerdo con esto, puede ser deseable tratar corrientes de sustrato, particularmente corrientes de sustrato derivadas de fuentes industriales, para eliminar componentes no deseados e incrementar la concentración de componentes deseados.

En determinadas realizaciones, un cultivo de una bacteria de la invención se mantiene en un medio de cultivo acuoso. Preferiblemente, el medio de cultivo acuoso es un medio de crecimiento bacteriano anaeróbico mínimo. Los medios adecuados son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en las Patentes U.S. Nos. 5.173.429 y 5.593.886 y WO 02/08438, y como se describe en la sección de Ejemplos en la presente memoria posteriormente.

El biodiésel, o una corriente mixta que contiene biodiésel y/o uno o más otros productos, puede recuperarse del caldo de fermentación por métodos conocidos en la técnica, tal como destilación o evaporación fraccionada, pervaporación, arrastre de gas y fermentación extractiva, incluyendo, por ejemplo, extracción líquido-líquido. Los productos también pueden difundirse o secretarse en el medio, del que pueden extraerse por separación de fases.

En determinadas realizaciones preferidas de la invención, el biodiésel y uno o más productos se recuperan del caldo de fermentación por la eliminación continua de una parte del caldo del biorreactor, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración), y recuperando uno o más productos del caldo. Los alcoholes pueden recuperarse convenientemente por ejemplo por destilación. La acetona puede recuperarse por ejemplo por destilación. Cualesquiera ácidos producidos pueden recuperarse por ejemplo por adsorción en carbón activado. Las células microbianas separadas se devuelven preferiblemente al biorreactor de fermentación. El permeado sin células que permanece después de que hayan eliminado los alcoholes y ácidos también se devuelve preferiblemente al biorreactor de fermentación. Los nutrientes adicionales (tal como vitaminas B) pueden añadirse al permeado sin células para reponer el medio nutriente antes de que se devuelva al biorreactor.

También, si el pH del caldo se ajustó como se ha descrito anteriormente para aumentar la adsorción de ácido acético al carbón activado, el pH debería re-ajustarse a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de devolverlo al biorreactor.

Ejemplos

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1 - Producción de biodiésel a partir de CO

- 5 Un *Clostridium autoethanogenum* acetogénico carboxidotrófico se preparó por ingeniería con la aciltransferasa no específica de *Acinetobacter baylyi* para la producción de un biodiésel, éster de acilo de ácido graso, éster de butilo de ácido butanoico (FABE). La producción de butanol se demostró con anterioridad usando una cepa modificada genéticamente de *Clostridium autoethanogenum* (WO 2012/053905).

Cepas y condiciones de crecimiento:

- 10 Todas las etapas de subclonación se realizaron en *E. coli* usando cepas y condiciones de crecimiento estándar como se ha descrito previamente (Sambrook et al, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989; Ausubel et al, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 1987).

- 15 *C. autoethanogenum* DSM10061 y DSM23693 (un derivado de DSM10061) se obtuvieron de DSMZ (The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania). El crecimiento se llevó a cabo a 37°C usando condiciones y técnicas estrictamente anaeróbicas (Hungate, 1969, Methods in Microbiology, vol. 3B. Academic Press, Nueva York: 1 17- 132; Wolfe, 1971, Adv. Microb. Physiol., 6: 107-146). Se usó medio PETC químicamente definido sin extracto de levadura (Tab. 1) y 30 psi de gas residual de acería que contenía de monóxido de carbono (recogido del sitio de Nueva Zelanda Steel en Glenbrook, NZ; composición: 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂) como la única fuente de carbono y energía.

- 20 Tabla 1: medio PETC

Componente del medio	Concentración por 1,0L de medio
NH ₄ Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
Disolución de metal traza	10 ml
Disolución de vitaminas de Wolfe	10 ml
Resazurina (preparación madre 2 g/L)	0,5 ml
NaHCO ₃	2 g
Agente reductor	0,006-0,008% (v/v)
Agua destilada	Hasta 1 L, pH 5,5 (ajustado con HCl)
Disolución de vitaminas de Wolfe	por L de Preparación madre
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Hidrocloreuro de piridoxina	10 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-(+)-pantotenato de calcio	5 mg
Vitamina B12	0,1 mg

ES 2 655 214 T3

Componente del medio	Concentración por 1,0L de medio
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Ácido lipoico	5 mg
Tiamina	5 mg
Agua destilada	Hasta 1 L
Disolución de metal traza	por L de preparación madre
Ácido nitrilotriacético	2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1 g
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ .6H ₂ O	0,8 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,02 g
Na ₂ SeO ₃	0,02 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,02 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Preparación madre de agente reductor	por 100 ml de preparación madre
NaOH	0,9 g
Cisteína.HCl	4 g
Na ₂ S	4 g
Agua destilada	Hasta 100 mL

Construcción del plásmido de expresión:

Se usaron técnicas estándar de ADN recombinante y clonación molecular en esta invención y se describen por Sambrook et al, 1989 y Ausubel et al, 1987. La aciltransferasa no específica (YP_045555.1; Gene ID: 2879218) de *Acinetobacter baylyi* se optimizó por codones y se sintetizó (SEQ ID NO: 1).

Se aisló ADN genómico de *Clostridium autoethanogenum* DSM 10061 usando un método modificado por Bertram y Dürre (1989). Un cultivo de 100 ml de toda la noche se recogió (6.000 x g, 15 min, 4°C), se lavó con tampón fosfato de potasio (10 mM, pH 7,5) y se suspendió en 1,9 ml de tampón STE (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM sacarosa; pH 8,0). Se añadieron 300 µl de lisozima (~100.000 U) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min, seguido de la adición de 280 µl de una disolución al 10% (p/v) de SDS y otra incubación durante 10 min. El ARN se digirió a temperatura ambiente por la adición de 240 µl de una disolución de EDTA (0,5 M, pH 8), 20 µl de Tris-HCl (1 M, pH 7,5), y 10 µl de ARNasa A (Fermentas). Después, se añadieron 100 µl de Proteínasa K (0,5 U) y la proteólisis tuvo lugar durante 1-3 h a 37°C. Finalmente, se añadieron 600 µl de perclorato de sodio (5 M), seguido de una extracción con fenol-cloroformo y una precipitación con isopropanol. La cantidad y calidad del ADN se inspeccionaron espectrofotométricamente.

La región promotora de la fosfotransacetilasa/acetato quinasa de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 4) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos Ppta-ack-NotI-F (SEQ ID NO: 2: GAGCGGCCGCAATATGATATTTATGTCC) y Ppta-ack-Ndel-R (SEQ ID NO: 3: TTCCATATGTTTCATGTTTCCTCC) y ADN Polimerasa de Alta Fidelidad iProof (Bio-Rad Laboratories) aplicando el programa siguiente: desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (98°C durante 10 segundos), hibridación (55°C durante 30 segundos) y elongación (72°C durante 30 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 10 minutos).

La región promotora de 498 pb amplificada del operón de fosfotransacetilasa/acetato quinasa (Ppta-ack) se clonó en el vector lanzadera *E. coli*-Clostridium pMTL 85241 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009) usando los sitios de restricción NotI y NdeI y la cepa DH5 α -T1R (Invitrogen). Posteriormente, el gen de aciltransferasa sintetizado (SEQ ID NO: 1) se clonó en usando NdeI y EcoRI para formar el plásmido pMTL85245-atf (SEQ ID NO: 5; Fig. 2). El inserto se secuenció completamente usando los oligonucleótidos proporcionados en la Tabla 2 y los resultados confirmaron que el gen *atf* estaba desprovisto de mutaciones.

Tabla 2: Oligonucleótidos para secuenciación

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' a 3')	SEQ ID NO:
Atf-F1	AGACAACAACCTATGCATGTTGGAGGA	6
Atf-R1	GGGGATGTGCTGCAAGGCGA	7
Atf-F2	CATCATCAAGAAGGTTTGCAGCACAAT	8
Atf-R2	AGAGGTTCTCTTGGACCTGGAACAT	9
Atf-F3	TCGGTACCCGGGGATCCTCTA	10
Atf-R3	CATTCTGCTACTCCATCTACCATTGC	11

Metilación del ADN:

La metilación del plásmido de expresión de FAEE, pMTL85245-atf, se realizó *in vivo* en *E. coli* usando una metiltransferasa Tipo II híbrida sintetizada (SEQ ID NO: 12) diseñada a partir de los genes de metiltransferasa de *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* y *C. ljungdahlii*. La metiltransferasa se fusiona a un promotor lac inducible (SEQ ID NO: 13) en el vector pGS20 (SEQ ID NO: 14).

Tanto el plásmido de expresión como el plásmido de de metilación se transformaron en las mismas células de *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan negativas para restricción (Stratagene), lo que es posible debido a sus orígenes de replicación Gram(-) compatibles (altas copias de ColE1 en el plásmido de expresión y bajas copias de p15A en el plásmido de metilación). La metilación *in vivo* se indujo por la adición de 1 mM IPTG, y los plásmidos metilados se aislaron usando el Kit QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN). La mezcla resultante se usó para experimentos de transformación con *C. autoethanogenum* DSM23693, pero sólo el plásmido de expresión abundante (altas copias) tiene un origen de replicación Gram-(+) (repL) lo que le permite replicarse en Clostridia.

Transformación en *C. autoethanogenum*:

Durante el experimento de transformación completo, *C. autoethanogenum* DSM23693 se creció en medio PETC (Tab. 1) suplementado con 1 g/L de extracto de levadura y 10 g/l de fructosa, así como 30 psi de gas residual de acería (recogido en el sitio New Zealand Steel en Glenbrook, NZ; composición: 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂) como fuente de carbono.

Para preparar células competentes, un cultivo de 50 ml de *C. autoethanogenum* DSM23693 se subcultivó en medio fresco durante 3 días consecutivos. Estas células se usaron para inocular 50 ml de medio PETC que contenía 40 mM DL-treonina a una DO600nm de 0,05. Cuando el cultivo alcanzó una DO600nm de 0,4, las células se transfirieron a una cámara anaeróbica y se recogieron a 4.700 x g y 4°C. El cultivo se lavó dos veces con tampón de electroporación enfriado en hielo (270 mM sacarosa, 1 mM MgCl₂, 7 mM fosfato de sodio, pH 7,4) y finalmente se suspendió en un volumen de 600 μ l de tampón de electroporación fresco. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación pre-enfriada con un hueco de electrodo de 0,4 cm que contenía 1 μ g de la mezcla de plásmido metilado e inmediatamente se pulsó usando el sistema de electroporación de pulsador Gene Xcell (Bio-Rad) con los ajustes siguientes: 2,5 kV, 600 Ω , y 25 μ F. Se consiguieron las constantes de tiempo de 3,7-4,0 ms. El cultivo se transfirió a 5 ml de medio fresco. La regeneración de las células se monitorizó a una longitud de onda de 600 nm usando un Espectrofotómetro Spectronic Helios Epsilon (Thermo) equipado con un soporte de tubo. Después de una caída inicial en la biomasa, las células empezaron a crecer de nuevo. Una vez la biomasa se duplicó a partir de este punto, las células se recogieron, se suspendieron en 200 μ l de medio fresco y se plaquearon en placas PETC selectivas (que contenían 1,2% Bacto™ Agar (BD)) con 4 μ g/ml de Claritromicina. Después de 4-5 días de inoculación con 30 psi de gas de acería a 37°C, las colonias fueron visibles.

Las colonias se usaron para inocular 2 ml de medio PETC que contenía 4 μ g/ μ l de Claritromicina. Cuando se produjo el crecimiento, el cultivo se aumentó de escala hasta 5 ml y posteriormente 50 ml de medio PETC que contenía 4 μ g/ml de Claritromicina y 30 psi de gas de acería como la única fuente de carbono.

Confirmación de la transformación exitosa:

Para verificar la transferencia de ADN, se realizó una mini prep de plásmido a partir de 10 ml de volumen de cultivo usando el kit miniprep de plásmido Zyppy (Zymo). Como la calidad del plásmido aislado no fue suficiente para una digestión de restricción debido a la actividad exonucleasa Clostridial [Burchhardt y Dürre, 1990], se realizó una PCR con el plásmido aislado y oligonucleótidos proporcionados en la Tabla 2 para confirmar la presencia del plásmido. La PCR se llevó a cabo usando el kit de PCR de Premezcla iNtRON Maximise (Intron Bio Technologies) con las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 20 segundos), hibridación (55°C durante 20 segundos) y elongación (72°C durante 60 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 5 minutos).

Para confirmar la identidad de los clones, se aisló ADN genómico (véase anteriormente) a partir de cultivos de 50 ml de *C. autoethanogenum* DSM23693. Se realizó una PCR frente al gen de 16s ARNr usando oligonucleótidos fD1 (SEQ ID NO: 15 : ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rP2 (SEQ ID NO: 16: cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT) [Weisberg et al., 1991] y kit de PCR de Premezcla iNtRON Maximise (Intron Bio Technologies) con las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 20 segundos), hibridación (55°C durante 20 segundos) y elongación (72°C durante 60 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 5 minutos). Los resultados de la secuenciación fueron al menos 99,9% de identidad frente al gen de 16s ARNr (rrsA) de *C. autoethanogenum* (Y18178, GI:7271109).

Experimentos de crecimiento para confirmar la producción de biodiésel a partir de CO:

Para demostrar la producción de FAEE, se preparó medio PETC y se inoculó con la cepa de *C. autoethanogenum* que porta el plásmido de expresión pMTL85245-atf. Se presurizaron botellas de suero con 50 mL de medio PETC (Tabla 1) con 30 psi de una corriente de gas que contenía CO de un gas residual de acería (recogido en el sitio New Zealand Steel en Glenbrook, NZ; composición: 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂) y se cultivó durante 5 días. El mismo experimento también se llevó a cabo con la cepa de *C. autoethanogenum* de tipo salvaje sin plásmido.

Los cultivos se analizaron por GC-MS usando muestreo de espacio de cabeza. Se expusieron 2 mL de muestra en un vial de 20 mL durante 10 min a 40°C a una fibra (fibra Supelco PDMS 100) y después se analizó usando un Agilent 6890 GC con 5973 MSD equipado con una columna de 30m x 0,25mm x 0,25µm ZB-Wax en las condiciones siguientes: Temperatura del inyector: 250°C; Inyección Splitless; desorb durante 10 min a 250°C; flujo constante de 1mL/min; Horno: 40°C mantenidos durante 5 min, elevar a 10°C/min hasta 190°C, mantener durante 5 min, elevar a 3°C/min hasta 208°C, elevar a 10°C/min hasta 220°C, mantener 10 min, de nuevo a 40°C a 60°C/min; MSD: Modo de barrido, intervalo de masa 38-650 AMU a 1,47 barridos por segundo. Se encontraron dos picos que concuerdan con la sustancia biodiésel éster de butilo de ácido butanoico frente a la base de datos de referencia de estándares del National Institute of Standards and Technology (NIST) en la cepa que porta el plásmido de expresión pero no en la cepa de tipo salvaje sin plásmido, así como algunos productos de ácidos grasos en el intervalo C14-C18 como 1-Octanodecanol (C18) o Tetradecanal (C14), Heptadecano (C 17), 9-Octadecanal (C18) y 11-Hexadecanal (C16) (Tab. 3; Fig. 3). Se detectaron alcoholes como etanol y butanol por HPLC realizada usando un sistema de HPLC Serie Agilent 1100 equipado con un RID operado a 35°C (Detector de Índice de Refracción) y una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, tamaño de partícula 9 µm) mantenido a 35°C. El RID se operó a 35°C (Detector de Índice de Refracción) y una columna ácida Alltech IOA-2000 Organic (150 x 6,5 mm, tamaño de partícula 8 µm) mantenido a 60°C. Se usó agua ligeramente acidificada (0,005 M H₂SO₄) como fase móvil con una velocidad de flujo de 0,25 ml/min. Para eliminar proteínas y otros residuos celulares, se mezclaron muestras de 400 µl con 100 µl de 2% (p/v) ácido 5-sulfosalicílico y se centrifugó a 14.000 x g durante 3 min para separar los residuos precipitados. Se inyectaron entonces 10 µl del sobrenadante en el HPLC para análisis.

Tabla 3: Resultados del análisis por GC-MS de la cepa de *C. autoethanogenum* que porta el plásmido de expresión pMTL85245-atf:

Tiempo de Retención		% de concordancia NIST
1,5-2,8	CO ₂	90
3,84	Disulfuro	90
4-4,5	Ácido acético	96
14,37	1-Octanodecanol	<50
16,35	Butiléster del ácido butanoico	50
16,64	Butiléster del ácido butanoico	78
18,84	Tetradecanal	95
21	Heptadecano	>90
21,7	9-Octadecanal(Z)/11-Hexadecanal(Z)	93/87

La invención se ha descrito en la presente memoria, con referencia a determinadas realizaciones preferidas, con el fin de permitir al lector llevar a la práctica la invención sin experimentación excesiva. Los títulos, encabezamientos, o semejantes se proporcionan para aumentar la comprensión del lector de este documento, y no deben leerse como limitantes del alcance de la presente invención.

- 5 La referencia a cualesquiera solicitudes, patentes y publicaciones en esta memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que constituyen técnica anterior válida o forman parte del conocimiento general común en ningún país del mundo.

A lo largo de esta memoria descriptiva y cualesquiera reivindicaciones que siguen, a no ser que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprenden", "que comprenden" y semejantes, deben considerarse en un sentido inclusivo a diferencia de un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero no limitado a".

Referencias

- Abrini, J., Naveau, H., y Nyns, E. J. (1994). *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of microbiology*, 161(4), 345-351.
- 15 Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., et al. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International journal of systematic bacteriology*, 44(4), 812-26.
- Herbert, M., O'Keeffe, T. a., Purdy, D., Elmore, M., y Minton, N. P. (2003). Gene transfer into *Clostridium difficile* CD630 and characterisation of its metilase genes. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1), 103-1 10.
- 20 Jennert, K. C, Tardif, C., Young, D. I., y Young, M. (2000). Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology (Reading, Inglaterra)*, 146 Pt 12, 3071-80.
- Kita, A., Iwasaki, Y., Sakai, S., Okuto, S., Takaoka, K., Suzuki, T., Yano, S., et al. (2012). Development of genetic transformation and heterologous expression system in carboxydrotrophic thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx).
- 25 Köpke, M, Held, C, Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., et al. (2010). *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29).
- Köpke, M., Mihalcea, C, Liew, F., Tizard, J. H., AH, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., et al. (2011). 2,3-Butanediol Production By Acetogenic Bacteria, an Alternative Route To Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas. *Applied and environmental microbiology*, 77(15), 5467-75.
- 30 Leang, C, Ueki, T., Nevin, K. P., y Lovley, D. R. (2012). A Genetic System for *Clostridium ljungdahlii*: A Chassis for Autotrophic Production of Biocommodities and a Model Homoacetogen. *Applied and environmental microbiology*, (noviembre).
- Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N., y Papoutsakis, E. T. (1992). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 10(2), 190-195.
- 35 Perez, J. M, Richter, H., Loftus, S. E., y Angenent, L. T. (2012). Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 1-30.
- Stratz, M., Sauer, U., Kuhn, a, y Dürre, P. (1994). Plasmid Transfer into the Homoacetogen *Acetobacterium woodii* by Electroporation and Conjugation. *Applied and environmental microbiology*, 60(3), 1033-7.
- 40 Tanner, R. S., Miller, L. M., y Yang, D. (1993). *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *International journal of systematic bacteriology*, 43(2), 232.
- Tyurin, Michael, y Kiriukhin, M. (2012). Electrofusion of cells of Acetogen *Clostridium* sp. MT 351 with *erm* (B) or *cat* in the chromosome. *Journal of Biotech*, 1-12.
- 45 Tyurin, MV, Desai, S., y Lynd, L. (2004). Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Applied and environmental microbiology* 70(2), 883-890.
- Williams, D. R., Young, D. I., y Young, M. (1990). Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of general microbiology*, 136(5), 819-26.

Listado de secuencias

- 50 <110> LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED

ES 2 655 214 T3

<120> MICROORGANISMOS RECOMBINANTES QUE PRODUCEN BIODIÉSEL

<130> LT80

5 <160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 1383

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> gen de aciltransferasa optimizado por codones

<400> 1

```

atgagacctt tacaccctat tgatthtatt tttcttagtc ttgaaaagag acaacaacct      60
atgcatgttg gaggattatt tttatttcaa atacctgata atgcaccaga tacttttata      120
caggatcttg taaatgatat taggatatca aaaagtattc ctgtaccacc atttaataat      180
aagcttaatg gattatthtg ggatgaagat gaagaatttg atcttgatca tcattthtaga      240
catattgcac ttcctcatcc tggtagaata agagaacttc ttattthatat atctcaggaa      300
catagtacac tthtagatag agctaaacct ttatggactt gcaatattat agaaggaata      360
gaaggaaata gatttgcaat gtattthtaag attcaccatg caatggtaga tggagtagca      420
ggaatgagat taattgaaaa atcactthct cacgatgtaa ctgaaaaatc aatagtacct      480
ccttgggtg tgagaaggtaa gagagcaaaa agacttagag aacctaaaac aggtaaaata      540
aagaaaataa tgtcaggaat aaagagtcaa ttacaagcta ctccaactgt aatacaggaa      600
cttagtcaaa ctgtthttaa ggatattggg agaaatccag atcatgtaag tctthtccag      660
gctccttggt caathttaa tcagagagtt tcatcatcaa gaaggthtgc agcacaatct      720
thtgatttag ataggtthtag gaatatagca aagagtctta atgtaactat aatgatgth      780
gtacttgtag thgtthctgg tgcacttaga gctthttaa tgtctcacia ttcattacct      840
agtaagccat taattgcaat ggthcctgca tctataagaa atgatgatag tgatgthtct      900
aataggatta caatgatact tgctaactct gctacacaca aagatgatcc attacaaaga      960
cttgaaataa taaggagaag tgttcaaaa tctaaacaaa ggtthaaaag gatgactagt     1020
gatcagattc ttaattattc agctgtagth tatggaccag caggtcttaa tattatatct     1080
ggtatgatgc caaaaaggca ggctthttaat thagthatta gtaatgthcc aggtccaaga     1140
gaacctctth attggaatgg agctaagctt gatgctctth atccagcttc tatagtactth     1200
gatggtcagg cacttaatat aacaatgaca tcatatcttg ataagcttga agthtgactth     1260
attgcttgta ggaatgctct tccaaggatg cagaatttac thacacatct tgaagaagaa     1320
atacaactth thgaaggtgt aatagctaa caggaagata thaaaactgc aaattaagaa     1380
ttc

```

ES 2 655 214 T3

<210> 2
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido Ppta-ack-NotI-F
 10 <400> 2

gagcggccgc aatatgatat ttatgtcc 28

 <210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Oligonucleótido Ppta-ack-NdeI-R

 <400> 3

ttccatatgt ttcatgttca tttcctcc 28
 25
 <210> 4
 <211> 419
 <212> ADN
 30 <213> Clostridium autoethanogenum

 <400> 4

agaaattttc ctttctaaaa tattttattc catgtcaaga actctgttta tttcattaa 60
gaactataag tacaaagtat aaggcatttg aaaaaatagg ctagtatatt gattgattat 120
ttattttaaa atgcctaagt gaaatatata catattataa caataaaata agtattagtg 180
taggattttt aatagagta tctattttca gattaaattt ttgattattt gatttacatt 240
atataatatt gagtaaagta ttgactagca aaatTTTTTg atactttaat ttgtgaaatt 300
tcttatcaaa agttatattt ttgaataatt tttattgaaa aatacaacta aaaaggatta 360
tagtataagt gtgtgtaatt ttgtgttaaa tttaaagga ggaaatgaac atgaaattg 419
 35 <210> 5
 <211> 4912
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> plásmido pMTL85245-atf

 <400> 5

ES 2 655 214 T3

aaactccttt	ttgataatct	catgaccaaa	atccctaac	gtgagttttc	gttccactga	60
gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	120
atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	180
gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	240
gttcttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	300
tacctcgctc	tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	360

ES 2 655 214 T3

accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta 540
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctgggat 600
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 780
 cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 840
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatagca gggccccctg caggataaaa 900
 aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960
 atgaccgcgg ccgcaatatg atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt 1020
 attccagtta cgttcataga aattttctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact 1080
 ctgtttattt cattaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aataggcta 1140
 gtatattgat tgattattta ttttaaatg cctaagttaa atatatacat attatacaa 1200
 taaaataagt attagtgtag gattttttaa tagagtatct attttcagat taaatttttg 1260
 attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa tttttgata 1320
 cttaatttg tgaaatttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat 1380
 acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgttaaattt aaaggaggga 1440
 aatgaacatg aaacatatga gacctttaca ccctattgat tttatttttc ttagtcttga 1500
 aaagagacaa caacctatgc atgttggagg attattttta tttcaaatac ctgataatgc 1560
 accagatact tttatacagg atcttgtaaa tgatattagg atatcaaaaa gtattcctgt 1620
 accaccattt aataataagc ttaatggatt attttgggat gaagatgaag aatttgatct 1680
 tgatcatcat tttagacata ttgcacttcc tcatcctggt agaataagag aacttcttat 1740
 ttatatactt caggaacata gtacactttt agatagagct aaacctttat ggacttgcaa 1800
 tattatagaa ggaatagaag gaaatagatt tgcaatgtat ttttaagattc accatgcaat 1860
 ggtagatgga gtagcaggaa tgagattaat tgaaaaatca ctttctcacg atgtaactga 1920
 aaaatcaata gtacctcctt ggtgtgtaga aggtaagaga gcaaaaagac ttagagaacc 1980
 taaaacaggt aaaataaaga aaataatgtc aggaataaag agtcaattac aagctactcc 2040
 aactgtaata caggaactta gtcaaaactgt ttttaaggat attggtagaa atccagatca 2100
 tgtaagttct tttcaggctc cttgttcaat tttaaatcag agagtttcat catcaagaag 2160
 gtttgagca caatcttttg atttagatag gtttaggaat atagcaaga gtcttaatgt 2220
 aactataaat gatgttgtag ttgcagtttg ttctggtgca cttagagctt atttaatgtc 2280
 tcacaattca ttacctagta agccattaat tgcaatgggt cctgcatcta taagaaatga 2340
 tgatagtgat gtttctaata ggattacaat gatacttgct aatcttgcta cacacaaaga 2400

ES 2 655 214 T3

tgatccatta	caaagacttg	aaataataag	gagaagtgtt	caaaattcta	aacaaagggt	2460
taaaaggatg	actagtgatc	agattcttaa	ttattcagct	gtagtttatg	gaccagcagg	2520
tcttaatat	atatctggta	tgatgccaaa	aaggcaggct	tttaatttag	ttattagtaa	2580
tgttccaggt	ccaagagaac	ctctttattg	gaatggagct	aagcttgatg	ctctttatcc	2640
agcttctata	gtacttgatg	gtcaggcact	taatataaca	atgacatcat	atcttgataa	2700
gcttgaagtt	ggacttattg	cttgtaggaa	tgctcttcca	aggatgcaga	atttacttac	2760
acatcttgaa	gaagaaatac	aactttttga	agggtgaata	gctaagcagg	aagatattaa	2820
aactgcaaat	taagaattcg	agctcggtag	ccggggatcc	tctagagtcg	acgtcacgcg	2880
tccatggaga	tctcagggcc	tgacagacatg	caagcttggc	actggccgtc	gttttacaac	2940
gtcgtgactg	ggaaaaccct	ggcgttacc	aacttaatcg	ccttgcagca	catccccctt	3000
tcgccagctg	gcgtaatagc	gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	3060
gcctgaatgg	cgaatggcgc	tagcataaaa	ataagaagcc	tgcatattgca	ggcttcttat	3120
ttttatggcg	cgccgcattc	acttcttttc	tatataaata	tgagcgaagc	gaataagcgt	3180
cggaaaagca	gcaaaaagtt	tcctttttgc	tgttggagca	tgggggttca	gggggtgcag	3240
tatctgacgt	caatgccgag	cgaaagcgag	ccgaagggta	gcatttacgt	tagataaccc	3300
cctgatatgc	tccgacgctt	tatatagaaa	agaagattca	actaggtaaa	atcttaatat	3360
aggttgagat	gataaggttt	ataaggaatt	tgtttgttct	aatttttcac	tcattttggt	3420
ctaatttctt	ttaacaaatg	ttcttttttt	tttagaacag	ttatgatata	gttagaatag	3480
tttaaaataa	ggagtgagaa	aaagatgaaa	gaaagatatg	gaacagtcta	taaaggctct	3540
cagaggctca	tagacgaaga	aagtggagaa	gtcatagagg	tagacaagtt	ataccgtaaa	3600
caaacgtctg	gtaacttcgt	aaaggcatat	atagtgcaat	taataagtat	gttagatatg	3660
attggcggaa	aaaaacttaa	aatcgttaac	tatatcctag	ataatgtcca	cttaagtaac	3720
aatacaatga	tagctacaac	aagagaaata	gcaaaagcta	caggaacaag	tctacaaaca	3780
gtaataacaa	cacttaaaat	cttagaagaa	ggaaatatta	taaaaagaaa	aactggagta	3840
ttaatgttaa	accctgaact	actaatgaga	ggcgacgacc	aaaaacaaa	atacctctta	3900
ctcgaatttg	ggaactttga	gcaagaggca	aatgaaatag	attgacctcc	caataacacc	3960
acgtagttat	tgggaggtca	atctatgaaa	tgcgattaag	ggccggccga	agcaaaactta	4020
agagtgtggt	gatagtgcag	tatcttaaaa	ttttgtataa	taggaattga	agttaaatta	4080
gatgctaaaa	atgtgtaatt	aagaaggagt	gattacatga	acaaaaatat	aaaatattct	4140
caaaactttt	taacgagtga	aaaagtactc	aaccaaataa	taaaacaatt	gaatttaaaa	4200
gaaaccgata	ccgtttacga	aattggaaca	ggtaaagggc	atttaacgac	gaaactggct	4260
aaaataagta	aacaggtaac	gtctattgaa	ttagacagtc	atctattcaa	cttatcgta	4320
gaaaaattaa	aactgaatac	tcgtgtcact	ttaattcacc	aagatattct	acagtttcaa	4380
ttccctaaca	aacagaggtg	taaaattggt	gggagttatc	cttaccattt	aagcacacaa	4440

ES 2 655 214 T3

attattaa aagtggttt tgaaagccat gcgtctgaca tctatctgat tgttgaagaa 4500
 ggattctaca agcgtacctt ggatattcac cgaacactag ggttgctctt gcacactcaa 4560
 gtctcgattc agcaattgct taagctgcca gcggaatgct ttcaccta accaaaagta 4620
 aacagtgtct taataaaact taccgcat accacagatg ttccagataa atattggaag 4680
 ctatatacgt actttgtttc aaaatgggtc aatcgagaat atcgtcaact gttactaaa 4740
 aatcagtttc atcaagcaat gaaacacgcc aaagtaaaca atttaagtac cgttacttat 4800
 gagcaagtat tgtctatttt taatagttat ctattattta acgggaggaa ataattctat 4860
 gagtcgcttt tgtaaatttg gaaagttaca cgttactaaa ggaatgtgt tt 4912

5 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Atf-F1
 <400> 6

agacaacaac ctatgcatgt tggagga 27

15 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Atf-R1
 <400> 7

25 ggggatgtgc tgcaaggcga 20

30 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Atf-F2
 35 <400> 8

catcatcaag aaggttgca gcacaat 27

40 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido Atf-R2
 <400> 9

50 agaggttctc ttggacctgg aacat 25

ES 2 655 214 T3

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Oligonucleótido Atf-F3

<400> 10

10 **tcggtaccgc gggatcctct a 21**

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Oligonucleótido Atf-R3

20

<400> 11

cattctgct actccatcta ccattgc 27

25

<210> 12
<211> 601
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> metiltransferasa diseñada

<400> 12

ES 2 655 214 T3

Met Phe Pro Cys Asn Ala Tyr Ile Glu Tyr Gly Asp Lys Asn Met Asn
 1 5 10 15

Ser Phe Ile Glu Asp Val Glu Gln Ile Tyr Asn Phe Ile Lys Lys Asn
 20 25 30

Ile Asp Val Glu Glu Lys Met His Phe Ile Glu Thr Tyr Lys Gln Lys
 35 40 45

Ser Asn Met Lys Lys Glu Ile Ser Phe Ser Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln
 50 55 60

Lys Ile Met Asn Gly Lys Asn Gly Val Val Tyr Thr Pro Pro Glu Met
 65 70 75 80

Ala Ala Phe Met Val Lys Asn Leu Ile Asn Val Asn Asp Val Ile Gly
 85 90 95

Asn Pro Phe Ile Lys Ile Ile Asp Pro Ser Cys Gly Ser Gly Asn Leu
 100 105 110

Ile Cys Lys Cys Phe Leu Tyr Leu Asn Arg Ile Phe Ile Lys Asn Ile
 115 120 125

Glu Val Ile Asn Ser Lys Asn Asn Leu Asn Leu Lys Leu Glu Asp Ile
 130 135 140

Ser Tyr His Ile Val Arg Asn Asn Leu Phe Gly Phe Asp Ile Asp Glu

ES 2 655 214 T3

420 425 430
 Ile Ile Tyr Ser Asn Leu Ile Glu Asn Glu Thr Glu Cys Pro Asn Ala
 435 440 445
 Ile Lys Tyr Ile Glu Gln Tyr Lys Lys Arg Leu Met Glu Arg Arg Glu
 450 455 460
 Cys Lys Lys Gly Thr Arg Lys Trp Tyr Glu Leu Gln Trp Gly Arg Lys
 465 470 475 480
 Pro Glu Ile Phe Glu Glu Lys Lys Ile Val Phe Pro Tyr Lys Ser Cys
 485 490 495
 Asp Asn Arg Phe Ala Leu Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Ser Ala Asp Ile
 500 505 510
 Tyr Ser Leu Val Leu Lys Lys Asn Val Pro Phe Thr Tyr Glu Ile Leu
 515 520 525
 Leu Asn Ile Leu Asn Ser Pro Leu Tyr Glu Phe Tyr Phe Lys Thr Phe
 530 535 540
 Ala Lys Lys Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Glu Tyr Tyr Pro Asn Asn Leu
 545 550 555 560
 Met Lys Leu Cys Ile Pro Ser Ile Asp Phe Gly Gly Glu Asn Asn Ile
 565 570 575
 Glu Lys Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Gly Leu Thr Asp Lys Glu Ile Glu
 580 585 590
 Ile Val Glu Lys Ile Lys Asp Asn Cys
 595 600

<210> 13
 <211> 1940
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> gen de metiltransferasa diseñado fusionado con un promotor lac inducible

<400> 13

ES 2 655 214 T3

gcggccgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca 60
 ctttatgctt cgggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 120
 aaacacatat gtttccgtgc aatgcctata tcgaatatgg tgataaaaat atgaacagct 180
 ttatcgaaga tgtggaacag atctacaact tcattaaaaa gaacattgat gtggaagaaa 240
 agatgcattt cattgaaacc tataaacaga aaagcaacat gaagaaagag attagcttta 300
 gcgaagaata ctataaacag aagattatga acggcaaaaa tggcgttgtg tacaccccgc 360
 cggaaatggc ggcctttatg gttaaaaatc tgatcaacgt taacgatggt attggcaatc 420
 cgtttattaa aatcattgac ccgagctgcg gtagcggcaa tctgatttgc aaatgttttc 480
 tgtatctgaa tcgcatcttt attaagaaca ttgaggtgat taacagcaaa aataacctga 540
 atctgaaact ggaagacatc agctaccaca tcgttcgcaa caatctgttt ggcttcgata 600
 ttgacgaaac cgcgatcaaa gtgctgaaaa ttgatctggt tctgatcagc aaccaattta 660
 gcgagaaaaa tttccagggt aaagactttc tggtgaaaaa tattgatcgc aaatatgacg 720
 tgttcattgg taatccgccg tatatcggtc acaaaagcgt ggacagcagc tacagctacg 780
 tgctgcgcaa aatctacggc agcatctacc gcgacaaagg cgatatcagc tattgtttct 840
 ttcagaagag cctgaaatgt ctgaaggaag gtggcaaaact ggtgtttgtg accagccgct 900
 acttctgcga gagctgcagc ggtaaagaac tgcgtaaatt cctgatcgaa aacacgagca 960
 ttacaagat cattgatttt tacggcatcc gcccgttcaa acgcgtgggt atcgatccga 1020
 tgattatfff tctggttcgt acgaagaact ggaacaataa cattgaaatt attcgcgccga 1080
 acaagattga aaagaacgaa aagaacaaat tcctggatag cctgttcctg gacaaaagcg 1140
 aaaagtgtaa aaagtttagc attagccaga aaagcattaa taacgatggc tgggttttcg 1200
 tggacgaagt ggagaaaaac attatcgaca aaatcaaaga gaaaagcaag ttcattctga 1260
 aagatatttg ccatagctgt caaggcatta tcaccggttg tgatcgcgcc tttattgtgg 1320
 accgtgatat catcaatagc cgtaagatcg aactgcgtct gattaaaccg tggattaaaa 1380
 gcagccatat ccgtaagaat gaagttatta agggcgaaaa attcatcatc tatagcaacc 1440
 tgattgagaa tgaaaccgag tgtccgaatg cgattaaata tatcgaacag tacaagaaac 1500
 gtctgatgga gcgccgcgaa tgcaaaaagg gcacgcgtaa gtggtatgaa ctgcaatggg 1560
 gccgtaaacc ggaaatcttc gaagaaaaga aaattgtttt cccgtataaa agctgtgaca 1620
 atcgttttgc actggataag ggtagctatt ttagcgcaga catttatagc ctggttctga 1680
 agaaaaatgt gccgttcacc tatgagatcc tgctgaatat cctgaatagc ccgctgtacg 1740
 agttttactt taagaccttc gcgaaaaagc tgggcgagaa tctgtacgag tactatccga 1800
 acaacctgat gaagctgtgc atcccagca tcgatttcgg cggtgagaac aatattgaga 1860
 aaaagctgta tgatttcttt ggtctgacgg ataaagaaat tgagattgtg gagaagatca 1920
 aagataactg ctaagaattc 1940

ES 2 655 214 T3

<210> 14
<211> 2781
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Plásmido pGS20

<400> 14

10

tttgccacct gacgtctaag aaaaggaata ttcagcaatt tgcccgtgcc gaagaaaggc 60
ccacccgtga aggtgagcca gtgagttgat tgctacgtaa ttagttagtt agcccttagt 120

ES 2 655 214 T3

gactcgtaat acgactcact atagggctcg agtctagaga attcgatadc acccggaac 180
tagtctgcag cccttagtg agggtaatt ggagtcacta agggtagtt agttagatta 240
gcagaaagtc aaaagcctcc gaccggaggc ttttgactaa aacttcctt ggggttatca 300
ttggggctca ctcaaaggcg gtaatcagat aaaaaaatc cttagctttc gctaaggatg 360
atctctgcta gagatggaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg 420
cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg 480
tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc 540
tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt 600
gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt 660
gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc 720
atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc ctttaataaga 780
tgatcttctt gagatcgttt tggctctgcg gtaatctctt gctctgaaaa cgaaaaaacc 840
gccttgacagg gcggtttttc gaaggttctc tgagctacca actctttgaa ccgaggtaac 900
tggcttgag gagcgcagtc accaaaactt gtcctttcag tttagcctta accggcgcac 960
gacttcaaga ctaactctc taaatcaatt accagtggct gctgccagtg gtgcttttgc 1020
atgtctttcc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcggactg 1080
aacggggggt tcgtgcatac agtccagctt ggagcgaact gcctaccgg aactgagtgt 1140
caggcgtgga atgagacaaa cgcggccata acagcggat gacaccgga aaccgaaagg 1200
caggaacagg agagcgcacg agggagccgc caggggaaac gcctggatc tttatagtcc 1260
tgtcgggttt cgccaccact gatttgagcg tcagatttcg tgatgcttgt caggggggcg 1320
gagcctatgg aaaaacggct ttgccgggc cctctcactt ccctgttaag tatcttctg 1380
gcatcttcca ggaaatctc gccccgttcg taagccattt ccgctcggc cagtcgaacg 1440
accgagcgtg gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaatata tcctgtatca catattctgc 1500
tgacgcaccg gtgcagcctt ttttctctg ccacatgaag cacttctg acaccctcat 1560
cagtccaac atagtaagcc agtatacact ccgctagcgc tgaggtctgc ctcgtgaaga 1620
aggtgttgct gactcatacc aggcctgaat cgccccatca tccagccaga aagtgagga 1680
gccacggttg atgagagctt tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt 1740
tgccacggaa cggctctgct tgctcgggaag atgcgtgatc tgatccttca actcagcaaa 1800
agttcgattt attcaacaaa gccacgttg gtctcaaaat ctctgatgtt acattgcaca 1860
agataaaaat atatcatcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca gtaatacaag 1920
gggtgtttac tagaggttga tcgggcacgt aagaggttcc aactttcacc ataataaat 1980
aagatcacta ccgggcgtat tttttgagtt atcgagattt tcaggagcta aggaagctaa 2040
aatggagaaa aaaatcacgg gatataccac cgttgatata tcccaatggc atcgtaaaga 2100
acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcagctgga 2160

ES 2 655 214 T3

tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagttttatc cggcctttat 2220
 tcacattctt gcccgcctga tgaacgctca cccggagttt cgtatggcca tgaaagacgg 2280
 tgagctggtg atctgggata gtgttcaccc ttgttacacc gttttccatg agcaaactga 2340
 aacgttttcg tccctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagtttc tccacatata 2400
 ttcgcaagat gtggcgtggt acggtgaaaa cctggcctat ttcctaaag ggtttattga 2460
 gaatatgttt tttgtctcag ccaatccctg ggtgagtttc accagttttg atttaaactg 2520
 ggccaatatg gacaacttct tcgccccctg tttcacgatg ggcaaatatt atacgcaagg 2580
 cgacaagggtg ctgatgccgc tggcgatcca ggttcatcat gccgtttggtg atggcttcca 2640
 tgtcggccgc atgcttaatg aattacaaca gtactgtgat gagtggcagg gcggggcgta 2700
 ataatactag ctccggcaa aaaacgggca aggtgtcacc accctgccct ttttctttaa 2760
 aaccgaaaag attacttcgc g 2781

5 <210> 15
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido fD1
 <400> 15

ccgaattcgt cgacaacaga gttgatcct ggctcag 37

15 <210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido rP2
 <400> 16

25 cccgggatcc aagcttacgg ctacctggtt acgactt 37

30 <210> 17
 <211> 4709
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> plásmido de metilación diseñado
 35 <400> 17

ES 2 655 214 T3

gtttgccacc	tgacgtctaa	gaaaaggaat	attcagcaat	ttgcccgtgc	cgaagaaagg	60
cccacccgtg	aaggtgagcc	agtgagttga	ttgctacgta	attagttagt	tagcccttag	120
tgactcgtaa	tacgactcac	tatagggctc	gaggcggccg	cgcaacgcaa	ttaatgtgag	180
ttagctcact	cattaggcac	cccaggcttt	acactttatg	cttccggctc	gtatgttgtg	240
tggaattgtg	agcggataac	aatttcacac	aggaaacaca	tatgtttccg	tgcaatgcct	300
atatcgaata	tggtgataaa	aatatgaaca	gctttatcga	agatgtggaa	cagatctaca	360

ES 2 655 214 T3

acttcattaa aaagaacatt gatgtggaag aaaagatgca tttcattgaa acctataaac 420
 agaaaagcaa catgaagaaa gagattagct ttagcgaaga atactataaa cagaagatta 480
 tgaacggcaa aaatggcggt gtgtacaccc cgccggaaat ggcggccttt atggttaaaa 540
 atctgatcaa cgttaacgat gttattggca atccgtttat taaaatcatt gacccgagct 600
 gcggtagcgg caatctgatt tgcaaatggt ttctgtatct gaatcgcac tttattaaga 660
 acattgaggt gattaacagc aaaaataacc tgaatctgaa actggaagac atcagctacc 720
 acatcgttcg caacaatctg tttggcttcg atattgacga aaccgcgatc aaagtgctga 780
 aaattgatct gtttctgac agcaaccaat ttagcgagaa aaatttccag gttaaagact 840
 ttctggtgga aatattgat cgcaaatatg acgtgttcat tggtaatccg ccgtatatcg 900
 gtcacaaaag cgtggacagc agctacagct acgtgctgcg caaaatctac ggcagcatct 960
 accgcgacaa aggcgatatc agctattggt tctttcagaa gagcctgaaa tgtctgaagg 1020
 aaggtggcaa actggtgttt gtgaccagcc gctacttctg cgagagctgc agcggtaaag 1080
 aactgcgtaa attcctgac gaaaacacga gcatttaca gatcattgat ttttacggca 1140
 tccgcccgtt caaacgcgtg ggtatcgatc cgatgattat ttttctgggt cgtacgaaga 1200
 actggaacaa taacattgaa attattcgcc cgaacaagat tgaaaagaac gaaaagaaca 1260
 aattcctgga tagcctgttc ctggacaaaa gcgaaaagtg taaaaagttt agcattagcc 1320
 agaaaagcat taataacgat ggctggggtt tcgtggacga agtggagaaa aacattatcg 1380
 acaaaatcaa agagaaaagc aagttcattc tgaaagatat ttgccatagc tgtcaaggca 1440
 ttatcaccgg ttgtgatcgc gcctttattg tggaccgtga tatcatcaat agccgtaaga 1500
 tcgaactgcg tctgattaaa ccgtggatta aaagcagcca tatccgtaag aatgaagtta 1560
 ttaagggcga aaaattcatc atctatagca acctgattga gaatgaaacc gagtgcccga 1620
 atgcgattaa atatatcgaa cagtacaaga aacgtctgat ggagcgccgc gaatgcaaaa 1680
 agggcacgcg taagtggat gaactgcaat ggggccgtaa accggaatc ttcgaagaaa 1740
 agaaaattgt tttcccgtat aaaagctgtg acaatcgttt tgcactggat aagggtagct 1800
 attttagcgc agacatttat agcctggttc tgaagaaaaa tgtgccgttc acctatgaga 1860
 tcctgctgaa taccctgaat agcccgtgt acgagtttta cttaagacc ttcgcgaaaa 1920
 agctgggcca gaatctgtac gagtactatc cgaacaacct gatgaagctg tgcaccccga 1980
 gcatcgattt cggcggtgag aacaatattg agaaaaagct gtatgatttc tttggtctga 2040
 cggataaaga aattgagatt gtggagaaga tcaaagataa ctgctaagaa ttcgatatca 2100
 cccgggaact agtctgcagc cttttagtga gggttaattg gagtcaactaa gggttagtta 2160
 gtagattag cagaaagtca aaagcctccg accggaggct tttgactaaa acttcccttg 2220
 gggttatcat tggggctcac tcaaaggcgg taatcagata aaaaaaatcc ttagctttcg 2280
 ctaaggatga tttctgctag agatggaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga 2340
 ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt 2400

ES 2 655 214 T3

gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagcc ctcccgtatc 2460
gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct 2520
gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttaa ctcatatata 2580
ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt 2640
gataatctca tgaccaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 2700
ttaataagat gatcttcttg agatcgtttt ggtctgcgcg taatctcttg ctctgaaaac 2760
gaaaaaacg ccttgcaggg cggtttttcg aaggttctct gagctaccaa ctctttgaac 2820
cgaggtaact ggcttggagg agcgcagtca caaaacttg tcctttcagt ttagccttaa 2880
ccggcgcagtg acttcaagac taactcctct aatcaatta ccagtggctg ctgccagtgg 2940
tgcttttgca tgtctttccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 3000
gtcggactga acgggggggt cgtgcataca gtccagcttg gagcgaactg cctaccgga 3060
actgagtgtc aggcgtggaa tgagacaaac gcggccataa cagcggaatg acaccggtaa 3120
accgaaaggc aggaacagga gagcgcacga gggagccgcc aggggaaacg cctggtatct 3180
ttatagtcct gtcgggtttc gccaccactg atttgagcgt cagatttcgt gatgcttgtc 3240
aggggggaggc agcctatgga aaaacggctt tgccgaggcc ctctcacttc cctgttaagt 3300
atcttctgg catcttccag gaaatctccg ccccgttcgt aagccatttc cgctcgccgc 3360
agtcgaacga ccgagcgtag cgagtcagtg agcgaggaag cggaatata cctgtatcac 3420
atattctgct gacgcaccgg tgcagccttt tttctctgc cacatgaagc acttcaactga 3480
caccctcatc agtgccaaca tagtaagcca gtatacactc cgctagcgtc gaggtctgcc 3540
tcgtgaagaa ggtgttgctg actcatacca ggctgaatc gccccatcat ccagccagaa 3600
agtgaggagg ccacggttga tgagagcttt gttgtaggtg gaccagttgg tgattttgaa 3660
cttttgcttt gccacggaac ggtctgcgtt gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa 3720
ctcagcaaaa gttcgattta ttcaaaaag ccacgtttg tctcaaaatc tctgatgta 3780
cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa ctgtctgctt acataaacag 3840
taatacaagg ggtgtttact agaggttgat cgggcacgta agaggttcca actttacca 3900
taatgaaata agatcactac cgggcgtatt ttttgagta tcgagatttt caggagctaa 3960
ggaagctaaa atggagaaaa aaatcacggg atataccacc gttgatata cccaatggca 4020
tcgtaaagaa cttttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt 4080
tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc 4140
ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaacgctcac ccggagtttc gtatggccat 4200
gaaagacggt gagctggtga tctgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga 4260
gcaaactgaa acgttttcgt ccctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct 4320
ccacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg 4380
gtttattgag aatatgtttt ttgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga 4440

ES 2 655 214 T3

tttaaactg	gccaatatg	acaacttctt	cgccccggt	ttcacgatg	gcaaatatta	4500
tacgcaaggc	gacaagggtgc	tgatgccgct	ggcgatccag	gttcatcatg	ccgtttgtga	4560
tggttccat	gtcggccgca	tgcttaatga	attacaacag	tactgtgatg	agtggcaggg	4620
cggggcgtaa	taatactagc	tccggcaaaa	aaacgggcaa	ggtgtcacca	ccctgcccctt	4680
tttctttaa	accgaaaaga	ttacttcgc				4709

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria acetogénica carboxidotrófica preparada por ingeniería genética que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una aciltransferasa no específica;
- 5 en la que el ácido nucleico cuando se expresa en un microorganismo permite al microorganismo producir biodiésel por fermentación de CO y/o CO₂.
2. La bacteria de la reivindicación 1 que es un *Clostridium*.
3. La bacteria de la reivindicación 1 en la que la aciltransferasa no específica es una aciltransferasa de *Acinetobacter baylyi*.
4. La bacteria de la reivindicación 1 en la que el ácido nucleico es un plásmido.
- 10 5. La bacteria de la reivindicación 1 en la que la bacteria es *Clostridium autoethanogenum*.
6. La bacteria de la reivindicación 1 en la que la bacteria es *Clostridium ljundahlii*.
7. La bacteria de la reivindicación 1 en la que la bacteria es *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljundahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyrubacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii*, o *Thermoanaerobacter kiuvi*.
- 15 8. La bacteria de la reivindicación 5 en la que el ácido nucleico que codifica la aciltransferasa no específica está optimizado por codones para *Clostridium autoethanogenum*.
- 20 9. Un proceso para convertir CO y/o CO₂ en biodiésel, comprendiendo el proceso:
- pasar un sustrato gaseoso que contiene CO y/o que contiene CO₂ a un biorreactor que contiene un cultivo de la bacteria acetogénica carboxidotrófica de la reivindicación 1 en un medio de cultivo tal que la bacteria convierte el CO y/o CO₂ en biodiésel; y
- recuperar el biodiésel del biorreactor.
- 25 10. El proceso de la reivindicación 9 en el que el sustrato comprende un gas residual industrial.
11. El proceso de la reivindicación 9 en el que el cultivo es anaeróbico.
12. El proceso de la reivindicación 9 en el que el biodiésel comprende:
- (a) ésteres de etilo de ácidos grasos; o
- (b) ésteres de butilo de ácidos grasos.
- 30 13. El proceso de la reivindicación 9 en el que el sustrato comprende gas de síntesis.
14. Un plásmido que se replica en una bacteria acetogénica carboxidotrófica, comprendiendo dicho plásmido un ácido nucleico exógeno que codifica una aciltransferasa no específica;
- en la que el ácido nucleico que codifica la aciltransferasa no específica está optimizado por codones para *Clostridium autoethanogenum*;
- 35 y en la que además el ácido nucleico cuando se expresa en un microorganismo permite al microorganismo producir biodiésel por fermentación de CO y/o CO₂.
15. El plásmido de la reivindicación 14 que está metilado.

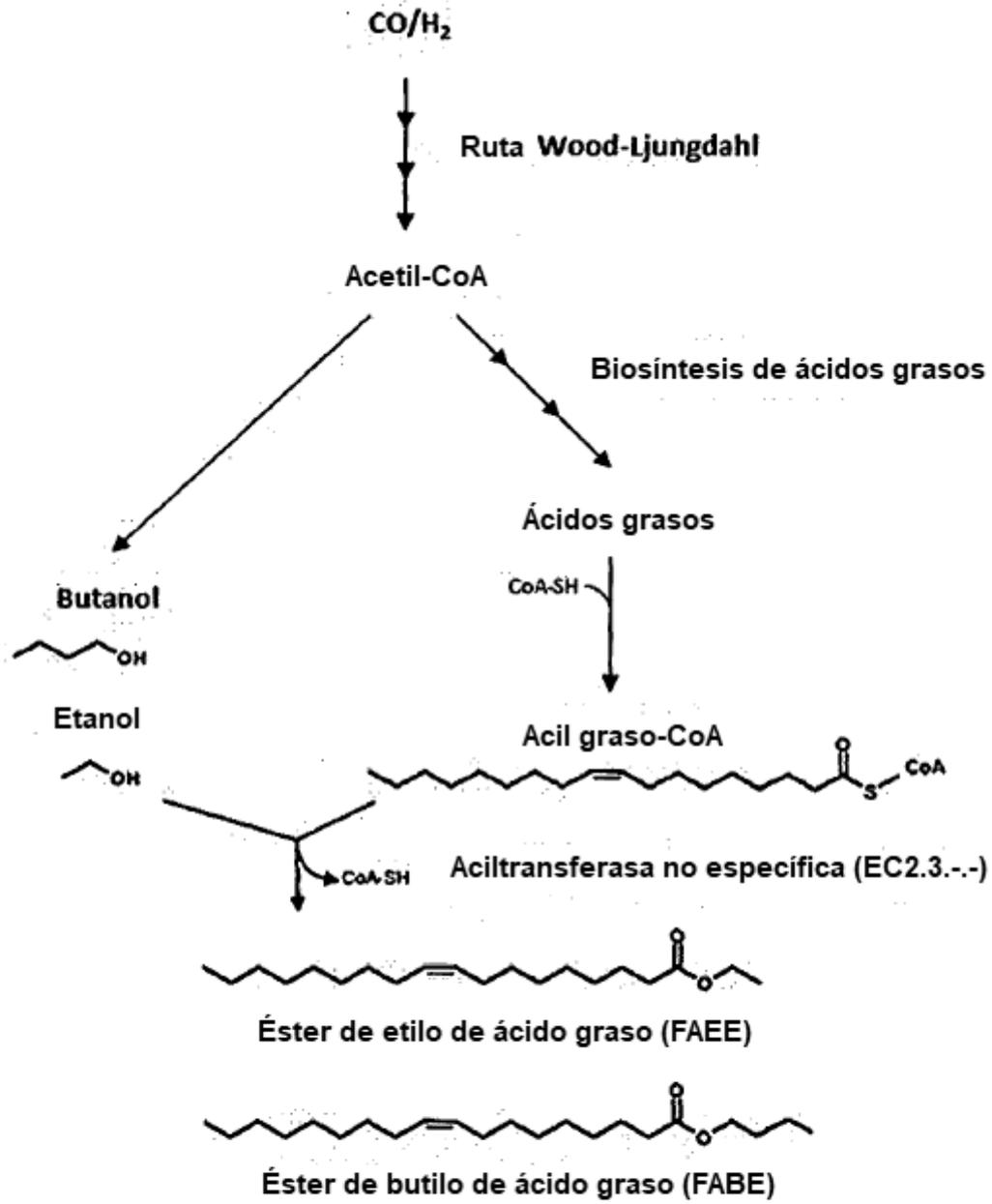


FIG. 1

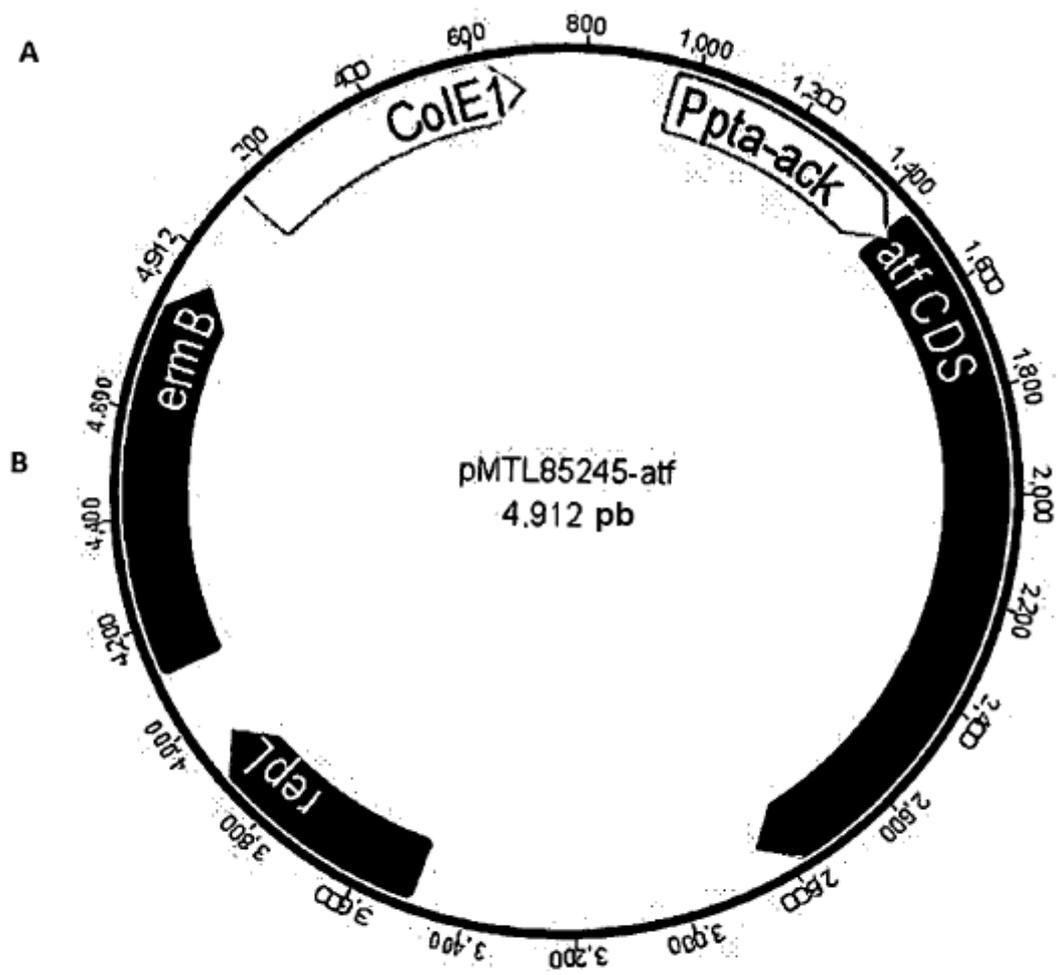


FIG. 2

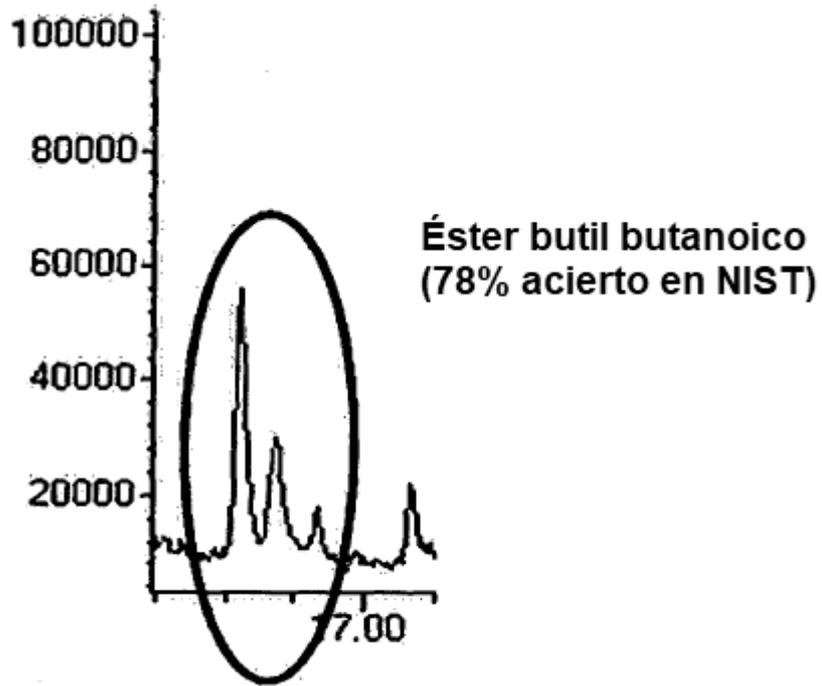


FIG. 3