

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 726**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 7/16** (2006.01)

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2015 PCT/US2015/038395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16025096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2015 E 15831619 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3180421**

54 Título: **Bacteria modificada por ingeniería genética con actividad de monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) reducida**

30 Prioridad:

**11.08.2014 US 201462036107 P**

**11.08.2014 US 201462036104 P**

**11.08.2014 US 201462036101 P**

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

**28.10.2019**

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)**

**239 Onehunga Mall, Onehunga**

**Auckland 1061, NZ**

72 Inventor/es:

**KOEPKE, MICHAEL y**

**LIEW, FUNGMIN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 728 726 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

Bacteria modificada por ingeniería genética con actividad de monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) reducida

5

**Antecedentes de la invención**

Determinados microorganismos pueden producir combustibles, tales como etanol, y otros productos químicos, tales como 2,3-butanodiol, mediante fermentación de sustratos gaseosos que comprenden uno o más de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrógeno (H<sub>2</sub>). Sin embargo, la producción eficaz de tales combustibles y productos químicos puede estar limitada por la desviación de sustratos de carbono hacia subproductos no deseados o por el crecimiento lento de los microorganismos. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de microorganismos modificados por ingeniería genética que tengan perfiles de crecimiento y/o producto mejorados.

10

15 **Sumario de la invención**

La invención proporciona microorganismos modificados por ingeniería genética con actividad de monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) alterada y métodos relacionados con los mismos. En particular, la invención proporciona una bacteria acetógena carboxidotrófica modificada por ingeniería genética que tiene actividad de CODH1 y/o CODH2 reducida o eliminada. La invención proporciona además un método para producir un producto mediante el cultivo de la bacteria en presencia de un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

20

La bacteria puede modificarse para comprender al menos una mutación negativa en un gen *CODH1* y/o gen *CODH2*, lo que da como resultado una actividad de CODH1 y/o CODH2 reducida o eliminada. Específicamente, la mutación o las mutaciones negativas pueden reducir o eliminar la expresión de un gen *CODH1* y/o gen *CODH2*. En una realización, la mutación negativa es una mutación de desactivación.

25

Asimismo, la bacteria puede modificarse para tener mayor actividad de CODH/ACS. En una realización, la bacteria puede sobreexpresar un gen *CODH/ACS*, lo que da como resultado mayor actividad de CODH/ACS.

30

La bacteria puede producir varios productos o subproductos, incluyendo etanol, 2,3-butanodiol, acetato y/o lactato. En una realización preferida, la bacteria produce uno o más de etanol y 2,3-butanodiol. La bacteria también puede tener características de crecimiento alteradas en comparación con una bacteria parental, tales como fase de latencia reducida o tasa de crecimiento aumentada. Preferentemente, la bacteria produce una mayor cantidad de etanol, produce una mayor cantidad de 2,3-butanodiol, produce una menor cantidad de acetato, tiene una fase de latencia más corta y/o tiene una tasa de crecimiento mayor en comparación con una bacteria parental.

35

La bacteria generalmente consume un sustrato gaseoso, tal como un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. El sustrato gaseoso puede obtenerse de gas de síntesis o un proceso industrial, por ejemplo.

40

En una realización preferida, la bacteria se obtiene de una bacteria parental de *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*.

**Breve descripción de los dibujos**

45

Las figs. 1A-1D son gráficos que muestran perfiles de crecimiento y metabolitos de un mutante de CODH1 (triángulos), un mutante de CODH2 (cruces) y *C. autoethanogenum* TS DSM10061 (círculos) en 206,84 kPa (30 psi) de CO. En particular, la fig. 1A muestra el crecimiento, la fig. 1B muestra la producción de etanol, la fig. 1C muestra la producción de acetato y la fig. 1D muestra la producción de 2,3-butanodiol. N = 3. Barra de error = error típico de la media.

50

Las figs. 2A-2C son gráficos que muestran perfiles de crecimiento y metabolitos de un mutante de CODH1 (triángulos) y *C. autoethanogenum* TS DSM10061 (círculos) sobre gas de acería. En particular, la fig. 2A muestra el crecimiento, la fig. 2B muestra la producción de etanol y la fig. 2C muestra la producción de acetato. N = 3. Barra de error = error típico de la media.

55

Las figs. 3A-3C son gráficos que muestran perfiles de crecimiento y metabolitos de un mutante de CODH1 (triángulos), un mutante de CODH2 (cruces) y *C. autoethanogenum* TS DSM10061 (círculos) en condiciones de H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>. En particular, la fig. 3A muestra el crecimiento, la fig. 3B muestra la producción de etanol y la fig. 3C muestra la producción de acetato. N = 3. Barra de error = error típico de la media.

60

La fig. 4 es un diagrama que muestra un mapa plasmídico de pMTL83157-CODH/ACS.

Las figs. 5A-5E son gráficos que muestran el efecto de la sobreexpresión de CODH/ACS en los perfiles de crecimiento y metabolitos de *C. autoethanogenum* DSM10061 con sobreexpresión de CODH/ACS (pMTL83157-CODH/ACS) (cuadrados) y de control de plásmido pMTL83157 (círculos) en CO al 100 %. En particular, la fig. 5A

65

muestra el crecimiento, la Fig. 5B muestra la producción de acetato, la fig. 5C muestra la producción de etanol, la fig. 5C muestra la producción de etanol, la fig. 5D muestra la producción de 2,3-butanodiol y la fig. 5E muestra la producción de lactato. N = 3. Barra de error = error típico de la media.

5 Las figs. 6A-6B son gráficos que muestran el crecimiento de *C. autoethanogenum* DSM10061 con CODH/ACS inactivado (cuadrados) y TS (círculos). La fig. 6A muestra la incapacidad del mutante de desactivación de CODH/ACS para crecer en CO. La fig. 6B muestra la incapacidad del mutante de desactivación de CODH/ACS para crecer en CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>.

10 Las figs. 7A-7D son gráficos que muestran el efecto de la inactivación de CODH/ACS en los perfiles de crecimiento y metabolitos de un mutante de desactivación de CODH/ACS (cuadrados), un mutante de desactivación de CODH/ACS complementado con el plásmido pMTL83157- CODH/ACS (triángulos) y *C. autoethanogenum* DSM10061 TS (círculos) en fructosa. En particular, la fig. 7A muestra el crecimiento, la Fig. 7B muestra la producción de acetato, la fig. 7C muestra la producción de etanol, y la fig. 7D muestra la producción de 2,3-butanodiol.

15 La fig. 8 es un diagrama que muestra que la inactivación de CODH/ACS puede evitar que la ruta de Wood-Ljungdahl actúe como sumidero para reducir los equivalentes generados durante la glucólisis, de modo que los equivalentes reductores excesivos generen fuerza motriz para la producción de etanol y 2,3-butanodiol.

## 20 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona, entre otros, nuevos microorganismos modificados por ingeniería genética con actividad de monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) reducida o eliminada y métodos relacionados con los mismos.

25 Las enzimas CODH (EC 1.2.99.2) son oxidorreductasas que catalizan la oxidación reversible de CO a CO<sub>2</sub> y generan equivalentes reductores según la ecuación: CO + H<sub>2</sub>O ↔ CO<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>. Las CODH son bien conocidos en la naturaleza y se han descrito en diversos organismos, incluyendo acetógenos carboxidotróficos.

30 Las CODH se pueden clasificar en general en dos categorías: (i) la CODH de Mo-Cu-Se de tipo Cox aeróbica de carboxidobacterias, que comprende un sitio activo de molibdeno altamente conservado y utiliza oxígeno (en ocasiones nitrato) como aceptor de electrones terminal; y (ii) la Ni-CODH de tipo anaeróbica, que transfiere los electrones liberados de la oxidación del CO a una gama de aceptadores de electrones fisiológicos, incluyendo ferredoxina, citocromos, flavodoxina, rubredoxina y NAD(P)<sup>+</sup>. Los equivalentes reductores se pueden aprovechar entonces en varias rutas, incluyendo acetogénesis, metanogénesis, reducción de sulfato, hidrogenogénesis y reducción de metales.

35 La Ni-CODH sensible a O<sub>2</sub> se puede dividir adicionalmente en dos grupos: (i) CODH mono-funcional que actúa fisiológicamente en la oxidación del CO; y (ii) CODH como parte de un complejo de CODH/ACS bifuncional que acopla la reducción de CO<sub>2</sub> en el resto de CO a la biosíntesis de acetil-CoA.

40 *C. autoethanogenum*, por ejemplo, es capaz de crecer de manera autótrofa utilizando CO como la única fuente de carbono y energía. La secuenciación del genoma descubrió tres Ni-CODH potenciales en este acetógeno: CAETHG\_3005 (*CODH1*), CAETHG\_3899 (*CODH2*), y CAETHG\_1620-1621 (*AcsA*, que codifica el componente de CODH del complejo de CODH/ACS bifuncional). *CODH1* se localiza genéticamente cadena arriba de una proteína de unión a Fe-S de ferredoxina 4Fe-4S potencial y ferredoxina-NAD(+) reductasa, mientras que *CODH2* parece ser un huérfano. De forma similar, también se describe que los acetógenos carboxidotróficos *C. ljungdahlii* y *C. carboxidivorans* tienen tres CODH, una CODH/ACS bifuncional y dos CODH monofuncionales adicionales. Adicionalmente, al menos *CODH1* se encuentra en todos los acetógenos carboxidotróficos secuenciados, incluyendo

45 *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei*, *C. difficile* y *A. woodii*.

La técnica anterior acepta en general que las CODH, incluyendo *CODH1* y *CODH2*, están implicadas en la utilización de CO. Por ejemplo, el documento US 2010/0151543 describe cómo la sobreexpresión de CODH dentro del acetógeno *Clostridia* puede aumentar el flujo de electrones de los componentes de gas de síntesis a los cofactores de nucleótidos oxidados NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>, por lo que los cofactores de nucleótidos (NADH y NADPH) estimulan entonces la generación de compuestos intermedios en la ruta de Wood-Ljungdahl.

50 Asimismo, el documento WO2013/073860 A1 describe cómo la sobreexpresión de CODH/ACS en el acetógeno *Clostridia* puede aumentar la producción de etanol.

60 Sin embargo, los inventores han identificado sorprendentemente que la alteración de *CODH1* y/o *CODH2* en un microorganismo acetógeno carboxidotrófico no afecta negativamente la utilización del gas. De hecho, los inventores han descubierto que la alteración de *CODH1* y/o *CODH2* en un microorganismo acetógeno carboxidotrófico da como resultado un microorganismo que produce una mayor cantidad de etanol, produce una menor cantidad de acetato, tiene una fase de latencia más corta y/o tiene una tasa de crecimiento mayor en comparación con un microorganismo parental sin modificar.

La invención proporciona una bacteria acetógena carboxidotrófica modificada por ingeniería genética que tiene actividad de CODH1 y/o CODH2 reducida o eliminada. La invención proporciona además un método para producir un producto mediante el cultivo de la bacteria en presencia de un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

5 *Microorganismos*

10 El microorganismo de la invención está modificado por ingeniería genética, es decir, no es de origen natural. La expresión "modificación genética" o "ingeniería genética" se refiere en general a la manipulación del genoma o ácidos nucleicos de un microorganismo. Análogamente, la expresión "modificado por ingeniería genética" se refiere a un microorganismo que comprende un genoma o ácidos nucleicos manipulados. Los métodos de modificación genética incluyen, por ejemplo, expresión génica heteróloga, inserción o supresión de genes o promotores, mutación del ácido nucleico, alteración de la expresión génica o inactivación, ingeniería enzimática, evolución dirigida, diseño basado en el conocimiento, métodos de mutagénesis aleatoria, transposición de genes y optimización de codones.

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

20 Un "microorganismo parental" es un microorganismo utilizado para generar un microorganismo de la invención. El microorganismo parental puede ser un microorganismo de origen natural (es decir, un microorganismo de tipo silvestre) o un microorganismo que se ha modificado previamente (es decir, un microorganismo mutante o recombinante). El microorganismo de la invención puede modificarse para expresar o sobreexpresar una o más enzimas que no se expresaron o sobreexpresaron en el microorganismo parental. De forma similar, el microorganismo de la invención puede modificarse para contener uno o más genes que no estaban contenidos en el microorganismo parental. En una realización, el microorganismo parental es *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* o *C. ragsdalei*. En una realización preferida, el microorganismo parental es *C. autoethanogenum* LZ1561, que está depositado con la referencia de DSMZ DSM23693.

30 La expresión "procedente de" indica que un ácido nucleico, proteína o microorganismo se modifica o adapta a partir de un ácido nucleico, proteína o microorganismo diferente (por ejemplo, un parental o de tipo silvestre), para producir un nuevo ácido nucleico, proteína o microorganismo. Dichas modificaciones o adaptaciones incluyen normalmente inserción, supresión, mutación o sustitución de ácidos nucleicos o genes. En general, el microorganismo de la invención procede de un microorganismo parental. En una realización, el microorganismo de la invención procede de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* o *C. ragsdalei*. En una realización preferida, el microorganismo de la invención procede de *C. autoethanogenum* LZ1561, que está depositado con la referencia de DSMZ DSM23693.

40 El microorganismo de la invención puede clasificarse adicionalmente basándose en características funcionales. Por ejemplo, el microorganismo puede ser o puede proceder de un microorganismo fijador de C1, un anaerobio, un acetógeno, un etanológeno, un carboxidotrofo y/o una combinación de los mismos. La Tabla 1 proporciona una lista representativa de microorganismos e identifica sus características funcionales.

**Tabla 1**

	Fijación de C1	Anaerobio	Acetógeno	Etanológeno	Autótrofo	Carboxidotrofo
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+/- <sup>1</sup>	-	+/- <sup>2</sup>
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Blautia producta</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium aceticum</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium coskatii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium drakei</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	+	+	+	-	+	+

(continuación)

Tabla 1

	Fijación de C1	Anaerobio	Acetógeno	Etanológeno	Autótrofo	Carboxidótrofo
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium magnum</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>3</sup>
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Moorella thermoacetica</i> (antes <i>Clostridium thermoaceticum</i> )	+	+	+	- <sup>4</sup>	+	+
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>5</sup>
<i>Sporomusa silvacetica</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>6</sup>
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	-	+	+/- <sup>7</sup>
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	+	+	+	-	+	-

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

<sup>2</sup> Se ha señalado que *Acetobacterium woodii* puede crecer en CO, pero la metodología es cuestionable.

5 <sup>3</sup> No se ha investigado si *Clostridium magnum* puede crecer en CO.

<sup>4</sup> Se ha señalado que una cepa de *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, produce etanol a partir de gas.

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

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

<sup>7</sup> No se ha investigado si *Sporomusa sphaeroides* puede crecer en CO.

10 "C1" se refiere a una molécula de un carbono, por ejemplo, CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> o CH<sub>3</sub>OH. "C1-oxigenado" se refiere a una molécula de un carbono que también comprende al menos un átomo de oxígeno, por ejemplo, CO, CO<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>OH. "Fuente de carbono C1" se refiere a una molécula de carbono que sirve como fuente de carbono parcial o exclusiva para el microorganismo. Por ejemplo, una fuente de carbono C1 puede comprender uno o más de CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>OH o CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Preferentemente, la fuente de carbono C1 comprende uno o ambos de CO y CO<sub>2</sub>. Un "microorganismo fijador de C1" es un microorganismo que tiene la capacidad de producir uno o más productos a partir de una fuente de carbono C1. Normalmente, el microorganismo es una bacteria fijadora de C1. En un aspecto, el microorganismo procede de un microorganismo fijador de C1 identificado en la Tabla 1.

20 Un "anaerobio" es un microorganismo que no requiere oxígeno para crecer. Un anaerobio puede reaccionar negativamente o incluso morir si está presente oxígeno por encima de un umbral determinado. Normalmente, el microorganismo es un anaerobio. En un aspecto, el microorganismo procede de un anaerobio identificado en la Tabla 1.

25 Un "acetógeno" es un microorganismo que produce o es capaz de producir acetato (o ácido acético) como producto de la respiración anaerobia. Normalmente, los acetógenos son bacterias anaerobias que utilizan la ruta de Wood-Ljungdahl como su mecanismo principal para la conservación de energía y para la síntesis de acetil-CoA y productos derivados de acetil-CoA, tales como acetato (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Los acetógenos utilizan la ruta de acetil-CoA como un (1) mecanismo para la síntesis reductora de acetil-CoA a partir de CO<sub>2</sub>, (2) proceso de conservación de energía, aceptador de electrones terminales, (3) mecanismo para la fijación (asimilación) de CO<sub>2</sub> en la síntesis de carbono celular (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, en: *The Prokaryotes*, 3ª edición, p. 354, Nueva York, NY, 2006). Todos los acetógenos de origen natural son fijadores de C1, anaerobios, autótrofos y no metanotróficos. Normalmente, el microorganismo de la invención es un acetógeno. En una realización preferida, el microorganismo de la invención procede de un acetógeno identificado en la Tabla 1.

35 Un "etanológeno" es un microorganismo que produce o es capaz de producir etanol. Normalmente, el microorganismo es un etanológeno. En un aspecto, el microorganismo procede de un etanológeno identificado en la Tabla 1.

Un "autótrofo" es un microorganismo capaz de crecer en ausencia de carbono orgánico. En su lugar, los autótrofos utilizan fuentes de carbono inorgánicas, tales como CO y/o CO<sub>2</sub>. Normalmente, el microorganismo es un autótrofo. En un aspecto, el microorganismo procede de un autótrofo identificado en la Tabla 1.

- 5 Un "carboxidótrofo" es un microorganismo capaz de utilizar CO como única fuente de carbono. Normalmente, el microorganismo de la invención es carboxidótrofo. En una realización preferida, el microorganismo de la invención procede de un carboxidótrofo identificado en la Tabla 1.

10 De manera más amplia, el microorganismo de la invención puede proceder de cualquier género o especie carboxidotrófica y acetógena identificada en la Tabla 1.

15 En una realización preferida, el microorganismo de la invención procede del grupo de *Clostridia* que comprende la especie *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei*. Estas especies fueron señaladas por primera vez y caracterizadas por Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994 (*C. autoethanogenum*), Tanner, Int J System Bacteriol, 43: 232-236, 1993 (*C. ljungdahlii*), y Huhnke, WO 2008/028055 (*C. ragsdalei*).

20 Estas tres especies tienen muchas similitudes. En particular, estas especies son todos miembros fijadores de C1, anaerobios, acetógenos, etanológicos y carboxidotróficos del género *Clostridium*. Estas especies tienen genotipos y fenotipos y modos de conservación de energía y metabolismo fermentativo similares. Por otra parte, estas especies se agrupan en el grupo I de homología de ARNr clostridial con ADN de ARNr 16S que es más de 99 % idéntico, tienen un contenido de ADN G + C de aproximadamente 22-30 % en moles, son grampositivas, tienen morfología y tamaño similares (células en crecimiento logarítmico entre 0,5-0,7 x 3-5 μm), son mesófilas (crecen de forma óptima a 30-37 °C), tienen intervalos de pH similares de aproximadamente 4-7,5 (con un pH óptimo de aproximadamente 5,5-6), carecen de citocromos y conservan energía a través de un complejo Rnf. Además, se ha mostrado reducción de ácidos carboxílicos en sus alcoholes correspondientes en estas especies (Pérez, Biotechnol Bioeng, 110:1066-1077, 2012). Es importante destacar que estas especies también muestran fuerte crecimiento autótrofo en gases que contienen CO, producen etanol y acetato (o ácido acético) como productos principales de fermentación y producen cantidades pequeñas de 2,3-butanodiol y ácido láctico en determinadas condiciones.

30 Sin embargo, estas tres especies también tienen varias diferencias. Estas especies se aislaron de diferentes fuentes: *C. autoethanogenum* de intestino de conejo, *C. ljungdahlii* de desperdicios de gallineros y *C. ragsdalei* de sedimento de agua dulce. Estas especies difieren en su utilización de diversos azúcares (por ejemplo, ramnosa, arabinosa), ácidos (por ejemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por ejemplo, arginina, histidina) y otros sustratos (por ejemplo, betaína, butanol). Por otra parte, estas especies difieren en su auxotrofia para determinadas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina). Estas especies tienen diferencias en las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de genes y proteínas de la ruta de Wood-Ljungdahl, aunque se ha encontrado que la organización general y el número de estos genes y proteínas es igual en todas las especies (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011).

40 Por tanto, en resumen, muchas de las características de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* o *C. ragsdalei* no son específicas de esa especie, sino que son más bien características generales para este grupo de miembros fijadores de C1, anaerobios, acetógenos, etanológicos y carboxidotróficos del género *Clostridium*. Sin embargo, ya que estas especies son, de hecho, distintas, la modificación o manipulación genética de una de estas especies puede no tener un efecto idéntico en otra de estas especies. Por ejemplo, pueden observarse diferencias en el crecimiento, rendimiento o producción del producto.

45 El microorganismo de la invención también puede proceder de un aislado o mutante de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* o *C. ragsdalei*. Los aislados y mutantes de *C. autoethanogenum* incluyen JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (documento WO 2009/064200) y LZ1561 (DSM23693) (documento WO 2012/015317). Los aislados y mutantes de *C. ljungdahlii* incluyen ATCC 49587 (Tanner, Int JSyst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (documento US 5.593.886), C-01 (ATCC 55988) (documento US 6.368.819), O-52 (ATCC 55989) (documento US 6.368.819) y OTA-1 (Tirado-Acevedo, Producción de bioetanol a partir de gas de síntesis usando *C. ljungdahlii*, Tesis doctoral, Universidad Estatal de Carolina del Norte, 2010). Los aislados y mutantes de *C. ragsdalei* incluyen PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (documento WO 2008/028055).

## 55 Enzimas

60 "CODH1" se refiere a CODH que cataliza la oxidación reversible de CO a CO<sub>2</sub> y genera equivalentes reductores según la ecuación: CO + H<sub>2</sub>O ↔ CO<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>. Se debe considerar que la referencia a "CODH1" en el presente documento incluye la referencia a variantes funcionalmente equivalentes de la misma. La CODH1 puede ser, por ejemplo, CODH1 de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 1), *C. ragsdalei* (SEQ ID NO: 5), *C. ljungdahlii* (ADK13979.1), *C. difficile* (YP\_001086644.1) o *A. woodii* (YP\_005269573).

65 "CODH2" se refiere a CODH que cataliza la oxidación reversible de CO a CO<sub>2</sub> y genera equivalentes reductores según la ecuación: CO + H<sub>2</sub>O ↔ CO<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>. Se debe considerar que la referencia a "CODH2" en el presente documento incluye la referencia a variantes funcionalmente equivalentes de la misma. La CODH2 puede ser, por

ejemplo, CODH2 de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 3), *C. ragsdalei* (SEQ ID NO: 7), *C. ljungdahlii* (ADK14854.1), *C. scatologenes* (SEQ ID NO: 9), *C. acetobutylicum* (AAK78101.1 y AAK80452.1), *C. carboxidivorans* "P7" (ZP\_05390164.1), *C. hydrogenoformans* (ABB14220.1, ABB14432.1 y ABB15066.1) o *C. Beijerinckii* (YP\_001310115.1). Asimismo, se pueden encontrar homólogos de CODH2 en *C. botulinum* (CBO\_2218; A513Y9), pero no en *C. perfringens*, *C. thermocellum*, *C. pasteurianum* o *C. kluyveri*.

El "CODH/ACS" bifuncional es exclusivo de las bacterias acetógenas y, además de la oxidación reversible de CO, también cataliza la síntesis de acetil-CoA a partir de CO, un grupo metilo y CoA. El complejo enzimático CODH/ACS consiste en múltiples subunidades: subunidad CODH (AcsA); subunidad ACS (AcsB); subunidad grande de proteína de hierro-azufre corrinoide (AcsC); subunidad pequeña de proteína de hierro-azufre corrinoide (AcsD); subunidad metiltransferasa (AcsE); y, proteína accesoria de CODH (CooC). Los inventores han descubierto que aumentar el nivel de actividad de CODH/ACS mejora el crecimiento y/o la formación de productos. Sorprendentemente, la sobreexpresión de una sola subunidad CODH del complejo de CODH/ACS es suficiente para aumentar la actividad del complejo.

La subunidad AcsB de CODH/ACS puede ser, por ejemplo, AcsB de *C. autoethanogenum* (gen CAETHG\_1608, proteína WP\_023162339.1), *C. ljungdahlii* (gen CLJU\_c37550, proteína WP\_013240359.1), *C. ragsdalei* (gen HQ876032.1, proteína AEI90761.1), *C. carboxidivorans* (gen Ccar3245, WP\_007061841.1), *C. scatologenes* (proteína WP\_029162953.1), *C. difficile* (gen CD0728, proteína WP\_021369307.1) y *A. woodii* (gen Awo\_c10760, proteína WP\_014357691.1).

La subunidad AcsC de CODH/ACS puede ser, por ejemplo, AcsC de *C. autoethanogenum* (gen CAETHG\_1610, proteína WP\_023162341.1), *C. ljungdahlii* (gen CLJU\_c37570, proteína WP\_013240361.1), *C. ragsdalei* (gen HQ876032.1, proteína AEI90763.1), *C. carboxidivorans* (gen Ccar3247, proteína WP\_007061843.1), *C. scatologenes* (proteína WP\_029162955.1), *C. difficile* (gen CD0730, proteína WP\_021369309.1) o *A. woodii* (gen Awo\_c10720, proteína WP\_014357687.1).

La subunidad AcsD de CODH/ACS puede ser, por ejemplo, AcsD de *C. autoethanogenum* (gen CAETHG\_1611, proteína WP\_023162342.1), *C. ljungdahlii* (gen CLJU\_c37580, proteína WP\_013240362.1), *C. ragsdalei* (gen HQ876032.1, proteína AEI90764.1), *C. carboxidivorans* (gen Ccar3248, proteína WP\_007061844.1), *C. scatologenes* (proteína WP\_029162956.1), *C. difficile* (gen CD0731, proteína WP\_021369310.1) o *A. woodii* (gen Awo\_c10710, proteína WP\_014357686.1).

La subunidad AcsE de CODH/ACS puede ser, por ejemplo, AcsE de *C. autoethanogenum* (gen CAETHG\_1609, proteína WP\_023162340.1), *C. ljungdahlii* (gen CLJU\_c37560, proteína WP\_013240360.1), *C. ragsdalei* (gen HQ876032.1, proteína AEI90762.1), *C. carboxidivorans* (gen Ccar3246, proteína WP\_007061842.1), *C. scatologenes* (proteína WP\_029162954.1), *C. difficile* (gen CD0729, proteína WP\_021369308.1) o *A. woodii* (gen Awo\_c10730, proteína WP\_014357688.1).

La proteína accesoria CooC de CODH/ACS puede ser, por ejemplo, CooC de *C. autoethanogenum* (gen CAETHG\_1612, proteína WP\_023162343.1), *C. ljungdahlii* (gen CLJU\_c37590, proteína WP\_013240363.1), *C. ragsdalei* (gen HQ876032.1, proteína AEI90765.1), *C. carboxidivorans* (gen Ccar3249, proteína WP\_007061845.1), *C. scatologenes* (proteína WP\_029162957.1), *C. difficile* (gen CD0732, proteína WP\_021369311.1) o *A. woodii* (gen Awo\_c10709, proteína WP\_014357685.1).

Se proporciona información de secuencia para CODH1, CODH2 y CODH/ACS para identificar secuencias ejemplares aplicables a la invención y para permitir que un experto en la materia practique realizaciones específicas de la invención sin experimentación indebida. Debería apreciarse que las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos para CODH1, CODH2 y CODH/ACS pueden diferir de un microorganismo a otro. En consecuencia, la invención no debe interpretarse como limitada a estas secuencias y realizaciones específicas, sino más bien para extenderse a variantes funcionalmente equivalentes de cualquier CODH1, CODH2 o CODH/ACS específica a la que se hace referencia en el presente documento, incluyendo homólogos en otras cepas y especies.

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

Dichos ácidos nucleicos o proteínas pueden denominarse en el presente documento "variantes funcionalmente equivalentes". A modo de ejemplo, las variantes funcionalmente equivalentes de un ácido nucleico pueden incluir variantes alélicas, fragmentos de un gen, genes mutados, polimorfismos y similares. Los genes homólogos de otros

microorganismos también son ejemplos de variantes funcionalmente equivalentes. Estos incluyen genes homólogos en especies tales como *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* o *C. ljungdahlii*, cuyos detalles están disponibles públicamente en sitios web tales como Genbank o NCBI. Las variantes funcionalmente equivalentes también incluyen ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de la optimización de codones para un microorganismo particular. Una variante funcionalmente equivalente de un ácido nucleico tendrá preferentemente al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98 % o mayor identidad de secuencia de ácido nucleico (porcentaje de homología) con el ácido nucleico de referencia. Una variante funcionalmente equivalente de una proteína tendrá preferentemente al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98 % o mayor identidad de aminoácidos (porcentaje de homología) con la proteína de referencia. La equivalencia funcional de un ácido nucleico o proteína variante puede evaluarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los ensayos enzimáticos de uso en la evaluación de la actividad de CODH1, CODH2, CODH/ACS y variantes de las mismas incluyen la purificación anaeróbica de CODH seguida de la medición espectrofotométrica del cambio en la absorbancia a 604 nm utilizando metil viológenos como aceptores de electrones (Ragsdale, J Biol Chem, 258: 2364-2369, 1983).

El microorganismo de la invención tiene actividad de CODH1 y/o CODH2 reducida o eliminada y, en una realización, actividad de CODH/ACS aumentada. La "actividad de la enzima", o simplemente "actividad", se refiere en general a la actividad enzimática, incluyendo, pero sin limitación, a la actividad de una enzima, la cantidad de una enzima o la disponibilidad de una enzima para catalizar una reacción. En consecuencia, "aumentar" la actividad enzimática incluye aumentar la actividad de una enzima, aumentar la cantidad de una enzima o aumentar la disponibilidad de una enzima para catalizar una reacción. De forma similar, "disminuir" o "reducir" la actividad de la enzima incluye disminuir la actividad de una enzima, disminuir la cantidad de una enzima o disminuir la disponibilidad de una enzima para catalizar una reacción. En una realización, la función o actividad de CODH1 y/o CODH2 disminuye. En otra realización, la función o actividad de CODH1 y / o CODH2 se elimina o elimina sustancialmente. En otra realización, la función o actividad de CODH/ACS aumenta. En una realización relacionada, la función o actividad de una o más subunidades o proteínas accesorias de CODH/ACS aumenta, particularmente la función o actividad de la subunidad CODH.

Como un enfoque, se puede lograr un cambio en la actividad de la enzima mediante la mutación de un gen que codifica una proteína. "Mutado" se refiere a un ácido nucleico o proteína que se ha modificado en el microorganismo de la invención en comparación con el microorganismo de tipo silvestre o parental del que procede el microorganismo de la invención. En una realización, la mutación puede ser una supresión, inserción o sustitución en un gen que codifica una enzima. En otra realización, la mutación puede ser una supresión, inserción o sustitución de uno o más aminoácidos en una enzima.

En particular, una "mutación negativa" es una mutación que reduce o elimina (es decir, "altera") la expresión o actividad de un gen o enzima. La mutación negativa puede inactivar parcialmente, inactivar completamente o suprimir el gen o enzima. La mutación negativa puede ser una mutación de desactivación (KO), por la que el gen o proteína se hace inoperante. La mutación negativa puede ser cualquier mutación que reduzca, prevenga o bloquee la biosíntesis de un producto producido por una enzima. La mutación negativa puede incluir, por ejemplo, una mutación en un gen que codifica una enzima, una mutación en un elemento regulador genético implicado en la expresión de un gen que codifica una enzima, la introducción de un ácido nucleico que produce una proteína que reduce o inhibe la actividad de una enzima o la introducción de un ácido nucleico (por ejemplo, ARN antisentido, ARNip, CRISPR) o proteína que inhibe la expresión de una enzima. El microorganismo de la invención comprende normalmente al menos una mutación negativa en un gen de CODH1 y/o gen de CODH2. Dicha mutación puede disminuir o eliminar la expresión del gen de CODH1 y/o del gen de CODH2 en comparación con un microorganismo parental.

La mutación negativa se puede introducir utilizando cualquier método conocido en la técnica. En particular, la mutación negativa se puede introducir inactivando permanentemente un gen mediante inserción dirigida de ADN extraño en la secuencia codificante. Se puede usar una herramienta genética conocida como ClosTron para insertar de manera estable un intrón (1,8 kb) en un locus específico. Específicamente, ClosTron utiliza la especificidad del intrón L1.ltrB del grupo móvil II de *L. lactis* para propagarse en el sitio especificado a través de un mecanismo de retrodirección, mediado por ARN (Heap, J Microbiol Meth, 80: 49-55, 2010). Otro enfoque implica la transferencia de plásmidos con ramas de homología para suprimir permanentemente parte del gen o el gen completo mediante el empleo de recombinación homóloga. Por ejemplo, un método genético denominado "ACE", o intercambio acoplado a alelo (Heap, Nucl Acids Res, 40: e59, 2012) se puede utilizar para llevar a cabo esta supresión sin depender del uso de un marcador contraseleccionable.

En algunas realizaciones, el microorganismo de la invención tiene actividad aumentada de CODH/ACS en combinación con actividad reducida o eliminada de CODH1 y/o CODH2. En particular, el microorganismo puede sobreexpresar un gen de CODH/ACS. En el presente documento, "gen CODH / ACS" se refiere a cualquier gen que codifique cualquier subunidad o proteína accesoria del complejo enzimático CODH/ACS. En una realización preferida, el microorganismo expresa un gen que codifica la subunidad CODH del complejo enzimático CODH/ACS. "Sobreexpresado" se refiere a un aumento en la expresión de un ácido nucleico o proteína en el microorganismo de

la invención en comparación con el microorganismo de tipo silvestre o parental del cual procede el microorganismo de la invención. Se puede lograr sobreexpresión por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo la modificación del número de copias del gen, tasa de transcripción del gen, tasa de traducción del gen o tasa de degradación enzimática.

5 Pueden administrarse ácidos nucleicos a un microorganismo de la invención usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden administrarse ácidos nucleicos como ácidos nucleicos desnudos o pueden formularse con uno o más agentes, tales como liposomas. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, ADNc o combinaciones de los mismos, según sea apropiado. Se pueden usar inhibidores de restricción en determinadas realizaciones. Los vectores adicionales pueden incluir plásmidos, virus, bacteriófagos, cósmidos y cromosomas artificiales. En una realización preferida, se administran ácidos nucleicos al microorganismo de la invención usando un plásmido. A modo de ejemplo, se puede lograr transformación (incluyendo transducción o transfección) mediante electroporación, ultrasonidos, transformación mediada por polietilenglicol, competencia química o natural, transformación por protoplastos, inducción de profagos o conjugación. En determinadas realizaciones que tienen sistemas de enzimas de restricción activos, puede ser necesario metilar un ácido nucleico antes de la introducción del ácido nucleico en un microorganismo.

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

Los ácidos nucleicos utilizados en la invención pueden ser codones optimizados para la expresión en una cepa o especie particular, particularmente *C. autoethanogenum* (incluyendo *C. autoethanogenum* LZ1561), *C. ljungdahlii* o *C. ragsdalei*. La "optimización de codones" se refiere a la mutación de un ácido nucleico, tal como un gen, para la traducción optimizada o mejorada del ácido nucleico en una cepa o especie particular. La optimización de codones puede dar como resultado tasas de traducción más rápidas o mayor precisión de traducción.

### 30 *Crecimiento y productos*

El microorganismo de la invención tiene un crecimiento y/o perfil metabólico alterado en comparación con el microorganismo parental del que procede. Por ejemplo, el microorganismo puede producir una mayor cantidad de etanol, producir una mayor cantidad de 2,3-butanodiol, producir una menor cantidad de acetato, tener una fase de latencia más corta y/o tener una tasa de crecimiento mayor en comparación con el microorganismo parental.

El microorganismo de la invención puede tener una fase de latencia alterada. "Fase de latencia" o "fase de latencia de crecimiento" se refiere a la cantidad de tiempo que tarda un cultivo o población de microorganismos en alcanzar la fase de crecimiento logarítmico inicial o la fase de crecimiento logarítmico/exponencial después de la inoculación. En una realización, el microorganismo tiene una fase de latencia más corta en comparación con un microorganismo parental. Por ejemplo, el microorganismo puede tener una fase de latencia que es aproximadamente 20 %, 25 % o 30 % más corta que la fase de latencia del microorganismo parental. En una realización, el microorganismo tiene una fase de latencia que es aproximadamente de 25 % a 30 % más corta que la fase de latencia del microorganismo parental. En otras realizaciones, el microorganismo puede tener una fase de latencia que es aproximadamente 3, 5 u 8 veces más corta que la fase de latencia del microorganismo parental. En una realización, la fase de latencia puede ser aproximadamente de 7,8 a 8 días más corta que la fase de latencia del microorganismo parental. En otra realización, la fase de latencia puede ser de aproximadamente 1-4 días o menos o aproximadamente 2,9 días o menos. En algunos casos, el microorganismo puede tener una fase de latencia drásticamente más corta que el microorganismo parental. Por ejemplo, el microorganismo puede tener una fase de latencia que es aproximadamente 10, 50, 100 o 200 veces más corta que la fase de latencia del microorganismo parental. En una realización, la fase de latencia puede ser de aproximadamente 0,1 días o menos.

El microorganismo de la invención puede tener una tasa de crecimiento alterada. "Tasa de crecimiento" se refiere a la tasa a la que un cultivo o población de microorganismos aumenta con el tiempo. Las tasas de crecimiento se expresan normalmente en el presente documento usando las unidades h<sup>-1</sup>. En una realización, el microorganismo tiene una tasa de crecimiento aumentada o mayor en comparación con el microorganismo parental. Por ejemplo, el microorganismo puede tener una tasa de crecimiento que es aproximadamente 20 %, 40 %, 60 %, 80 % o 100 % mayor que la tasa de crecimiento del microorganismo parental. En determinadas realizaciones, el microorganismo tiene una tasa de crecimiento que es aproximadamente 2, 3, 4 o 5 veces mayor que la tasa de crecimiento del microorganismo parental.

El microorganismo de la invención puede producir una cantidad alterada de biomasa. "Biomasa" se refiere a la población colectiva de microorganismos generados a partir de un proceso de crecimiento o fermentación. En una realización, la fermentación del microorganismo produce una cantidad aumentada o mayor de biomasa en comparación con la fermentación del microorganismo parental. Por ejemplo, la fermentación del microorganismo puede producir aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 80 %, 100 %, 120 %, 150 %, 180 %, 200 % o 220 % más

biomasa en comparación con la fermentación del microorganismo parental. En una realización, la fermentación del microorganismo produce aproximadamente 200 % a 220 % más biomasa en comparación con la fermentación del microorganismo parental.

5 El microorganismo de la invención puede producir una cantidad alterada de etanol. En una realización, el microorganismo produce una cantidad aumentada o mayor de etanol en comparación con un microorganismo parental. Por ejemplo, el microorganismo puede producir aproximadamente 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 % o 120 % más etanol en comparación con el microorganismo parental. En una  
10 realización, el microorganismo produce aproximadamente de 20 % a 113 % más etanol en comparación con el microorganismo parental.

El microorganismo de la invención puede producir una cantidad alterada de 2,3-butanodiol. En una realización, el microorganismo produce una cantidad aumentada o mayor de 2,3-butanodiol en comparación con un microorganismo parental. Por ejemplo, el microorganismo puede producir aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 260 %, 270 %, 280 %, 300 %, 320 % o 340 % más 2,3-butanodiol en comparación con el microorganismo parental. En una realización, el  
15 microorganismo produce aproximadamente de 220 % a 230 % más 2,3-butanodiol en comparación con el microorganismo parental. En otra realización, el microorganismo produce al menos aproximadamente 330 % más 2,3-butanodiol en comparación con el microorganismo parental. En una realización adicional, el microorganismo produce aproximadamente de 300 % a 330 % más 2,3-butanodiol en comparación con el microorganismo parental. En una realización adicional, el microorganismo produce aproximadamente 0,5-20 g/l de 2,3-butanodiol.

El microorganismo de la invención puede producir una cantidad alterada de acetato. El término "acetato" incluye tanto sal de acetato sola como una mezcla de ácido acético molecular o libre y sal de acetato. En una realización, el  
25 microorganismo produce una cantidad disminuida o menor de acetato en comparación con un microorganismo parental. Por ejemplo, el microorganismo puede producir aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % menos acetato en comparación con el microorganismo parental. En una realización, el microorganismo produce aproximadamente de 18 % a 37 % menos acetato en comparación con el microorganismo parental. En otra  
30 realización, el microorganismo produce aproximadamente 0-5 g/l de acetato.

El microorganismo de la invención puede producir una cantidad alterada de lactato. En una realización, el microorganismo produce una cantidad disminuida o menor de lactato en comparación con un microorganismo parental.

35 En una realización particularmente preferida, el microorganismo de la invención produce una cantidad aumentada de etanol y/o 2,3-butanodiol y una cantidad disminuida de acetato en comparación con un microorganismo parental.

El microorganismo y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para aumentar la eficacia de un proceso de fermentación. "Aumentar la eficacia", "eficacia aumentada", y similares incluyen, pero sin limitación, aumento de la tasa de crecimiento de microorganismos, tasa de producción o volumen del producto, volumen de producto por volumen de sustrato consumido o selectividad del producto. La eficacia puede medirse en relación con el rendimiento de un microorganismo parental del que procede el microorganismo de la invención.

El microorganismo de la invención también puede producir uno o más productos adicionales. Por ejemplo, *Clostridium autoethanogenum* produce o puede modificarse por ingeniería genética para producir etanol (documento WO 2007/117157), acetato (documento WO 2007/117157), butanol (documentos WO 2008/115080 y WO 2012/053905), butirato (documento WO 2008/115080), 2,3-butanodiol (documento WO 2009/151342), lactato (documento WO 2011/112103), buteno (documento WO 2012/024522), butadieno (documento WO 2012/024522), metil etil cetona (2-butanona) (documentos WO 2012/024522 y WO 2013/185123), etileno (documento WO 2012/026833), acetona (documento WO 2012/115527), isopropanol (documento WO 2012/115527), lípidos (documento WO 2013/036147), 3-hidroxipropionato (3-HP) (documento WO 2013/180581), isopreno (documento WO 2013/180584), ácidos grasos (documento WO 2013/191567), 2-butanol (documento WO 2013/185123), 1,2-propanodiol (documento WO 2014/0369152) y 1-propanol (documento WO 2014/0369152). En determinadas realizaciones, la biomasa microbiana en sí misma puede considerarse un producto.

La invención proporciona además métodos para producir uno o más productos, tales como etanol y/o 2,3-butanodiol, cultivando un microorganismo de la invención. También se desvelan métodos para reducir las emisiones de carbono atmosféricas totales de un proceso industrial utilizando un microorganismo de la invención para convertir CO, CO<sub>2</sub> y/o H<sub>2</sub> de un gas residual industrial en productos útiles.

#### 60 *Sustrato*

"Sustrato" se refiere a una fuente de carbono y/o energía para el microorganismo de la invención. Normalmente, el sustrato es gaseoso y comprende una fuente de carbono C1, por ejemplo, CO y/o CO<sub>2</sub>. Preferentemente, el sustrato comprende una fuente de carbono C1 de CO o CO + CO<sub>2</sub>. El sustrato puede comprender además otros componentes distintos de carbono, tales como H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o electrones.

- El sustrato generalmente comprende al menos alguna cantidad de CO, tal como aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % en moles de CO. El sustrato puede comprender una gama de CO, tal como aproximadamente 20-80, 30-70, o 40-60 % en moles de CO. Preferentemente, el sustrato comprende aproximadamente 40-70 % en moles de CO (por ejemplo, gas de acería o alto horno), aproximadamente 20-30 % en moles de CO (por ejemplo, gas de horno de oxígeno básico) o aproximadamente 15-45 % en moles de CO (por ejemplo, gas de síntesis). En algunas realizaciones, el sustrato puede comprender una cantidad relativamente baja de CO, tal como aproximadamente 1-10 o 1-20 % en moles de CO. El microorganismo de la invención normalmente convierte al menos una parte del CO del sustrato en un producto. En algunas realizaciones, el sustrato no comprende o sustancialmente no comprende CO.
- El sustrato puede comprender alguna cantidad de H<sub>2</sub>. Por ejemplo, el sustrato puede comprender aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 30 % en moles de H<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, el sustrato puede comprender una cantidad relativamente alta de H<sub>2</sub>, tal como aproximadamente 60, 70, 80 o 90 % en moles de H<sub>2</sub>. En realizaciones adicionales, el sustrato no comprende o sustancialmente no comprende H<sub>2</sub>. Se pueden producir corrientes de gas rico en H<sub>2</sub>, por ejemplo, mediante reforma por vapor de hidrocarburos, en particular, reforma por vapor de gas natural, oxidación parcial de carbón o hidrocarburos, electrólisis del agua y captura de subproductos de celdas electrolíticas utilizadas para producir cloro y de refinería o corrientes químicas.
- El sustrato puede comprender alguna cantidad de CO<sub>2</sub>. Por ejemplo, el sustrato puede comprender aproximadamente 1-80 o 1-30 % en moles de CO<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, el sustrato puede comprender menos de aproximadamente 20, 15, 10 o 5 % en moles de CO<sub>2</sub>. En otra realización, el sustrato no comprende o sustancialmente no comprende CO<sub>2</sub>. Las corrientes de gas rico en CO<sub>2</sub> incluyen, por ejemplo, gases de escape de la combustión de hidrocarburos, tal como combustión de gas natural o petróleo, subproductos de la producción de amoníaco, cal o fosfato y pozos de dióxido de carbono natural.
- Aunque el sustrato es normalmente gaseoso, el sustrato también se puede proporcionar en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato se puede disolver en un líquido saturado con un gas que contiene CO usando un generador de dispersión de microburbujas. A modo de ejemplo adicional, el sustrato puede adsorberse sobre un soporte sólido.
- El sustrato y/o la fuente de carbono C1 pueden ser un gas residual obtenido como un subproducto de un proceso industrial o de alguna otra fuente, tal como de gases de escape de automóviles o gasificación de biomasa. En determinadas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en la fabricación de productos de metales ferrosos, tal como una fabricación en acería, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinación 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 sustrato y/o la fuente de carbono C1 pueden capturarse del proceso industrial antes de que se emita a la atmósfera, utilizando cualquier método conveniente.
- El sustrato y/o la fuente de carbono C1 pueden ser gas de síntesis, tal como gas de síntesis obtenido por gasificación de carbón o residuos de refinería, gasificación de biomasa o material lignocelulósico o reforma de gas natural. En otra realización, el gas de síntesis puede obtenerse a partir de la gasificación de residuos sólidos municipales o residuos sólidos industriales.
- La composición del sustrato puede tener una influencia significativa en la eficacia y/o el coste de la reacción. Por ejemplo, la presencia de oxígeno (O<sub>2</sub>) puede reducir la eficacia de un proceso de fermentación anaerobia. En función de la composición del sustrato, puede ser deseable tratar, frotar o filtrar el sustrato para retirar cualquier impureza no deseada, tal como toxinas, componentes no deseados o partículas de polvo, y/o aumentar la concentración de componentes deseables.
- Efecto del sustrato y modificaciones genéticas*
- La composición del sustrato puede afectar al perfil de crecimiento y/o metabólico del microorganismo de la invención. Por ejemplo, un microorganismo que crece en CO puede tener un perfil de crecimiento y/o metabólico diferente al de un microorganismo que crece en CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>. Adicionalmente, la combinación particular de modificaciones genéticas puede afectar al perfil de crecimiento y/o metabólico del microorganismo de la invención. Por ejemplo, un microorganismo que comprende una mutación negativa en un gen *CODH1* puede tener un perfil de crecimiento y/o metabólico diferente al de un microorganismo que comprende una mutación negativa en un gen *CODH2*, que puede tener un perfil de crecimiento y/o metabólico diferente al de un microorganismo que comprende una mutación negativa tanto en un gen *CODH1* como en un gen *CODH2*. La sobreexpresión de *CODH/ACS* en cualquiera de estos microorganismos puede alterar adicionalmente el perfil de crecimiento y/o metabólico de los microorganismos. La combinación estratégica de modificaciones genéticas y el crecimiento de microorganismos en sustratos particulares puede producir perfiles de crecimiento y/o metabólicos adaptados a aplicaciones específicas u objetivos de producción.
- El crecimiento de una cepa con desactivación de *CODH1* en CO generalmente da como resultado disminución de la producción de biomasa, disminución de la producción de acetato, aumento de la producción de etanol y producción

similar de 2,3-butanodiol. El crecimiento de una cepa con desactivación de *CODH1* en  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  da como resultado en general una disminución de la fase de latencia y crecimiento más rápido. Por ejemplo, una cepa con desactivación de *CODH1* que crece en  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  puede no tener fase de latencia y puede producir aproximadamente 0,4 g/l de biomasa.

5 El crecimiento de una cepa con desactivación de *CODH2* en CO generalmente da como resultado disminución de la fase de latencia, disminución de la producción de etanol, disminución de la producción de acetato y aumento o producción similar de 2,3-butanodiol. Por ejemplo, una cepa con desactivación de *CODH2* que crece en CO puede tener una fase de latencia de 2-4 días y puede producir aproximadamente 0,1-4 g/l de acetato. El crecimiento de una  
10 cepa con desactivación de *CODH2* en  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  da como resultado en general disminución de la fase de latencia y crecimiento más rápido. Por ejemplo, una cepa con desactivación de *CODH2* que crece en  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  puede tener una fase de latencia de 4 días.

15 El crecimiento de una cepa con sobreexpresión de *CODH/ACS* en CO da como resultado en general disminución de la fase de latencia, aumento de la producción de etanol, producción de acetato similar y aumento de la producción de lactato.

### *Fermentación*

20 Normalmente, el cultivo se realiza en un biorreactor. El término "biorreactor" incluye un dispositivo de cultivo/fermentación que consiste en uno o más vasos, torres o disposiciones de tuberías, tales como un reactor de tanque agitado continuo (CSTR), reactor celular inmovilizado (ICR), reactor de lecho percolador (TBR), columna de burbujeo, fermentador de elevación de gases, mezclador estático u otro vaso u otro dispositivo adecuado para contacto de gas-líquido. En algunas realizaciones, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento  
25 y un segundo reactor de cultivo/fermentación. El sustrato puede proporcionarse a uno o ambos de estos reactores. Como se usa en el presente documento, los términos "cultura" y "fermentación" se usan indistintamente. Estos términos abarcan tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis del producto del proceso de cultivo/fermentación.

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

35 El cultivo/fermentación debería llevarse a cabo convenientemente en condiciones apropiadas para la producción del producto diana. Normalmente, el cultivo/fermentación se realiza en condiciones anaeróbicas. Las condiciones de reacción para considerar incluyen presión (o presión parcial), temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial rédox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones máximas de sustrato de gas para garantizar que el gas en la fase líquida no vuelva  
40 limitante y concentraciones máximas de producto para evitar la inhibición del producto. En particular, la velocidad de introducción del sustrato se puede controlar para garantizar que la concentración de gas en la fase líquida no se vuelva limitante, ya que los productos pueden ser consumidos por el cultivo en condiciones limitadas de gas.

45 El funcionamiento de un biorreactor a presiones elevadas permite una tasa aumentada de transferencia de masa de gas de la fase gaseosa a la fase líquida. En consecuencia, en general, es preferible realizar el cultivo/fermentación a presiones mayores que la presión atmosférica. Además, ya que una tasa de conversión de gas dada es, en parte, una función del tiempo de retención del sustrato y el tiempo de retención dicta el volumen requerido de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en gran medida el volumen del biorreactor necesario y, en consecuencia, el coste de capital del equipo de cultivo/fermentación. Esto, a su vez, significa que el tiempo de  
50 retención, definido como el volumen de líquido en el biorreactor dividido por el caudal de gas de entrada, se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de la presión atmosférica. Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular utilizado. Sin embargo, en general, es preferible operar la fermentación a una presión mayor que la presión atmosférica. Además, ya que una tasa de conversión de gas dada es en parte una función del tiempo de retención del sustrato y lograr un tiempo de retención deseado a su vez dicta el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir en  
55 gran medida el volumen del biorreactor necesario y, en consecuencia, el coste de capital del equipo de fermentación.

Los productos diana pueden separarse o purificarse a partir de un caldo de fermentación utilizando cualquier método o combinación de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, destilación fraccionada, evaporación, pervaporación, extracción de gas, separación de fases y fermentación extractiva, incluyendo, por ejemplo, extracción líquido-líquido. En determinadas realizaciones, se recuperan productos diana del caldo de fermentación retirando continuamente una parte del caldo del biorreactor, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración) y recuperando uno o más productos diana del caldo. Se pueden recuperar alcoholes y/o acetona, por ejemplo, por destilación. Los ácidos pueden recuperarse, por ejemplo, mediante adsorción sobre carbón activado.  
60 Las células microbianas separadas se devuelven preferentemente al biorreactor. El permeado sin células que permanece después de haber retirado productos diana preferentemente también se devuelve al biorreactor. Se

pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitaminas B) al permeado sin células para reponer el medio antes de devolverlo al biorreactor.

### Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

#### Ejemplo 1

10 Este ejemplo describe la inactivación por inserción basada en intrones del grupo II de los genes de CODH1 y CODH2 implicados en la fijación de carbono en *C. autoethanogenum* DSM10061.

Se obtuvo *C. autoethanogenum* DSM10061 de la DSMZ, la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania. La cepa de conjugación de *E. coli* CA434 fue proporcionada amablemente por el profesor Nigel Minton (Universidad de Nottingham, Reino Unido).

El genoma de *C. autoethanogenum* DSM 10061 codifica las monóxido de carbono deshidrogenasas (CODH) CODH1 (SEQ ID NO: 1 y 2) y CODH2 (SEQ ID NO: 3 y 4). Estos CODH se inactivaron utilizando la herramienta de alteración génica mediada por intrones del grupo II de ClosTron (Heap, J Microbiol Meth, 80: 49-55, 2010). El algoritmo de Perutka alojado en el sitio web de ClosTron se usó para identificar el sitio diana del intrón del grupo II entre las bases 600/601 y 528/529 en la cadena con sentido de los genes de CODH1 y CODH2, respectivamente. Se utilizó el mismo algoritmo para diseñar las regiones de direccionamiento de intrones para CODH1 (SEQ ID NO: 15) y CODH2 (SEQ ID NO: 16) que fueron sintetizadas comercialmente por DNA2.0 Inc. (CA) y se administraron en el vector pTML007C-E2 (HQ263410.1). Los vectores finales, pMTL007C-E2-CODH1-600!601s y pMTL007C-E2-CODH2-528!529s contenían un marcador de *ermB* activado por retrotransposición (RAM) que confirió resistencia a la claritromicina antibiótica tras la inserción en el sitio diana.

Los plásmidos pMTL007C-E2-CODH1-600!601s y pMTL007C-E2-CODH2-528!529s se introdujeron en *C. autoethanogenum* DSM 10061 como se ha descrito anteriormente y en el documento WO 2012/053905. La mezcla de transformación se aplicó puntualmente en medio de agar YTF y se incubó a 37 °C dentro de la estación de trabajo anaeróbica. Después de 24 horas, las células se rasparon y se resuspendieron en 500 µl de PBS y se extendieron en medio de agar YTF complementado con 7,5 µg/ml de tianfenicol (Sigma). Los transformantes se seleccionaron utilizando 7,5 µg/ml de tianfenicol. Se observaron colonias después de 3 días de incubación.

35 Primero se hicieron secuencialmente estrías de colonias individuales en medios YTF complementados con 7,5 µg/ml de tianfenicol y 10 µg/ml de trimetoprim, seguidos de medios YTF que contienen 6 µg/ml de claritromicina. Se seleccionaron aleatoriamente > 8 colonias para la inserción del grupo II por PCR (kit Maxime PCR PreMix) usando oligonucleótidos flanqueantes.

Nombre del cebador	Gen diana	Tamaño de amplicón TS (pb)	Tamaño de amplicón mutante (pb)
CODH1-601s-F	CODH1	377	2177
CODH1-601s-R			
CODH2-529s-F	CODH2	425	2225
CODH2-529s-R			
Univ-0027-F	ARNr 16s	1600	No aplicable
Univ-1492-R			

40 La amplificación de colonias resistentes a claritromicina usando oligonucleótidos flanqueantes y análisis de electroforesis en gel mostró la presencia de la banda de ClosTron mayor (> 2 kb) en lugar de la banda de tipo silvestre menor (< 520 pb), lo que indicó que el intrón del grupo II de ClosTron se había insertado con éxito en los sitios CODH especificados (CODH1::CTer-mB-601s y CODH2::CTermB-529s). Estos amplicones se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y la secuencia se validó mediante secuenciación de Sanger (Source Bioscience, Reino Unido).

50 Como una etapa de validación final, los clones verificados por PCR se sometieron a análisis de transferencia de Southern para confirmar la inserción única de ClosTron. Se aisló ADN genómico de los mutantes ClosTron según Bertram, Arch Microbiol, 151: 551-557, 1989 y después se digirió con la enzima de restricción HindIII. Los productos de digestión se sometieron a análisis de transferencia de Southern utilizando una sonda DIG marcada aleatoriamente (Roche) y se realizaron según las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos EBS2 (SEQ ID NO: 27) e Intrón-Sall-R1 (SEQ ID NO: 28) se utilizaron para generar la sonda, utilizando el plásmido pMTL007C-E2

como molde. La sonda resultante se hibridó con el intrón del grupo II. El análisis de transferencia de Southern detectó una única banda por clon mutante, lo que indica un único acontecimiento de inserción del intrón del grupo II en el genoma de *C. autoethanogenum* DSM10061. Estos mutantes validados se denominaron CODH1::CTermB-601s (o "mutante de CODH1") y CODH2::CTermB-529s (o "mutante de CODH2").

5

#### Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra el efecto de la inactivación de CODH1 en *C. autoethanogenum* DSM10061 cultivado en condiciones de CO.

10

La capacidad del mutante de CODH1 para crecer de forma autótrofa con 100 % de CO se ensayó por triplicado en frascos de suero de 250 ml que contenían 50 ml de medios de PETC presurizados con 206,84 kPa (30 psi) de CO. Se inoculó un equivalente de DO600 0,5 de cultivo activo en cada frasco de suero y se recogieron muestras de fase líquida para mediciones de DO a una longitud de onda de 600 nm y análisis de metabolitos mediante HPLC.

15

Se realizaron análisis de metabolitos mediante HPLC utilizando un sistema de HPLC Agilent serie 1100 equipado con un RID operado a 35 °C (detector de índice de refracción) y una columna de ácido orgánico Alltech IOA-2000 (150 x 6,5 mm, tamaño de partícula 5 µm) mantenida a 60 °C. Se utilizó agua ligeramente acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M) como fase móvil con un caudal de 0,7 ml/min. Para eliminar proteínas y otros residuos celulares, se mezclaron muestras de 400 µl con 100 µl de un ácido 5-sulfosalicílico al 2 % (p/v) y se centrifugaron a 14.000 x g durante 3 min para separar los residuos precipitados. Después se inyectaron 10 µl del sobrenadante en la HPLC para análisis.

20

Como se muestra en las Figs. 1A-1D, el mutante CODH1 mostró perfiles metabólicos favorables en forma de etanol potenciado a expensas de la biomasa (42 % menos) y la formación de acetato. El mutante de CODH1 produjo 64 % más etanol (Fig. 1B), 25 % menos acetato (Fig. 1C) y 2,3-butanodiol similar (Fig. 1D) que TS.

25

También se observó un patrón similar cuando el mutante de CODH1 y TS se cultivaron en gas de acería que comprendía 51,24 % de CO, 31,22 % de N<sub>2</sub>, 11,98 % de CO<sub>2</sub> y 3,05 % de H<sub>2</sub> de una acería en Glenbrook, Nueva Zelanda. El experimento se realizó por triplicado en frascos de suero de 250 ml que contenían 100 ml de medio de PETC y se presurizó a 206,84 kPa (30 psi) con gas de acería. En términos de crecimiento en CO (en gas de acería), el mutante de CODH1 produjo 113 % más etanol (Fig. 2B), de nuevo a expensas de la biomasa (17 % menos) (Fig. 2A) y acetato (18 % menos) (Fig. 2C) que TS.

30

#### Ejemplo 3

35

Este ejemplo demuestra el efecto de la inactivación de CODH2 en *C. autoethanogenum* DSM 10061 cultivado en condiciones de CO.

La capacidad del mutante de CODH2 para crecer de forma autótrofa en 100 % de CO se ensayó en las mismas condiciones que el mutante de CODH1, descrito anteriormente. En comparación con TS, el mutante de CODH2 presentó reducción de la fase de latencia de 1 día utilizando al mismo tiempo 100 % de CO como sustrato (Fig. 1A). La fase exponencial temprana del mutante de CODH2 se produjo el día 3,8, en comparación con la fase exponencial de TS el día 4,8 (Fig. 1A). El mutante de CODH2 produjo 27 % menos acetato (Fig. 1C) y 27 % menos etanol que TS (Fig. 1B). Sin embargo, la producción de 2,3-butanodiol máxima del mutante de CODH2 fue mayor que TS (Fig. 1D).

40

45

#### Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra el efecto de la inactivación de CODH1 o CODH2 en *C. autoethanogenum* DSM10061 cultivado en condiciones de H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>.

50

Para ensayar la capacidad de los mutantes de CODH1 y CODH2 para crecer en hidrógeno y dióxido de carbono, TS y los mutantes CODH se inocularon por separado en 50 ml de medio PETC (sin fructosa) en frascos de suero de 250 ml por triplicado, y el espacio libre superior se intercambió con 137,90 kPa (20 psi) de H<sub>2</sub> + 68,95 kPa (10 psi) de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C con agitación y se recogieron muestras para mediciones de DO600 y análisis por HPLC.

55

En condiciones de H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, el mutante de CODH1 presentó un perfil de crecimiento notablemente mejorado con respecto a TS. TS experimentó una fase de latencia de 6 días antes de alcanzar una DO600 máxima de 0,184 el día 22,7, mientras que el mutante de CODH1 fue capaz de crecer sin fase de latencia evidente y alcanzó una DO600 máxima de 0,40 el día 1,6 (Fig. 3A). El mutante de CODH2 presentó una fase de latencia más corta y un crecimiento más rápido que TS y alcanzó una DO600 máxima de 0,20 (Fig. 3A). El análisis por HPLC mostró que el mutante de CODH1 produjo niveles muy similares de acetato y etanol, el mutante de CODH2 y TS en condiciones de H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> (Figs. 3B-5C).

60

65

## Ejemplo 5

Este ejemplo describe el efecto esperado de la inactivación combinada de CODH1 y CODH2 en *C. autoethanogenum* DSM10061 cultivado en condiciones de CO.

5 Dado el perfil de metabolitos deseable del mutante de CODH1 en condiciones de CO y la fase de latencia reducida de los mutantes de CODH1 y CODH2 en condiciones tanto de CO como de H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, la inactivación combinada de CODH1 y CODH2 puede dar como resultado una cepa que tiene perfiles de crecimiento y metabolitos superiores en condiciones autotróficas. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, la inactivación de estas dos CODH  
10 puede aumentar la disponibilidad de CO y/o CO<sub>2</sub> para reacción con la CODH/ACS y dar como resultado formación más eficaz de acetil-CoA.

Por ejemplo, el intercambio acoplado a alelo o ACE (Heap, Nucl Acids Res, 40: e59, 2012) se puede utilizar para generar una interrupción doble de CODH (es decir, CODH1 y CODH2). Utilizando esta técnica, el gen *pyrE* (SEQ ID  
15 NO: 19) de *C. autoethanogenum* DSM10061 puede suprimirse para que se pueda utilizar *pyrE* como un marcador seleccionable positivo y negativo para estadios posteriores de la manipulación genética. Los mutantes con *pyrE* suprimido son auxotróficos para uracilo y resistentes al profármaco ácido 5'-fluoroorótico. Como siguiente etapa, un plásmido Clostron que se dirige a una de las CODH puede introducirse en mutante de supresión de *pyrE* y las colonias resistentes a la claritromicina pueden verificarse mediante PCR, secuenciación y transferencia de Southern.  
20 Una vez que se ha confirmado la inactivación por Clostron de un CODH en este mutante de supresión de *pyrE*, se puede introducir un plásmido de supresión de ACE que contiene *pyrE* como un marcador seleccionable negativo para suprimir la otra CODH. Como etapa final, puede introducirse un plásmido de ACE con el gen *pyrE* para restaurar la integridad de *pyrE*, lo que da como resultado un mutante de alteración de CODH1 y CODH2 combinado en un fondo TS con gen *pyrE* funcional.

25 *Ejemplo 6 (ejemplo de referencia)*

Este ejemplo demuestra la construcción e introducción del plásmido de sobreexpresión de CODH/ACS en *C. autoethanogenum* DSM 10061.

30 *C. autoethanogenum* DSM 10061 se obtuvo de la DSMZ, la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania. Se obtuvieron cepas de *E. coli* DH5α-T1<sup>R</sup> y XL1-Blue MRF' de Invitrogen y Stratagene, respectivamente.

35 Las secuencias de ADN del promotor Wood-Ljungdahl (P<sub>WL</sub>) (SEQ ID NO: 18) y las subunidades AcsA (SEQ ID NO: 12) y AcsB (SEQ ID NO: 14) de monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (CODH/ACS) bifuncionales, ambas de *C. autoethanogenum* DSM10061, se obtuvieron a partir de la secuenciación del genoma. Se descubrió que el grupo de Wood-Ljungdahl de *C. autoethanogenum* estaba altamente expresado en condiciones autótroficas (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011) de modo que se usó P<sub>WL</sub> para la expresión de  
40 CODH/ACS. Se aisló ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM10061 usando un método modificado por Bertram, Arch Microbiol, 151: 551-557, 1989. Se recogió un cultivo de una noche de 100 ml (6.000 x g, 15 min, 4 °C), se lavó con tampón de fosfato de potasio (10 mM, pH 7,5) y se suspendió en 1,9 ml de tampón de STE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 200 mM; 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 solución de SDS al 10 % (p/v) y otra incubación  
45 durante 10 min. Se digirió ARN a temperatura ambiente mediante la adición de 240 µl de una solución de EDTA (0,5 M, pH 8), 20 µl de Tris-HCl (1 M, pH 7,5) y 10 µl de RNasa A (Fermentas). Después, se añadieron 100 µl de proteinasa K (0,5 U) y tuvo lugar proteólisis durante 1-3 h a 37 °C. Finalmente, se añadieron 600 µl de perclorato de sodio (5 M), seguido de una extracción con fenolcloroformo y una precipitación con isopropanol. La cantidad y calidad de ADN se inspeccionó espectrofotométricamente.

50 El gen de CODH/ACS y P<sub>WL</sub> se amplificaron mediante PCR utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad de Phusion (New England Biolabs). La P<sub>WL</sub> de 573 pb amplificada se clonó en el vector lanzadera de *E. coli-Clostridium* pMTL 83151 (número de referencia de GenBank FJ797647; Nigel Minton, Universidad de Nottingham; Heap, J Microbiol Meth, 78: 79-85, 2009) utilizando sitios de restricción *NotI* y *NdeI* y cepa DH5α-T1<sup>R</sup> (Invitrogen), lo que da como  
55 resultado el plásmido pMTL83157. Dado que la secuencia codificante de CODH/ACS contiene un sitio *NdeI* interno, se usó PCR solapante de corte y empalme (SOE) (Warrens, Gene, 186: 29-35, 1997) para eliminar este sitio *NdeI* sin alteración del codón. Tanto el producto de PCR de 1946 pb de CODH/ACS como el plásmido pMTL83157 se digirieron con *NdeI* y *SacI*, y se ligaron para producir el plásmido pMTL83157-CODH/ACS (Fig. 4) (SEQ ID NO: 20).

60 La inserción del plásmido de expresión pMTL83157-CODH/ACS se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos CODH/ACS-*NdeI*-F (SEQ ID NO: 31) y CODH/ACS-*SacI*-R (SEQ ID NO: 32). La secuenciación de Sanger utilizando cebadores CODH/ACS-*NdeI*-F y CODH/ACS-*SacI*-R confirmó que el sitio *NdeI* interno de CODH/ACS se había alterado con éxito y estaba exento de mutaciones.

65

Diana	Oligonucleótido
P <sub>WL</sub>	P <sub>WL</sub> -NotI-F
P <sub>WL</sub>	P <sub>WL</sub> -NdeI-R
CODH/ACS	CODH/ACS-NdeI-F
CODH/ACS	CODH/ACS-SacI-R
CODH/ACS	CODH/ACS-SOE-B
CODH/ACS	CODH/ACS-SOE-C

Los plásmidos pMTL83157 y pMTL83157-CODH/ACS se introdujeron en *C. autoethanogenum* DSM10061 conjugando con la cepa de *E. coli* donante CA434 como donante. Se cultivaron cepas donantes durante una noche en medio LB complementado con 25 µg/ml de cloranfenicol y 100 µg/ml de espectinomicina. Se recogieron células de 1,5 ml de cultivo mediante centrifugación y se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Dentro de una estación de trabajo anaeróbica, el sedimento de células del donante se resuspendió en 200 µl de receptor de crecimiento exponencial *C. autoethanogenum* DSM10061. La mezcla de conjugación se aplicó puntualmente en medio de agar YTF y se incubó a 37 °C dentro de una estación de trabajo anaeróbica. Después de 24 horas, las células se rasparon y se resuspendieron en 500 µl de PBS y se extendieron en medio de agar YTF complementado con 7,5 µg/ml de tianfenicol (Sigma) y 10 µg/ml de trimetoprim (Sigma). Se seleccionaron transconjugantes de *C. autoethanogenum* utilizando 7,5 µg/ml de tianfenicol mientras que la cepa de *E. coli* CA434 se contraseleccionó utilizando 10 µg/ml de trimetoprim. Se observaron colonias después de 3 días de incubación y se volvieron a sembrar en estrías en el mismo medio de agar selectivo para purificación.

Análogamente, el plásmido podría introducirse en otros acetógenos carboxidotróficos, tales como *C. ljungdahlii* o *C. ragsdalei*, utilizando protocolos similares.

Para comprobar la identidad de los transconjugantes, el ARNr 16s se amplificó y se secuenció por Sanger utilizando los oligonucleótidos Univ-0027-F (SEQ ID NO: 25) y Univ-1492-R (SEQ ID NO: 26). Se extrajo ADN plasmídico de transconjugantes de *C. autoethanogenum* y se transformaron en *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) antes de llevar a cabo el análisis de digestión de restricción del plásmido. Esto se denomina habitualmente 'rescate de plásmido' porque los plásmidos aislados de *Clostridia* no son de suficiente calidad para el análisis de digestión de restricción. La electroforesis en gel de los plásmidos digeridos por restricción con *PmeI* y *FseI* rescatados de transconjugantes pMTL83157 mostró la presencia de los fragmentos esperados (2600 pb y 2424 pb). La electroforesis en gel de los plásmidos digeridos por restricción con *NdeI* y *SacI* rescatados de transconjugantes pMTL83157-CODH/ACS mostró la presencia de los fragmentos esperados (4995 pb y 1932 pb).

#### Ejemplo 7 (ejemplo de referencia)

Este ejemplo demuestra el efecto de la sobreexpresión de CODH/ACS en *C. autoethanogenum* DSM 10061 cultivado en condiciones de CO.

El efecto de la sobreexpresión de CODH/ACS contra un control de plásmido (pMTL83157) se comparó en experimentos de crecimiento por lotes con CO como única fuente de carbono y energía. En 100 % de CO, la cepa con sobreexpresión de CODH/ACS mostró una reducción en la fase de latencia del crecimiento de 4,2 días, produjo 21 % más etanol y produjo títulos de lactato 2,7 veces mayores generando al mismo tiempo cantidades similares de acetato que el control del plásmido (Figs. 5A-5E).

Ambas cepas se cultivaron de forma autótrofa en 100 % de CO y se ensayaron por triplicado en frascos de suero de 250 ml que contenían 50 ml de medio de PETC y presurizados a 206,84 kPa (30 psi) de CO. El tianfenicol se complementó hasta una concentración final de 7,5 µg/ml. Se inoculó una DO<sub>600</sub> de valor 0,5 de cultivo activo en cada frasco de suero y se recogieron muestras de fase líquida para mediciones de DO a una longitud de onda de 600 nm y análisis de metabolitos mediante HPLC.

El análisis de metabolitos se realizó utilizando el sistema de HPLC Varian ProStar equipado con un RID (detector de índice de refracción) operado a 35 °C y una columna Biorad Aminex HPX-87H (1300 x 7,8 mm, tamaño de partícula 9 µm) mantenida a 35 °C. Se utilizó agua ligeramente acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M) como fase móvil con un caudal de 0,5 ml/min. Para eliminar proteínas y otros residuos celulares, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se filtró con filtros Spartan 13/0,2 RC. Después se inyectaron 20 µl del sobrenadante en la HPLC para análisis.

Ejemplo 8 (ejemplo de referencia)

Este ejemplo describe el efecto esperado de la sobreexpresión de CODH/ACS en *C. ljungdahlii* cultivado en condiciones de CO.

El plásmido de sobreexpresión de CODH/ACS descrito anteriormente también se puede introducir en *C. ljungdahlii*. *C. ljungdahlii* se puede cultivar en 100 % de CO. En estas condiciones, la *C. ljungdahlii* que sobreexpresa CODH/ACS debería mostrar una fase de latencia del crecimiento reducida mejorando al mismo tiempo la producción de etanol y lactato en al menos 20 %.

Ejemplo 9 (ejemplo de referencia)

Este ejemplo describe el efecto esperado de la sobreexpresión de CODH/ACS en *C. autoethanogenum* cultivado en condiciones de CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>.

La cepa con sobreexpresión de CODH/ACS y la cepa de control del plásmido de *C. autoethanogenum* pueden cultivarse en medios PETC-MES con 80 % de CO<sub>2</sub> y 20 % de H<sub>2</sub> como únicas fuentes de carbono y energía. En estas condiciones, la *C. autoethanogenum* que sobreexpresa CODH/ACS debería mostrar una fase de latencia del crecimiento reducida y producción de etanol y lactato aumentada en al menos 20 %.

Ejemplo 10 (ejemplo de referencia)

Este ejemplo demuestra la inactivación de CODH/ACS en *C. autoethanogenum* DSM10061.

El CODH/ACS cadena arriba (CAETHG\_1621) de *C. autoethanogenum* DSM10061 se inactivó usando la herramienta de alteración génica mediada por intrones del grupo II de ClosTron (Heap, J Microbiol Meth, 80: 49-55, 2010). El algoritmo de Perutka alojado en el sitio web de ClosTron se usó para identificar el sitio diana del intrón del grupo II entre las bases 142/143 en la cadena con sentido de CAETHG\_1621. El mismo algoritmo se usó para diseñar la región de direccionamiento de intrones (SEQ ID NO: 17) que fue sintetizada comercialmente por DNA2.0 Inc. (CA) y administrada en el vector pTML007C-E2 (número de referencia de GenBank HQ263410.1). El vector final, pMTL007C-E2-CODH/ACS-142! 143s, contenía un marcador de *ermB* activado por retro-transposición (RAM) que confirió resistencia a la claritromicina antibiótica al insertarse en el sitio diana.

El plásmido pMTL007C-E2-CODH/ACS-142!143s se conjugó en *C. autoethanogenum* DSM10061 como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron transconjugantes de *C. autoethanogenum* utilizando 7,5 µg/ml de tianfenicol mientras que la cepa de *E. coli* CA434 se contraseleccionó utilizando 10 µg/ml de trimetoprim. Se observaron colonias después de 3 días de incubación. Primero se hicieron secuencialmente estrías de colonias individuales en medios YTF complementados con 7,5 µg/ml de tianfenicol y 10 µg/ml de trimetoprim, seguidos de medios YTF que contienen 6 µg/ml de claritromicina. Se seleccionaron aleatoriamente > 8 colonias para la inserción del grupo II por PCR (kit Maxime PCR PreMix) usando oligonucleótidos flanqueantes.

Cebador	Gen diana	Tamaño de amplicón TS (pb)	Tamaño de amplicón mutante (pb)
CODHACS-143s-F	CODH/ACS	517	2317
CODHACS-143s-R			

La amplificación de colonias resistentes a claritromicina usando oligonucleótidos flanqueantes y análisis de electroforesis en gel mostró la presencia de la banda de ClosTron mayor (> 2 kb) en lugar de la banda de tipo silvestre menor (< 520 pb), lo que indicó que el intrón del grupo II de ClosTron se había insertado con éxito en el sitio CODH/ACS especificado. Estos amplicones se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y la secuencia se validó mediante secuenciación de Sanger (Source Bioscience, Reino Unido).

Como una etapa de validación final, los clones verificados por PCR se sometieron a análisis de transferencia de Southern para confirmar la inserción única de ClosTron. Se aisló ADN genómico de los mutantes ClosTron según Bertram, Arch Microbiol, 151: 551-557, 1989 y después se digirió con la enzima de restricción *HindIII*. Las digestiones se sometieron a análisis de transferencia de Southern utilizando una sonda DIG marcada aleatoriamente (Roche). Se utilizaron oligonucleótidos EBS2 (SEQ ID NO: 27) e Intrón-Sal I-R1 (SEQ ID NO: 28) para generar la sonda, utilizando el plásmido pMTL007C-E2 como un molde. La sonda resultante se hibridó con el intrón del grupo II. El análisis de transferencia de Southern detectó una única banda por clon mutante, lo que indica un único acontecimiento de inserción del intrón del grupo II en el genoma de *C. autoethanogenum* DSM10061. El mutante validado se denominó CODH/ACS::CTermB-143s (o "mutante de desactivación de CODH/ACS"). Para ensayo de complementación, el plásmido de sobreexpresión pMTL83157-CODH/ACS se conjugó en el mutante de desactivación de CODH/ACS.

En consecuencia, es necesario CODH/ACS para el crecimiento autótrofo (CO o H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>) de *C. autoethanogenum*.

*Ejemplo 11* (ejemplo de referencia)

5 Este ejemplo demuestra el efecto de la inactivación de CODH/ACS en *C. autoethanogenum* DSM10061 cultivado en fructosa.

10 Mientras que *C. autoethanogenum* no puede crecer en CO (Fig. 6A) o CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Fig. 6B) después de la inactivación de la enzima CODH/ACS, la cepa todavía es capaz de crecer en azúcares, tales como fructosa. Sorprendentemente, se descubrió que, en estas condiciones, la cepa con inactivación de CODH/ACS deja de producir acetato. Esto es especialmente sorprendente ya que la formación de acetato es normalmente una característica distintiva de los acetógenos. Durante el crecimiento heterótrofo, los acetógenos normalmente fijan CO<sub>2</sub> (producido durante el metabolismo del azúcar) en presencia de H<sub>2</sub> en biomasa y productos a través de las acciones de CODH/ACS y otros genes de la ruta de Wood-Ljungdahl, también conocida como la ruta reductora de acetil-CoA.

15 El mutante de inactivación de CODH/ACS, la cepa complementada y *C. autoethanogenum* DSM10061 TS se cultivaron por triplicado en frascos de suero de 250 ml que contenían 50 ml de medio PETC complementado con 10 g/l de fructosa (concentración final) en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se inoculó un equivalente de DO<sub>600</sub> 0,5 de cultivo activo en cada frasco de suero y se recogieron muestras de fase líquida para mediciones de DO a una longitud de onda de 20 600 nm y análisis de metabolitos mediante HPLC.

25 La inactivación de CODH/ACS redujo significativamente la DO<sub>600</sub> máxima en 61 % desde el nivel de TS de 4,53 a 1.77 (Fig. 7A). Esto también fue acompañado de un aumento en la fase de latencia del crecimiento en el mutante de desactivación de CODH/ACS (Fig. 7A). La complementación de la actividad de CODH/ACS por la expresión del plásmido de pMTL83157-CODH/ACS en mutante de desactivación aumentó la DO<sub>600</sub> máxima a 3.11 y también acortó la fase de latencia del crecimiento más cerca del nivel de TS (Fig. 7A).

30 Una característica sorprendente del mutante de desactivación de CODH/ACS es la falta de producción de acetato, ya que solo se detectó momentáneamente acetato 2,61 mM el día 2,8 (Fig. 7B). Por el contrario, el TS produjo acetato hasta 85,96 mM el día 3,0 (Fig. 7B).

35 Sin producción significativa de acetato, la mayor parte del carbono de la fructosa se desvió hacia productos reducidos de etanol y 2,3-butanodiol en el mutante de desactivación de CODH/ACS. La inactivación de CODH/ACS aumentó los niveles máximos de etanol en 113 % desde el nivel de TS de 48,3 mM hasta 102,7 mM (Fig. 7C). Asimismo, el nivel máximo de 2,3-butanodiol del mutante de desactivación de CODH/ACS también fue 138 % mayor que el TS (10,95 mM frente a 4,61 mM) (Fig. 7D). La expresión del plásmido de complementación pMTL83157-CODH/ACS en el mutante de desactivación de CODH/ACS restauró con éxito los niveles de acetato, etanol y 2,3-butanodiol más cercanos a los niveles de TS (Fig. 7B-7D), lo que confirma el papel de CODH/ACS en *C. autoethanogenum* durante el crecimiento heterótrofo.

40 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, parece que la inactivación de CODH/ACS evita que la ruta de Wood-Ljungdahl actúe como sumidero para reducir los equivalentes generados durante la glucólisis, de modo que los equivalentes reductores excesivos generen fuerza motriz para la producción de etanol y 2,3-butanodiol (Fig. 8).

#### 45 DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos a las que se hace referencia en el presente documento se resumen brevemente a continuación.

SEQ ID NO:	Tipo de secuencia	Descripción	Especie
1	aminoácido	CODH1	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
2	ácido nucleico	CODH1	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
3	aminoácido	CODH2	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
4	ácido nucleico	CODH2	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
5	aminoácido	CODH1	<i>Clostridium ragsdalei</i>
6	ácido nucleico	CODH1	<i>Clostridium ragsdalei</i>
7	aminoácido	CODH2	<i>Clostridium ragsdalei</i>

50

(continuación)

SEQ ID NO:	Tipo de secuencia	Descripción	Especie
8	ácido nucleico	CODH2	<i>Clostridium ragsdalei</i>
9	aminoácido	CODH2	<i>Clostridium scatologenes</i>
10	ácido nucleico	CODH2	<i>Clostridium scatologenes</i>
11	aminoácido	AcsA1	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
12	ácido nucleico	AcsA1	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
13	aminoácido	AcsA2	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
14	ácido nucleico	AcsA2	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
15	ácido nucleico	Región de direccionamiento de intrones para <i>Clostridium autoethanogenum</i> CODH1	Sintético
16	ácido nucleico	Región de direccionamiento de intrones para <i>Clostridium autoethanogenum</i> CODH2	Sintético
17	ácido nucleico	Región de direccionamiento de intrones para <i>Clostridium autoethanogenum</i> CODH/ACS	Sintético
18	ácido nucleico	Región promotora del grupo de Wood-Ljungdahl	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
19	ácido nucleico	pyrE	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
20	ácido nucleico	pMTL83157-CODH/ACS	Sintético
21	ácido nucleico	CODH1-601s-F	Sintético
22	ácido nucleico	CODH1-601s-R	Sintético
23	ácido nucleico	CODH2-529s-F	Sintético
24	ácido nucleico	CODH2-529s-R	Sintético
25	ácido nucleico	Univ-0027-F	Sintético
26	ácido nucleico	Univ-1492-R	Sintético
27	ácido nucleico	EBS2	Sintético
28	ácido nucleico	Intrón-Sall-R1	Sintético
29	ácido nucleico	P <sub>WL</sub> -NotI-F	Sintético
30	ácido nucleico	P <sub>WL</sub> -NdeI-R	Sintético
31	ácido nucleico	CODH/ACS-NdeI-F	Sintético
32	ácido nucleico	CODH/ACS-SacI-R	Sintético
33	ácido nucleico	CODH/ACS-SOE-B	Sintético
34	ácido nucleico	CODH/ACS-SOE-C	Sintético
35	ácido nucleico	CODHACS-143s-F	Sintético
36	ácido nucleico	CODHACS-143s-R	Sintético

Se ha de interpretar que los términos "un", "uno/una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" se deben interpretar como expresiones abiertas (es decir, que significan "incluyendo, pero sin limitación") a menos que se indique otra cosa. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento está destinada meramente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento y cada valor por separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citase de manera individual en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, está destinado meramente a iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique otra cosa. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debería interpretarse como indicativo de que cualquier elemento no

reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

Se describen en el presente documento realizaciones preferidas de esta invención.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LanzaTech New Zealand Limited

10 <120> BACTERIA MODIFICADA POR INGENIERÍA GENÉTICA CON ACTIVIDAD DE MONÓXIDO DE CARBONO DESHIDROGENASA (CODH) ALTERADA

<130> LT105WO1

15 <150> 62/036.101

<151> 11/08/2014

<150> 62/036.104

<151> 11/08/2014

20 <150> 62/036.107

<151> 11/08/2014

<160> 36

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 626

<212> PRT

30 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 1



ES 2 728 726 T3

Leu Tyr Lys Pro Lys Phe Glu Lys Met Glu Val Ile Asn Lys Leu Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ala Pro Arg Leu Glu Asn Trp Asn Lys Leu Asn Ile Met Pro Gly  
 165 170 175

Gly Ala Lys Ser Glu Val Phe Asp Gly Val Val Lys Thr Ser Thr Asn  
 180 185 190

Leu Asn Ser Asp Pro Val Asp Met Leu Leu Asn Cys Leu Lys Leu Gly  
 195 200 205

Ile Ser Thr Gly Ile Tyr Gly Leu Thr Leu Thr Asn Leu Leu Asn Asp  
 210 215 220

Ile Val Leu Gly Glu Pro Ala Ile Arg Pro Ala Lys Val Gly Phe Lys  
 225 230 235 240

Val Val Asp Thr Asp Tyr Ile Asn Leu Met Ile Thr Gly His Gln His  
 245 250 255

Ser Met Ile Ala His Leu Gln Glu Glu Leu Val Lys Pro Glu Ala Val  
 260 265 270

Lys Lys Ala Gln Ala Val Gly Ala Lys Gly Phe Lys Leu Val Gly Cys  
 275 280 285

Thr Cys Val Gly Gln Asp Leu Gln Leu Arg Gly Lys Tyr Tyr Thr Asp  
 290 295 300

Val Phe Ser Gly His Ala Gly Asn Asn Phe Thr Ser Glu Ala Leu Ile  
 305 310 315 320

Ala Thr Gly Gly Ile Asp Ala Ile Val Ser Glu Phe Asn Cys Thr Leu  
 325 330 335

Pro Gly Ile Glu Pro Ile Ala Asp Lys Phe Met Val Lys Met Ile Cys  
 340 345 350

Leu Asp Asp Val Ser Lys Lys Ser Asn Ala Glu Tyr Val Glu Tyr Ser  
 355 360 365

Phe Lys Asp Arg Glu Lys Ile Ser Asn His Val Ile Asp Thr Ala Ile  
 370 375 380

Glu Ser Tyr Lys Asn Arg Arg Ser Lys Val Thr Met Asn Ile Pro Lys



ES 2 728 726 T3

<213> Clostridium autoethanogenum

<400>2

atgtcaaata	acaaaatttg	taaatcagca	gataaggtac	ttgaaaagtt	tataggttct	60
ctagatggtg	tagaaacttc	tcatcatagg	gtagaaagcc	aaagtgttaa	atgtggtttt	120
ggtcagctag	gagtctgctg	tagactctgt	gcaaacggtc	cctgtaggat	aacacctaaa	180
gctccaagag	gagtatgtgg	tgctagtgtc	gataccatgg	ttgcaagaaa	ctttcttaga	240
gctgtagctg	ccggcagtg	atgttatatt	catatagtcg	aaaatacagc	tagaaacgta	300
aatccatag	gtgaaaccgg	cggcgagata	aaaggaatga	atgctctcaa	tacactggca	360
gaaaaattag	gtataacaga	atctgaccca	cataaaaaag	ctgtactagt	agctgatgcc	420
gtattaaagg	acttatacaa	accaaaattt	gaaaaaatgg	aagttataaa	taaattagct	480
tatgcaccta	gactagaaaa	ttggaacaaa	ttaaatataa	tgcttgccgg	tgcaaaatca	540
gaagtttttg	atggtgtagt	aaaaacttct	acaaatctaa	acagtgaccc	tgtagatatg	600
cttctaaatt	gtttaaaact	tggaatatcc	actggaattt	atggacttac	ccttacaat	660
ttattaaatg	acatagtttt	aggtgaacct	gctataagac	ctgcaaaagt	tggttttaaa	720
gttgtagata	cggattatat	aaatttgatg	ataacaggcc	accagcactc	catgattgcc	780
catcttcaag	aagaacttgt	aaaacctgaa	gctgtaaaaa	aggcccaagc	agttggtgct	840
aaaggattca	aactagttgg	atgtacctgt	gtaggacagg	atttacagtt	aagaggtaaa	900
tactatactg	atgttttctc	cggccatgca	ggaaataatt	ttacaagtga	agccttaata	960
gcaactggag	gtatagatgc	aatagtatct	gaattcaact	gtactcttcc	tggtatcgag	1020
ccaatagctg	ataagttcat	ggttaaaatg	atatgcctag	atgacgtttc	taaaaaatca	1080
aatgcagaat	atgtagaata	ttcctttaaa	gatagagaaa	aaataagcaa	ccatgttata	1140
gatacagcta	ttgaaagcta	taagaacaga	agatctaaag	ttacaatgaa	tattcctaaa	1200
aacctggct	ttgatgacgt	cataacaggt	gtaagtgaag	gttccttaaa	atctttctta	1260
ggtggcagct	ggaaacctct	agtagactta	attgctgctg	gaaaaattaa	aggtgttgct	1320
ggaatagtag	gttgttcaaa	cttaactgcc	aaaggtcatg	atgtatttac	agtagaactt	1380
acaaaagaac	ttataaagag	aaatataatt	gtgctttctg	caggttgttc	aagtgggtgga	1440
cttgaaaatg	taggacttat	gtctccagga	gctgctgaac	ttgcaggaga	tagcttaaaa	1500
gaagtatgta	agagcctagg	aataccacct	gtactaaatt	ttggtccatg	tcttgctatt	1560
ggaagattgg	aaattgtagc	aaaagaacta	gcagaatatc	taaaaataga	tattccacag	1620
cttccacttg	tactttctgc	acctcaatgg	cttgaagaac	aagcattagc	agatggaagt	1680
tttggctctg	cccttgatt	accacttcac	cttgctatat	ctccttttat	tggtggaagt	1740

ES 2 728 726 T3

aaagtggtaa caaaagtttt atgtgaagac atggaaaatc taacaggcgg caagcttata 1800  
 atagaagacg atataataaa agctgcagat aaattagaag aaaccatact tgcaagaag 1860  
 aaaagcttag gtcttaatta a 1881

<210>3  
 <211> 643  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium autoethanogenum

5

<400> 3

Met	Ser	Gln	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Asn	Glu	Thr	Ile	Arg	Glu	Arg	Thr
1				5					10					15	
Glu	Gly	Arg	Val	Ser	Tyr	His	Asp	Ser	Val	Glu	Glu	Met	Leu	Lys	Arg
			20					25					30		
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Met	Ser	Asn	Val	Phe	Asp	Arg	Trp	Ser	Ser	Gln
		35					40					45			
Glu	Lys	Ile	Arg	Cys	Lys	Phe	Cys	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Cys	Gln	Leu
	50					55					60				
Cys	Ser	Gln	Gly	Pro	Cys	Arg	Ile	Asn	Leu	Lys	Gly	Glu	Gln	Lys	Lys
65					70					75					80
Gly	Val	Cys	Gly	Ile	Gly	Pro	Asp	Ala	Met	Ala	Met	Arg	Asn	Met	Leu
				85					90					95	
Leu	Lys	Asn	Ile	Met	Gly	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	His	His	Ala	Tyr	Glu
			100					105					110		
Ala	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Gly	Glu	Gly	Lys	Thr	Pro	Phe	Thr
		115					120					125			
Ile	Lys	Asp	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	Trp	Met	Cys	Gln	Lys	Val	Gly	Ile
	130					135					140				
Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Thr	Asn	Lys	Met	Ala	Val	Asp	Leu	Ala	Asn	Phe
145					150					155					160
Leu	Glu	Ala	Glu	Met	Gly	Lys	Asp	Val	Glu	Glu	Pro	Ser	Val	Met	Val
				165					170					175	
Asp	Val	Phe	Ser	Pro	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Gly
			180					185					190		

10

ES 2 728 726 T3

Ile Tyr Pro Ser Gly Val Val His Glu Glu Gln Asn Ala Val Ala Ser  
 195 200 205

Cys Leu Thr Asn Val Asp Gly Asp Tyr Val Ser Leu Ala Lys Lys Ala  
 210 215 220

Leu Arg Leu Gly Leu Ser Thr Ile Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Leu Glu  
 225 230 235 240

Met Val Gln Asp Ile Leu Phe Gly Thr Pro Thr Pro His Glu Val Asn  
 245 250 255

Val Asp Leu Gly Ile Met Asp Pro Glu Tyr Ile Asn Ile Val Phe Asn  
 260 265 270

Gly His Gln Pro Trp Ala Gly Val Ala Thr Ile Gln Lys Ala Lys Met  
 275 280 285

Gln Gln Ile Gln Glu Arg Ala Lys Ala Val Gly Ala Lys Gly Leu Arg  
 290 295 300

Ile Val Gly Ser Ile Glu Thr Gly Gln Glu Leu Leu Gln Arg Phe Glu  
 305 310 315 320

Val Asp Asp Val Phe Val Gly Leu Met Gly Asp Trp Leu Ser Ile Glu  
 325 330 335

Pro Leu Leu Ala Thr Gly Thr Val Asp Val Leu Ala Met Glu Glu Asn  
 340 345 350

Cys Ser Pro Pro Ala Ile Asp His Tyr Ala Glu Lys Tyr Gln Val Thr  
 355 360 365

Leu Val Gly Val Ser Thr Ile Ile Gly Ile Pro Gly Leu Asn His Met  
 370 375 380

Ile Pro Tyr Asn Pro Glu Lys Val Gly Glu Met Ala Asp Lys Leu Ile  
 385 390 395 400

Asp Leu Ala Ile Glu Asn Phe Lys Lys Arg Lys Asp Asn Ile Thr Pro  
 405 410 415

Lys Val Pro Lys Ile Thr Gln Lys Ala Ile Ala Gly Phe Ser Thr Glu  
 420 425 430

Ala Val Leu Lys Ala Leu Gly Asn Lys Leu Asp Pro Leu Val Asp Val  
 435 440 445

ES 2 728 726 T3

Ile Lys Ala Gly Lys Ile Lys Gly Ile Val Ala Leu Ala Asn Cys Ser  
 450 455 460

Thr Leu Arg Asn Gly Pro Gln Asp Trp Asn Thr Val Asn Leu Val Lys  
 465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Lys Asp Ile Leu Val Val Ala Gly Gly Cys Gly Asn  
 485 490 495

His Ala Leu Glu Val Ala Gly Leu Cys Asn Leu Asp Ala Ile Asn Met  
 500 505 510

Ala Gly Gln Gly Leu Glu Glu Val Cys Asn Met Leu Lys Ile Pro Pro  
 515 520 525

Val Leu Ser Phe Gly Thr Cys Thr Asp Thr Gly Arg Ile Ser Met Leu  
 530 535 540

Val Thr Glu Leu Ala Asn His Leu Asp Val Asp Ile Pro Asp Leu Pro  
 545 550 555 560

Ile Ala Val Thr Ala Pro Glu Trp Met Glu Gln Lys Ala Thr Ile Asp  
 565 570 575

Gly Leu Phe Ala Val Ala Tyr Gly Ala Tyr Thr His Leu Ser Pro Thr  
 580 585 590

Pro Phe Leu Thr Gly Ala Glu Gln Leu Val Lys Leu Leu Thr Glu Asp  
 595 600 605

Val Glu Asn Leu Thr Gly Gly Lys Val Ala Leu Gly Asp Asn Pro Lys  
 610 615 620

Glu Ala Ala Asp Asn Ile Glu Ala His Ile Leu Ser Lys Arg Glu Gly  
 625 630 635 640

Leu Gly Leu

<210>4  
 <211> 1932  
 5 <212> ADN  
 <213> Clostridium autoethanogenum  
 <400> 4

atgagtcaaa ctacactaga aaaaaatgaa actatacgag aaagaacaga agggcgagtt 60  
 agctatcacg attctgtaga ggaaatgctt aaaagaatca gagaagatgg tatgtcaaat 120

ES 2 728 726 T3

gtatttgaca gatggtcctc tcaagaaaaa attagatgta agttttgcct agaaggattg 180  
 agctgtcaat tgtgttctca aggccctgc agaattaatc ttaaaggaga acagaaaaaa 240  
 ggtgtttgtg gaattggccc agatgctatg gcaatgcgaa atatgttact taaaaacata 300  
 atgggagctg gtacatatag ccatcatgca tatgaagcct ttagaacatt aagagaaact 360  
 ggggaaggca agactccatt tacaattaa gacttggata aactcaaatg gatgtgccag 420  
 aaagttgaa ttgatacaag tggagatact aataaaatgg cagtggatct ggcaaacttt 480  
 ttggaagctg aaatgggtaa agatgtagag gaaccagtg ttatggtaga tgtgttttca 540  
 ccaaggaaga gaaaaaaagt ttggaaagat cttggaattt atccttcagg agtagttcac 600  
 gaagagcaaa atgcagtagc aagttgctta acaaatgttg atggagatta tgtatcatta 660  
 gctaaaaaag cgctgcggtt aggcctatca actatttata cagcacaat aggacttgaa 720  
 atggtacagg atatactttt tggcacgcct acaccccatg aggtaaagt ggacttagga 780  
 attatggatc cagagtatat aaatattgta tttaatggac atcaacctg ggctgggtgtt 840  
 gctaccattc aaaaggcaaa gatgcagcag atacaggaaa gagcaaaggc agttggtgca 900  
 aaagggctta gaatagttgg gtcaattgaa acagggcagg agctattaca aagatttgaa 960  
 gtagatgatg tattttagg tttaatggga gattggctat ctatagaacc acttcttgct 1020  
 acaggtacag ttgatgttct tgcaatggaa gaaactgtt ctccacctgc aatagatcat 1080  
 tatgctgaaa agtatcaggt aactttagta ggggtaagta ctattatagg tattccggga 1140  
 ttaaatacata tgattccata taatcctgaa aaagtgggtg aaatggctga caaattgatt 1200  
 gatttggcca ttgaaaattt taaaagaga aaggataaca ttacaccaa ggcttctaaa 1260  
 ataacacaga aagcaatagc aggtttttct actgaagcag ttttaaagc tttaggaaat 1320  
 aagcttgatc cacttgttga tgttattaag gcaggaaaga ttaaaggaat tgtggctttg 1380  
 gcaaattgtt caactctaag aaatggtcct caagattgga atacagtaa tctggtaaag 1440  
 gaattgatta aaaaggatat tttagttgtg gctgggtgggt gcggcaatca tgctcttgaa 1500  
 gtagcagggc tgtgcaacct agatgcaata aacatggctg gccaaggatt agaagaagta 1560  
 tgcaatatgc taaagattcc tccagttcta agctttggaa cttgtacaga tacgggaaga 1620  
 atatccatgc ttgttacaga acttgctaact caccttgatg tagatatacc agatcttct 1680  
 attgcagtaa cggccccga gtggatggaa caaaaagcta ctatagatgg tttatttgca 1740  
 gtagcctatg gggcatatac acatttatct ccgacccat ttctaacagg tgcagaacag 1800  
 cttgtaaagc ttcttactga ggatgtagag aatttaacag gaggtaaagt tgcattagga 1860  
 gacaatcca aagaggcagc tgataatatt gaagcacata tattaagtaa aagagaggggt 1920  
 ttggggttat aa 1932

<210>5  
 <211> 633  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium ragsdalei

ES 2 728 726 T3

<400>5

Met Ser Asn Asn Lys Ile Cys Lys Ser Ala Asp Lys Val Leu Glu Lys  
 1 5 10 15

Phe Ile Gly Ser Leu Asp Gly Val Glu Thr Ser His His Arg Val Glu  
 20 25 30

Ser Gln Ser Val Lys Cys Gly Phe Gly Gln Leu Gly Val Cys Cys Arg  
 35 40 45

Leu Cys Ala Asn Gly Pro Cys Arg Ile Thr Pro Lys Ala Pro Arg Gly  
 50 55 60

Val Cys Gly Ala Ser Ala Asp Thr Met Val Ala Arg Asn Phe Leu Arg  
 65 70 75 80

Ala Val Ala Ala Gly Ser Gly Cys Tyr Ile His Ile Val Glu Asn Thr  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Lys Ser Val Gly Glu Thr Gly Gly Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Met Asn Ala Leu Asn Thr Leu Ala Glu Lys Leu Gly Ile Thr Glu Ser  
 115 120 125

Asp Pro His Lys Lys Ala Val Leu Val Ala Asp Ala Val Leu Lys Asp  
 130 135 140

Leu Tyr Lys Pro Lys Phe Glu Lys Met Glu Val Ile Asn Lys Leu Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ala Pro Arg Leu Glu Asn Trp Asn Lys Leu Asn Ile Met Pro Gly  
 165 170 175

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

Val Val Lys Thr Ser Thr Asn Leu Asn Ser Asp Pro Val Asp Met Leu  
 195 200 205

Leu Asn Cys Leu Lys Leu Gly Ile Ser Thr Gly Ile Tyr Gly Leu Thr  
 210 215 220

ES 2 728 726 T3

Leu Thr Asn Leu Leu Asn Asp Ile Ile Leu Gly Glu Pro Ala Ile Arg  
 225 230 235 240

Pro Ala Lys Val Gly Phe Lys Val Val Asp Thr Asp Tyr Ile Asn Leu  
 245 250 255

Met Ile Thr Gly His Gln His Ser Met Ile Ala His Leu Gln Glu Glu  
 260 265 270

Leu Val Lys Pro Glu Ala Val Lys Lys Ala Gln Ala Val Gly Ala Lys  
 275 280 285

Gly Phe Lys Leu Val Gly Cys Thr Cys Val Gly Gln Asp Leu Gln Leu  
 290 295 300

Arg Gly Lys Tyr Tyr Thr Asp Val Phe Ser Gly His Ala Gly Asn Asn  
 305 310 315 320

Phe Thr Ser Glu Ala Leu Ile Ala Thr Gly Gly Ile Asp Ala Ile Val  
 325 330 335

Ser Glu Phe Asn Cys Thr Leu Pro Gly Ile Glu Pro Ile Ala Asp Lys  
 340 345 350

Phe Met Val Lys Met Ile Cys Leu Asp Asp Val Ser Lys Lys Ser Asn  
 355 360 365

Ala Glu Tyr Val Glu Tyr Ser Phe Lys Asp Arg Glu Lys Ile Ser Asn  
 370 375 380

His Val Ile Asp Thr Ala Ile Glu Ser Tyr Lys Glu Arg Arg Ser Lys  
 385 390 395 400

Val Thr Met Asn Ile Pro Lys Asn His Gly Phe Asp Asp Val Ile Thr  
 405 410 415

Gly Val Ser Glu Gly Ser Leu Lys Ser Phe Leu Gly Gly Ser Trp Lys  
 420 425 430

Pro Leu Val Asp Leu Ile Ala Ala Gly Lys Ile Lys Gly Val Ala Gly  
 435 440 445

Ile Val Gly Cys Ser Asn Leu Thr Ala Lys Gly His Asp Val Phe Thr  
 450 455 460

Val Glu Leu Thr Lys Glu Leu Ile Lys Arg Asn Ile Ile Val Leu Ser  
 465 470 475 480

ES 2 728 726 T3

Ala Gly Cys Ser Ser Gly Gly Leu Glu Asn Val Gly Leu Met Ser Pro  
 485 490 495

Gly Ala Ala Glu Leu Ala Gly Asp Ser Leu Lys Glu Val Cys Lys Ser  
 500 505 510

Leu Gly Ile Pro Pro Val Leu Asn Phe Gly Pro Cys Leu Ala Ile Gly  
 515 520 525

Arg Leu Glu Ile Val Ala Lys Glu Leu Ala Glu Tyr Leu Lys Ile Asp  
 530 535 540

Ile Pro Gln Leu Pro Leu Val Leu Ser Ala Pro Gln Trp Leu Glu Glu  
 545 550 555 560

Gln Ala Leu Ala Asp Gly Ser Phe Gly Leu Ala Leu Gly Leu Pro Leu  
 565 570 575

His Leu Ala Ile Ser Pro Phe Ile Gly Gly Ser Lys Val Val Thr Lys  
 580 585 590

Val Leu Cys Glu Asp Met Glu Asn Leu Thr Gly Gly Lys Leu Ile Ile  
 595 600 605

Glu Asp Asp Val Ile Lys Ala Ala Asp Lys Leu Glu Glu Thr Ile Leu  
 610 615 620

Ala Arg Arg Lys Ser Leu Gly Leu Asn  
 625 630

<210>6  
 <211> 1882  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium ragsdalei

<400>6

atgtcaaata acaaaatttg taagtcagca gataaggtac ttgaaaagtt tataggttct 60  
 ctagatgggtg tagaaacttc tcatcatagg gtagaaagcc aaagtgttaa atgtggtttt 120  
 ggtcagctag gagtctgctg tagactctgt gcaaacggtc cctgcagaat aacacctaaa 180  
 gctccaagag gagtatgtgg tgctagtgtc gataccatgg ttgcaagaaa ctttcttaga 240  
 gctgtagctg ccggcagtggt atgttatatc catatagtcg aaaatacagc tagaaacgta 300  
 aatcagtag gtgaaaccgg cggagagata aaaggaatga atgctctcaa caccctagca 360  
 gaaaaacttg gtataacaga atctgaccca cataaaaaag ctgtactagt agctgatgcc 420  
 gtattaaagg acttatacaa accaaaattc gaaaaaatgg aagttataaa taaattagct 480

5

10

ES 2 728 726 T3

tatgcaccta gactagaaaa ttggaacaaa ttaaataataa tgcctggcgg tgcaaaatca 540  
 gaagtTTTT gatggtgtag taaaaacttc taaaaatcta aacagcgacc ctgtagatat 600  
 gcttctaaat tgTTTTaaac ttggaatadc cactgggatt tacggactta cccttacaaa 660  
 tttattaaat gacataattt taggtgaacc tgctataaga cctgcaaaag ttggtTTTTaa 720  
 agttgtagat acggattata taaatttgat gataacaggc caccagcact ccatgattgc 780  
 ccaccttcaa gaagaacttg taaaacctga agctgtaaaa aaagccaag cagttggtgc 840  
 taaaggattc aaactagttg gatgtacctg tgtcggacag gatttacagt taagaggtaa 900  
 atactatact gatgTTTTct ccggtcatgc aggaaataac tttacaagtg aagccttaat 960  
 agcaactgga ggtatagatg caatagatc tgaatttaac tgtactcttc ctggcatcga 1020  
 gccaatagct gataagttca tggTTaaat gatatgccta gatgacgttt ctaaaaaatc 1080  
 aatgcagaa tatgtagaat actctTTTTaa agatagagaa aaaataagca accatgttat 1140  
 agatacggct attgaaagtt ataaggaaag aagatctaaa gttacaatga atattcctaa 1200  
 aaacccatggc tttgatgacg tcataacagg tgtaagtga ggttccttaa aatccttctt 1260  
 aggcggaagt tggaaacctc ttgtagactt aattgctgct ggaaaaatta aaggtggtgc 1320  
 tggaaatagta ggttgTTcaa acttaactgc caaaggtcac gatgtattta cagtagaact 1380  
 tacaaaagaa ctcataaaga gaaatataat tgtactttct gcaggttggt caagtgggtgg 1440  
 acttgaaaat gtaggactta tgtctccagg agctgctgaa cttgcaggag atagcttaaa 1500  
 agaagtatgt aagagcctag gtataccacc tgtactaaat tttggtccat gtcttgctat 1560  
 tggaaagattg gaaattgtag caaaagaact agcagaatac ctaaaaatag atattccaca 1620  
 gcttccactt gtgctttctg cacctcaatg gcttgaagaa caagcattgg cagatggaag 1680  
 ttttggtctt gcccttggtat taccacttca ccttgctata tctccttca ttggtggaag 1740  
 caaagtggta acaaaagttt tatgtgaaga tatggaaaat ctaacaggcg gcaagcttat 1800  
 aatagaagac gatgtaataa aagctgcaga taaattagaa gaaaccatac ttgcaagaag 1860  
 gaaaagctta ggtcttaatt aa 1882

<210>7  
 <211> 643  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 7

Met Ser Gln Thr Thr Leu Glu Lys Asn Glu Thr Ile Arg Glu Arg Thr  
 1 5 10 15

Glu Gly Arg Val Ser Tyr His Asp Ser Val Glu Glu Met Leu Lys Arg  
 20 25 30

5

10

ES 2 728 726 T3

Ile Arg Glu Asp Gly Met Ser Asn Val Phe Asp Arg Trp Ser Ser Gln  
35 40 45

Glu Lys Ile Arg Cys Lys Phe Cys Leu Glu Gly Leu Ser Cys Gln Leu  
50 55 60

Cys Ser Gln Gly Pro Cys Arg Ile Asn Leu Lys Gly Glu Gln Lys Lys  
65 70 75 80

Gly Val Cys Gly Ile Gly Pro Asp Ala Met Ala Met Arg Asn Met Leu  
85 90 95

Leu Lys Asn Ile Met Gly Ala Gly Thr Tyr Ser His His Ala Tyr Glu  
100 105 110

Ala Phe Arg Thr Leu Arg Glu Thr Gly Glu Gly Lys Thr Pro Phe Thr  
115 120 125

Ile Lys Asp Val Asp Lys Leu Lys Trp Met Cys Gln Lys Val Gly Ile  
130 135 140

Asn Thr Ser Gly Asp Thr Asn Lys Met Ala Val Asn Leu Ala Asn Phe  
145 150 155 160

Leu Glu Ala Glu Met Gly Lys Asp Val Glu Glu Pro Ser Val Met Val  
165 170 175

Asp Val Phe Ser Pro Arg Lys Arg Lys Lys Val Trp Lys Asp Leu Gly  
180 185 190

Ile Tyr Pro Ser Gly Val Val His Glu Glu Gln Asn Ala Val Ala Ser  
195 200 205

Cys Leu Thr Asn Val Asp Gly Asp Tyr Val Ser Leu Ala Lys Lys Ala  
210 215 220

Leu Arg Leu Gly Leu Ser Thr Ile Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Leu Glu  
225 230 235 240

Met Ala Gln Asp Ile Leu Phe Gly Thr Pro Thr Pro His Glu Val Asn  
245 250 255

Val Asp Leu Gly Ile Met Asp Pro Glu Tyr Ile Asn Ile Val Phe Asn  
260 265 270

Gly His Gln Pro Trp Ala Gly Val Ala Thr Ile Gln Lys Ala Lys Met  
275 280 285

ES 2 728 726 T3

Gln Gln Ile Gln Glu Arg Ala Lys Ala Ala Gly Ala Lys Gly Leu Arg  
 290 295 300

Ile Val Gly Ser Ile Glu Thr Gly Gln Glu Leu Leu Gln Arg Phe Glu  
 305 310 315 320

Val Asp Asp Val Phe Val Gly Leu Met Gly Asp Trp Leu Ser Ile Glu  
 325 330 335

Pro Leu Leu Ala Thr Gly Thr Val Asp Val Leu Ala Met Glu Glu Asn  
 340 345 350

Cys Ser Pro Pro Ala Ile Asp His Tyr Ala Glu Lys Tyr Gln Val Thr  
 355 360 365

Leu Val Gly Val Ser Thr Ile Ile Gly Ile Pro Gly Leu Asn His Met  
 370 375 380

Ile Pro Tyr Asn Pro Glu Lys Val Gly Glu Met Ala Asp Lys Leu Ile  
 385 390 395 400

Asp Leu Ala Ile Glu Asn Phe Lys Lys Arg Lys Asp Asn Ile Thr Pro  
 405 410 415

Lys Val Pro Lys Ile Thr Gln Lys Ala Ile Ala Gly Phe Ser Thr Glu  
 420 425 430

Ala Val Leu Lys Ala Leu Gly Asn Lys Leu Asp Pro Leu Val Asp Val  
 435 440 445

Ile Lys Ala Gly Lys Ile Lys Gly Ile Val Ala Leu Ala Asn Cys Ser  
 450 455 460

Thr Leu Arg Asn Gly Pro Gln Asp Trp Asn Thr Val Asn Leu Val Lys  
 465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Lys Asp Ile Leu Val Val Ala Gly Gly Cys Gly Asn  
 485 490 495

His Ala Leu Glu Val Ala Gly Leu Cys Asn Leu Asp Ala Ile Asn Met  
 500 505 510

Ala Gly Gln Gly Leu Lys Glu Val Cys Asn Met Leu Lys Ile Pro Pro  
 515 520 525

Val Leu Ser Phe Gly Thr Cys Thr Asp Thr Gly Arg Ile Ser Met Leu

ES 2 728 726 T3

530	535	540																				
Val	Thr	Glu	Leu	Ala	Asn	Tyr	Leu	Asp	Val	Asp	Ile	Pro	Asp	Leu	Pro							
545					550					555				560								
	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Pro	Glu	Trp	Met	Glu	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Asp						
				565						570					575							
	Gly	Leu	Phe	Ala	Val	Ala	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Thr	His	Leu	Ser	Pro	Thr						
			580						585					590								
	Pro	Phe	Leu	Thr	Gly	Ala	Glu	Gln	Leu	Val	Lys	Leu	Leu	Thr	Glu	Asp						
			595					600					605									
	Val	Glu	Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Asp	Asn	Pro	Lys						
	610						615					620										
	Glu	Ala	Ala	Asp	Asn	Ile	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Ser	Lys	Arg	Lys	Gly						
	625					630					635					640						
	Leu	Glu	Leu																			

<210>8  
 <211> 1932  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium ragsdalei

5

<400>8

atgagtcaaa ctacactaga aaaaaatgaa actatacagag aaagaacaga agggagagtt	60
agttatcacg attctgtgga agaaatgctt aaaagaatca gggaagatgg tatgtcaaac	120
gtatttgaca gatggcctc tcaagaaaaa attagatgta agttttgcct agaaggatta	180
agctgtcaat tgtgttctca aggtccctgc agaattaatc ttaaaggaga acagaaaaaa	240
gggtgttggtg gtattggccc agatgccatg gcaatgogaa atatgttact taaaaacata	300
atgggagctg gtacatatag ccatcacgca tatgaagcct ttagaacatt aagagaaact	360
ggagaaggca agactccatt tacaattaa gatgtggata aactcaaag gatgtgccag	420
aaagtcggaa ttaatacaag cggagatacc aataaaatgg cagtgaatct ggcaaatttt	480
ttggaagctg agatgggtaa agatgtagaa gaacctagtg ttatggtaga tgtgttttca	540
ccaagaaaga gaaaaaagt ttggaaagat cttggaattt atccttcagg agtagttcac	600
gaagagcaaa atgcagtagc aagttgttta acaaagtgtg atggggatta tgtatcatta	660
gctaaaaaag cgctgcggt aggtctgtca actatctata cagcacaat aggacttgaa	720
atggctcagg atatactttt tggcacgcct acaccccatg aggtaaagt ggacttagga	780

10

ES 2 728 726 T3

```

attatggatc cagagtatat aaatattgta tttaatggac atcaaccttg ggctggtggt      840
gctactattc aaaaggcaaa gatgcagcag atacaggaaa gagcaaaggc agctggtgca      900
aaagggctta gaatagttgg gtcaattgaa acaggacagg aattattaca aagatttgag      960
gtagatgatg tattttaggg tttaatggga gattggctat ctatagaacc acttcttgct     1020
acaggtacag ttgatgttct tgcaatggaa gaaaactggt ctccacctgc aatagatcat     1080
tatgctgaaa agtatcaggt aacttttagta ggtgtaagta ctattatagg tattccgggg     1140
ttaaatcata tgattccata taatcctgaa aaagtgggtg aaatggctga taaattgatt     1200
gatttggcca ttgaaaattt taaaaagaga aaggataaca ttacaccaaa ggttcctaaa     1260
ataacacaga aagcaatagc agggttttct actgaagcag ttttaaaagc tttaggaaat     1320
aagcttgatc cacttggtga tgttattaag gcaggggaaga ttaaaggaat tgtggctttg     1380
gcaaattggt caactctaag aaatggctct caagattgga atacagttaa cctggtaaag     1440
gaattgatta aaaaggatat tttagttgtg gctggtgggt gcggcaatca tgctcttgaa     1500
gtagcagggc tgtgcaacct agatgcaata aacatggctg gccaaaggact aaaagaagta     1560
tgcaatatgc taaagattcc tccagttcta agctttggaa cttgtacaga tacgggaaga     1620
atatccatgc ttgttacaga acttgctaact taccttgatg tagatatacc agatcttcct     1680
attgctgtaa cggctcctga gtggatggaa caaaaagcta ctatagatgg tttatttgca     1740
gtagcctatg ggacatatac acatttatct ccaactccat ttctaacagg cgcagaacag     1800
cttgtaaagc ttcttactga ggatgtagag agcttaacag gaggtaaagt tgcattagga     1860
gataatccaa aagaggcagc tgataatatt gaagcacata tattaagtaa aagaaaggg     1920
ttggagttat aa                                                              1932

```

<210>9  
 <211> 639  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium scatologenes  
 <400>9

```

Met Ser Glu Thr Ile Leu Glu Lys Ser Glu Gly Arg Val Ser Tyr His
 1                5                10                15

Asp Ser Val Glu Glu Met Ile Lys Arg Ile Arg Glu Asp Gly Met Ser
          20                25                30

Asn Ala Phe Asp Arg Tyr Ala Leu Gln Asp Lys Ile Arg Cys Lys Phe
          35                40                45

Cys Leu Glu Gly Leu Ser Cys Gln Leu Cys Ser Asn Gly Pro Cys Arg
          50                55                60

```

5

10

ES 2 728 726 T3

Ile Ser Glu Lys Thr Gly Gln Thr Lys Gly Val Cys Gly Ile Ser Ala  
65 70 75 80

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

Gly Thr Tyr Ser His His Ala Tyr Glu Ala Phe Arg Thr Leu Lys Ala  
100 105 110

Thr Ala Glu Gly Lys Thr Pro Phe Lys Ile Thr Asp Val Asn Lys Leu  
115 120 125

Lys Trp Met Cys Glu Lys Val Gly Ile Asn Thr Asn Gln Glu Ile Asn  
130 135 140

Asp Met Ala Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Glu Asp Gln Gln Ile Ile  
145 150 155 160

Gly Ile Glu Asp Lys Asn Ile Met Ile Glu Ala Phe Ala Pro Lys Lys  
165 170 175

Arg Lys Glu Leu Trp Arg Lys Leu Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Thr Val  
180 185 190

His Glu Glu Gln Asn Cys Val Ala Ser Cys Leu Thr Asn Val Asp Gly  
195 200 205

Ser His Val Ser Leu Ala Met Lys Ala Leu Arg Leu Gly Ile Ala Thr  
210 215 220

Ile Tyr Asn Ser Gln Ile Gly Leu Glu Met Val Gln Asp Ile Leu Phe  
225 230 235 240

Gly Thr Pro Thr Pro His Glu Val Asn Met Asp Leu Gly Ile Met Asp  
245 250 255

Pro Glu Tyr Val Asn Ile Val Phe Asn Gly His Gln Pro Trp Pro Gly  
260 265 270

Val Ala Thr Ile Leu Lys Ala Arg Thr Lys Glu Val Gln Glu Lys Ala  
275 280 285

Lys Ala Ala Gly Ala Lys Gly Leu Arg Ile Val Gly Ser Ile Glu Thr  
290 295 300

Gly Gln Glu Leu Leu Gln Arg Phe Glu Ile Asp Asp Val Phe Val Gly  
305 310 315 320

ES 2 728 726 T3

His Met Gly Asn Trp Leu Thr Ile Glu Pro Leu Leu Ala Thr Gly Thr  
 325 330 335  
 Val Asp Val Phe Ala Met Glu Glu Asn Cys Ser Pro Pro Ala Ile Asp  
 340 345 350  
 Met Tyr Ala Glu Lys Tyr Gln Val Thr Leu Val Ser Val Ser Thr Ile  
 355 360 365  
 Ile Asp Leu Pro Gly Leu Asp Glu Lys Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Lys  
 370 375 380  
 Val Asn Ala Met Ala Asp Arg Leu Ile Glu Leu Ala Ile Gln Asn Phe  
 385 390 395 400  
 Lys Lys Arg Lys Glu Arg Asn Ile Gln Pro Met Val Pro Lys Lys Ile  
 405 410 415  
 Gln Lys Ala Ile Ala Gly Phe Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Ala Leu  
 420 425 430  
 Gly Asn Lys Leu Asp Pro Leu Val Asp Val Ile Ala Ala Gly Lys Ile  
 435 440 445  
 Lys Gly Val Val Ala Leu Ala Asn Cys Ser Thr Leu Arg Asn Gly Pro  
 450 455 460  
 Gln Asp Trp Val Thr Ile Asn Leu Thr Lys Glu Leu Ile Lys Lys Asp  
 465 470 475 480  
 Ile Leu Val Val Ser Gly Gly Cys Gly Asn His Ala Leu Glu Val Ala  
 485 490 495  
 Gly Leu Cys Thr Val Glu Ala Ala Asn Glu Leu Ala Gly Glu Gly Leu  
 500 505 510  
 Lys Glu Val Cys Asn Met Leu Lys Ile Pro Pro Val Leu Ser Phe Gly  
 515 520 525  
 Thr Cys Thr Asp Thr Gly Arg Ile Ser Met Leu Val Thr Ala Leu Ala  
 530 535 540  
 Asp His Leu Asp Val Asp Val Ser Asp Leu Pro Ile Ala Val Thr Ala  
 545 550 555 560  
 Pro Glu Trp Met Glu Gln Lys Ala Thr Ile Asp Gly Ile Phe Ala Leu



ES 2 728 726 T3

gatccttcta aagtgaacgc tatggctgat agattaattg aacttgctat acaaaatfff 1200  
 aaaaagagaa aagaaagaaa tattcaacca atggttcccta aaaaaattca aaaagctata 1260  
 gctgggttct caactgaagc tgtgttaggc gctcctggaa ataaacttga tcctttagta 1320  
 gatgtaatag ctgctgggaa aattaaggga gttgtagctc ttgcaaattg ttctacttta 1380  
 agaaatggtc ctcaagactg ggttacaata aatccttaca aagagcttat aaaaaagat 1440  
 atattagttg ttagtggtgg ctgtggaaat catgctcttg aagttgcagg attatgtaca 1500  
 gtagaagcag ctaatgaatt agctggtgaa ggattaaaag aagtatgcaa tatgttaaaa 1560  
 atccctccag tactaagctt tggaacctgt actgatacag gtagaatatc tatgcttgtt 1620  
 actgctctag cagatcattt ggatgttgat gtatctgacc ttccaatagc tgttactgct 1680  
 ccagaatgga tggagcaaaa agcaaccata gatggaatff ttgcattagc ctatggagct 1740  
 tatactcatt tatctcctac tccttttatg acaggagctc ctcagcttgt agagcttcta 1800  
 actaaaaaag tagaagatgt aacaggtgga aaaatcgcac taggagataa tcctgttgag 1860  
 gttgcaaaca atatagaggc tcacataata agtaaaagaa aagggttagg attaagftaa 1920

<210> 11  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium scatologenes

5

<400> 11

Met Glu Glu Lys Ala Lys Ser Ile Asp Gln Ala Thr Leu Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Ala Lys Gln Asp Gly Val Glu Thr Val Trp Asp Arg Lys Ala  
 20 25 30  
 Asp Met Lys Val Gln Cys Gly Phe Gly Ser Ala Gly Val Cys Cys Arg  
 35 40 45  
 Asn Cys Ser Met Gly Pro Cys Arg Val Ser Pro Val Pro Gly Lys Gly  
 50 55 60  
 Val Glu Arg Gly Ile Cys Gly Ala Thr Ala Asp Val Ile Val Ser Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Phe Ala Arg Met Val Ala Ala Gly Thr Ala Ala His Ser Asp His  
 85 90 95  
 Gly Arg Ser Ile Ala Leu Ser Leu Tyr His Thr Ser Lys Asp Gly Asp  
 100 105 110  
 Ile Lys Val Lys Asp Glu Asn Lys Leu Lys Glu Val Ala Lys Ser Phe

10

ES 2 728 726 T3

115				120				125							
Asn	Val	Glu	Thr	Glu	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Asp	Ile	Ala	His	Asp	Val
130				135				140							
Ala	Lys	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu	Val	Thr
145				150				155							
Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Glu	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu	Trp	Arg	Lys	Leu
165				170				175							
Gly	Val	Tyr	Pro	Arg	Ala	Val	Asp	Arg	Glu	Ile	Ala	Ala	Val	Met	His
180				185				190							
Ser	Thr	His	Ile	Gly	Cys	Asn	Ala	Asp	Ala	Glu	Ala	Met	Ile	Lys	Met
195				200				205							
Ser	Met	Arg	Cys	Ser	Leu	Thr	Asp	Gly	Trp	Met	Gly	Ser	Phe	Met	Gly
210				215				220							
Thr	Glu	Phe	Ser	Asp	Ile	Met	Phe	Gly	Thr	Pro	His	Ser	Ile	Asp	Thr
225				230				235							
Glu	Ala	Asn	Leu	Gly	Val	Leu	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Asn	Val	Val	Leu
245				250				255							
His	Gly	His	Glu	Pro	Leu	Leu	Ser	Glu	Met	Val	Val	Glu	Ala	Ala	Ser
260				265				270							
Asp	Pro	Glu	Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Ile
275				280				285							
Asn	Leu	Cys	Gly	Met	Cys	Cys	Thr	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Met	Arg	His
290				295				300							
Gly	Ile	Lys	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Met	Gln	Gln	Glu	Leu	Ala	Val	Val
305				310				315							
Thr	Gly	Ala	Val	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Asp	Val	Gln	Cys	Ile	Met	Pro
325				330				335							
Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	His	Thr	Lys	Phe	Ile	Thr	Thr
340				345				350							
Ser	Pro	Lys	Ala	His	Ile	Thr	Asp	Ser	Ile	Tyr	Met	Glu	Phe	Asp	Glu
355				360				365							

ES 2 728 726 T3

Glu Asn Pro Leu Asp Ser Ala Lys Lys Ile Leu Lys Glu Ala Ile Leu  
 370 375 380

Asn Phe Lys Asn Arg Asp Gln Ser Lys Val Met Ile Pro Glu Leu Lys  
 385 390 395 400

5 <210> 12  
 <211> 1278  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium scatologenes

<400> 12

```

atggaagaaa aagcaaaatc aattgatcag gctactttac aattattgga caaggcaaaa      60
caagatgggg tcgaaacagt ttgggataga aaagcagaca tgaaggtaca gtgtggattt      120
ggatcagcag gagtttgctg tagaaattgc agcatgggcc catgtagagt aagtccagtg      180
ccaggaaaag gtgtagaaag aggtatatgt ggagctacag cagatgtaat tgtatctaga      240
aattttgcaa gaatggttgc agcaggtact gcagcacact cagatcatgg tagaagtata      300
gcacttagct tgtatcacac tagtaaagat ggagatataa aagttaaaga tgaaaataaa      360
ttgaaagaag ttgcaaagag ctttaatggt gaaactgagg gaagagatat atatgacata      420
gctcatgatg tagcaaaaga aggattaagt aattatggta aacagcttgg agaagttact      480
ttaccacctt ctttaccaga aaagagaaaa gaattgtgga gaaaattagg tgtatatcca      540
agggcagttg atagagaaat agctgcagtt atgcattcaa cacatatagg atgtaatgca      600
gatgcagaag ctatgattaa aatgtctatg agatgttcac taactgatgg atggatgggc      660
tcattcatgg gaacagaatt cagtgatata atgtttggaa cacctcattc cattgatata      720
gaggcaaatc ttggagtact tgaaaagaat tctgtaaattg tagttttaca cggacatgaa      780
ccacttcttt cagaaatggt agtagaagca gcatcagatc cagagttagt tgaacttgct      840
aaatcagtag gtgctgatgg aataaattta tgtggaatgt gctgtactgg aaatgaagtt      900
tccatgagac atggcatcaa aatagcagga aactttatgc agcaggaatt ggctgtagtt      960
acaggagcag tagatggact tatagttgat gtacagtgta ttatgccagc actagcaaaa     1020
ttgtccaagt catatcatac taagtttata acaacttcac caaaggcaca catcacagat     1080
tcaatttata tggaatttga tgaagaaaac ccacttgatt cagctaagaa gattctaaaa     1140
gaagcaatat taaactttaa aatagagat cagagcaaag taatgattcc tgaattgaaa     1200
tgaaaggcaa ttttgggata cagtgttgaa gaaattataa ataaattaga caaggttgta     1260
aatacacaaa taggacca                                     1278
    
```

10  
 15 <210> 13  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium scatologenes

ES 2 728 726 T3

<400> 13

Met Gly Tyr Ser Val Glu Glu Ile Ile Asn Lys Leu Asp Lys Val Val  
1 5 10 15

Asn Thr Gln Ile Gly Pro Met Gln Thr Val Lys Pro Leu Ala Asp Val  
20 25 30

Leu Val Ser Gly Val Leu Arg Gly Ala Ala Ala Val Val Gly Cys Asn  
35 40 45

Asn Pro Lys Val Val Gln Asp Ser Ala His Ile Glu Thr Ile Lys Gly  
50 55 60

Leu Ile Lys Asn Asp Val Ile Val Val Val Thr Gly Cys Ala Ala Gln  
65 70 75 80

Ala Ala Ala Lys Tyr Gly Leu Leu Gln Lys Glu Ala Ala Glu Lys Tyr  
85 90 95

Ala Gly Pro Gly Leu Ala Thr Val Cys Lys Leu Val Asp Ile Pro Pro  
100 105 110

Val Leu His Met Gly Ser Cys Val Asp Ile Ser Arg Ile Leu Asp Leu  
115 120 125

Val Gly Arg Val Ala Asn Leu Leu Gly Val Asp Met Ser Asp Leu Pro  
130 135 140

Val Ala Gly Val Ala Pro Glu Trp Met Ser Glu Lys Ala Val Ala Ile  
145 150 155 160

Gly Thr Tyr Val Val Thr Ser Gly Ile Asp Thr Trp Leu Gly Val Ala  
165 170 175

Pro Pro Val Thr Gly Gly Pro Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Asn Lys  
180 185 190

Met Glu Asp Trp Val Gly Ala Lys Phe Phe Ile Glu Thr Asp Pro His  
195 200 205

Lys Ala Val Glu Gln Ile Val Asn Arg Met Asn Glu Lys Arg Lys Lys  
210 215 220

Leu Gly Ile  
225

ES 2 728 726 T3

<210> 14  
 <211> 617  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium scatologenes

5

<400> 14

```

atgcaaactg taaaaccttt ggcagatggt ttagtatcag gagtattaag aggtgctgca      60
gctgtggttg gatgtaataa tcctaaagtt gtacaagatt ctgcacacat tgaactata      120
aaaggattaa taaaaaatga tgtaattggt gttgttacag gttgtgcagc tcaagcagca      180
gcaaaatatg gcttattaca aaaagaagca gcagaaaaat atgcaggacc aggactagct      240
actgtatgta aacttgtaga cataccacct gtacttcata tgggttcttg tgttgatata      300
agtcgtatat tagatttggg tgggaagagt gctaatttat tgggcggtga catgagtgac      360
cttccagttg caggtgtagc acctgaatgg atgtcagaaa aagccgtagc aataggtact      420
tatgtagtaa cttcaggtat agatacttgg cttggagtag cacctccagt aacaggcggc      480
ccagaagttg ttgacattct tactaataag atggaagact gggtaggagc taaattcttt      540
atagaaacag atcctcataa agcagttgaa caaattgtaa ataggatgaa tgaaaaacgt      600
aaaaaattag gtatcta                                          617
    
```

10

<210> 15  
 <211> 617  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Sintético

<400> 15

```

atgcaaactg taaaaccttt ggcagatggt ttagtatcag gagtattaag aggtgctgca      60
gctgtggttg gatgtaataa tcctaaagtt gtacaagatt ctgcacacat tgaactata      120
aaaggattaa taaaaaatga tgtaattggt gttgttacag gttgtgcagc tcaagcagca      180
gcaaaatatg gcttattaca aaaagaagca gcagaaaaat atgcaggacc aggactagct      240
actgtatgta aacttgtaga cataccacct gtacttcata tgggttcttg tgttgatata      300
agtcgtatat tagatttggg tgggaagagt gctaatttat tgggcggtga catgagtgac      360
cttccagttg caggtgtagc acctgaatgg atgtcagaaa aagccgtagc aataggtact      420
tatgtagtaa cttcaggtat agatacttgg cttggagtag cacctccagt aacaggcggc      480
ccagaagttg ttgacattct tactaataag atggaagact gggtaggagc taaattcttt      540
atagaaacag atcctcataa agcagttgaa caaattgtaa ataggatgaa tgaaaaacgt      600
aaaaaattag gtatcta                                          617
    
```

20

<210> 16  
 <211> 344

ES 2 728 726 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sintético	
	<400> 16	
	aagcttataa ttatccttaa gtgtcatggt agtgcgcca gatagggtgt taagtcaagt	60
	agtttaaggt actactctgt aagataacac agaaaacagc caacctaacc gaaaagcgaa	120
	agctgatacg ggaacagagc acggttgaa agcgatgagt tacctaaaga caatcgggta	180
	cgactgagtc gcaatgtaa tcagatataa ggtataagtt gtgtttactg aacgcaagtt	240
	tctaatttcg attacacttc gatagaggaa agtgtctgaa acctctagta caaagaaagg	300
	taagttatct accatgactt atctgttatc accacatttg taca	344
10	<210> 17	
	<211> 344	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sintético	
	<400> 17	
20	aagcttataa ttatccttag agttcgctgt agtgcgcca gatagggtgt taagtcaagt	60
	agtttaaggt actactctgt aagataacac agaaaacagc caacctaacc gaaaagcgaa	120
	agctgatacg ggaacagagc acggttgaa agcgatgagt tacctaaaga caatcgggta	180
	cgactgagtc gcaatgtaa tcagatataa ggtataagtt gtgtttactg aacgcaagtt	240
	tctaatttcg attaactctc gatagaggaa agtgtctgaa acctctagta caaagaaagg	300
	taagttatct acagcgactt atctgttatc accacatttg taca	344
	<210> 18	
	<211> 562	
25	<212> ADN	
	<213> Clostridium autoethanogenum	
	<400> 18	

ES 2 728 726 T3

ggccgcagat agtcataata gttccagaat agttcaatth agaaattaga ctaaacttca 60  
 aaatgtttgt taaatatata ccaaactagt atagatatth tttaaatact ggacttaaac 120  
 agtagtaatt tgcctaaaaa attttttcaa ttttttttaa aaaatcctth tcaagttgta 180  
 cattgttatg gtaatatgta attgaagaag ttatgtagta atattgtaa cgthttcttga 240  
 tttttttaca tccatgtagt gcttaaaaaa caaaatatg tcacatgcaa ttgtatatth 300  
 caaataacaa tatttattht ctctgtaaat tcacaaataa tttattaata atatcaataa 360  
 ccaagattat acttaaatgg atgtthttht tttaacactt ttatagtaa tatatttht 420  
 ttatgtagta aaaaggtht aattataatt gtatttatta caattaatta aaataaaaat 480  
 agggthttag gtaaaaataa gttattthta gaagtaatta caataaaaat tgaagthtatt 540  
 gctthtaagga gggaattatt ca 562

5 <210> 19  
 <211> 573  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 19

atggataatt tagttataaa tacattgaaa gaagtaggag cactthttgga agggcattth 60  
 ctactthctt caggaaaaca cagtgatagg tattgtcagt gtgcaaaact tttacagtat 120  
 cctgacaggg caaaagatgt aatagcagth attgcagaca aattagagaa tgttgactat 180  
 gataaaaatag ttggacctgc aatggggggg atattagtht cctatgaaact tgcaaggcaa 240  
 acgggcaaac caggaatatt tgctgaaagg caaaatggaa atatgactat aagaagggga 300  
 tttgaaataa aagaaggaga aaaaattata atthctgaag atgtggtaac tacaggaaaa 360  
 tcatctgtag aggttgctaa ggtaattcag gaattaggtg gagaggttgt aggcataatgt 420  
 tgcatagtag acagaagagc agaaggtgct aaaatagaat atccaattta tagtgtagta 480  
 aaacttaata taaacactta tgataaggaa aattgtccta tgtgtaagca aggacaagaa 540  
 tatgtaaagc ctggaagtag agtattcaaa taa 573

10  
 15 <210> 20  
 <211> 6927  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

20 <400> 20

ES 2 728 726 T3

cctgcaggat	aaaaaaattg	tagataaatt	ttataaaata	gttttatcta	caatTTTTTT	60
atcaggaaac	agctatgacc	gcggccgcag	atagtcataa	tagttccaga	atagttcaat	120
ttagaaatta	gactaaactt	caaaatgttt	gttaaata	taccaaacta	gtatagatat	180
TTTTTaaata	ctggacttaa	acagtagtaa	ttgcctaaa	aaatTTTTTc	aatTTTTTTT	240
aaaaaatcct	tttcaagttg	tacattgtta	tggtaatatg	taattgaaga	agttatgtag	300
taatattgta	aacgtttctt	gattTTTTTT	catccatgta	gtgcttaaaa	aaccaaata	360
tgtcacatgc	aattgtatat	ttcaaataac	aatatttatt	ttctcgtaa	attcacaat	420
aattattaa	taatatcaat	aaccaagatt	atacttaaat	ggatgtttat	TTTTTaaac	480
TTTTatagta	aatatattta	TTTTatgtag	taaaagggtt	ataattataa	ttgtatttat	540
tacaattaat	taaaataaaa	atagggtttt	aggtaaaatt	aagttatttt	aagaagtaat	600
tacaataaaa	attgaagtta	ttgctttaag	gaggaatta	ttcatatgga	agaaaagca	660

ES 2 728 726 T3

aaatcaattg atcaggctac tttacaatta ttggacaagg caaaacaaga tggggctcgaa	720
acagtttggg atagaaaagc agacatgaag gtacagtgtg gatttggatc agcaggagtt	780
tgctgtagaa attgcagcat gggcccatgt agagtaagtc cagtgccagg aaaaggtgta	840
gaaagaggta tatgtggagc tacagcagat gtaattgtat ctagaaattt tgcaagaatg	900
gttgcagcag gtactgcagc aactcagat catggtagaa gtatagcact tagcttgtat	960
cacactagta aagatggaga tataaaagt aaagatgaaa ataaattgaa agaagttgca	1020
aagagcttta atgttgaaac tgagggaaga gatatatatg acatagctca tgatgtagca	1080
aaagaaggat taagtaatta tggtaaacag cttggagaag ttactttacc accttcttta	1140
ccagaaaaga gaaaagaatt gtggagaaaa ttaggtgtat atccaagggc agttgataga	1200
gaaatagctg cagttatgca ttcaacacat ataggatgta atgcagatgc agaagctatg	1260
attaaaatgt ctatgagatg ttactaact gatggatgga tgggctcatt catgggaaca	1320
gaattcagtg atataatgtt tggaacacct cattccattg atacagaggc aaatcttggga	1380
gtacttgaaa agaattctgt aaatgtagtt ttacacggac atgaaccact tctttcagaa	1440
atggtagtag aagcagcatc agatccagag ttagttgaac ttgctaaatc agtaggtgct	1500
gatggaataa atttatgtgg aatgtgctgt actggaaatg aagtttccat gagacatggc	1560
atcaaaatag caggaaaactt tatgcagcag gaattggctg tagttacagg agcagtagat	1620
ggacttatag ttgatgtaca gtgtattatg ccagcactag caaaattgtc caagtcatat	1680
catactaagt ttataacaac ttcaccaaag gcacacatca cagattcaat ttatatggaa	1740
tttgatgaag aaaaccctct tgattcagct aagaagattc taaaagaagc aatattaaac	1800
tttaaaaata gagatcagag caaagtaatg attcctgaat tgaaatgaaa ggcaattttg	1860
ggatacagtg ttgaagaaat tataaataaa ttagacaagg ttgtaaatac acaaatagga	1920
ccaatgcaaa ctgtaaaacc tttggcagat gtttttagtat caggagtatt aagaggtgct	1980
gcagctgtgg ttggatgtaa taatcctaaa gttgtacaag attctgcaca cattgaaact	2040
ataaaaggat taataaaaaa tgatgtaatt gttgttgta caggttgtgc agctcaagca	2100
gcagcaaaat atggcttatt acaaaaagaa gcagcagaaa aatatgcagg accaggacta	2160
gctactgtat gtaaacttgt agacatacca cctgtacttc acatgggttc ttgtgttgat	2220
ataagtcgta tattagattt ggttggaaga gtggctaatt tattgggcgt tgacatgagt	2280
gaccttccag ttgcaggtgt agcacctgaa tggatgtcag aaaaagccgt agcaataggt	2340
acttatgtag taacttcagg tatagatact tggcttgag tagcacctcc agtaacaggc	2400
ggcccagaag ttgttgacat tcttactaat aagatggaag actgggtagg agctaaattc	2460
tttatagaaa cagatcctca taaagcagtt gaacaaattg taaataggat gaatgaaaa	2520

ES 2 728 726 T3

cgtaaaaaat taggtatcta ataataaaga caagcaattg ccatgccaga gctcgggtacc 2580  
 cggggatcct ctagagtcga cgtcacgcgt ccatggagat ctcgaggcct gcagacatgc 2640  
 aagcttggca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca 2700  
 acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg 2760  
 caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgct agcataaaaa 2820  
 taagaagcct gcatttgcag gcttcttatt tttatggcgc gccgccatta tttttttgaa 2880  
 caattgacaa ttcatttctt attttttatt aagtgatagt caaaaggcat aacagtgctg 2940  
 aatagaaaga aatttacaga aaagaaaatt atagaattta gtatgattaa ttatactcat 3000  
 ttatgaatgt ttaattgaat acaaaaaaaaa atacttgtta tgtattcaat tacggggttaa 3060  
 aatatagaca agttgaaaaa ttaataaaaa aaataagtcc tcagctctta tatattaagc 3120  
 taccaactta gtatataagc caaaacttaa atgtgctacc aacacatcaa gccgtagag 3180  
 aactctatct atagcaatat ttcaaagtta ccgacataca agagaacat taactatata 3240  
 tattcaattt atgagattat cttacagat ataaatgtaa attgcaataa gtaagattta 3300  
 gaagtttata gcctttgtgt attggaagca gtacgcaaag gcttttttat ttgataaaaa 3360  
 ttagaagtat atttatTTTT tcataattaa tttatgaaaa tgaaaggggg tgagcaaagt 3420  
 gacagaggaa agcagtatct tatcaaataa caaggtatta gcaatatcat tattgacttt 3480  
 agcagtaaac attatgactt ttatagtgtc tgtagctaag tagtacgaaa gggggagctt 3540  
 taaaaagctc cttggaatac atagaattca taaattaatt tatgaaaaga agggcgtata 3600  
 tgaaaacttg taaaaattgc aaagagtta ttaaagatac tgaaatatgc aaaatacatt 3660  
 cgttgatgat tcatgataaa acagtagcaa cctattgcag taaatacaat gagtcaagat 3720  
 gtttacataa agggaaagtc caatgtatta attgttcaaa gatgaaccga tatggatggt 3780  
 gtgccataaa aatgagatgt ttacagagg aagaacagaa aaaagaacgt acatgcatta 3840  
 aatattatgc aaggagcttt aaaaaagctc atgtaaagaa gagtaaaaag aaaaaataat 3900  
 ttatttatta atttaattatt gagagtgccg acacagtatg cactaaaaaa tatatctgtg 3960  
 gtgtagtgtg ccgatacaaa aggatagtca ctgcgatttt cataatacat cttatgttat 4020  
 gattatgtgt cgggtgggact tcacgacgaa aaccacaat aaaaaagag ttcggggtag 4080  
 ggtaagcat agttgaggca actaaacaat caagctagga tatgcagtag cagaccgtaa 4140  
 ggtcgttgtt taggtgtgtt gtaatacata cgctattaag atgtaaaaat acggatacca 4200  
 atgaagggaa aagtataatt tttggatgta gtttgtttgt tcatctatgg gcaaactacg 4260  
 tcaaagccg tttccaaatc tgctaaaaag tatatccttt ctaaaatcaa agtcaagtat 4320  
 gaaatcataa ataaagtta attttgaagt tattatgata ttatgttttt ctattaaaat 4380  
 aaattaagta tatagaatag ttaataata gtatatactt aatgtgataa gtgtctgaca 4440

ES 2 728 726 T3

gtgtcacaga	aaggatgatt	gttatggatt	ataagcggcc	ggccagtggg	caagttgaaa	4500
aattcacaaa	aatgtggtat	aatatctttg	ttcattagag	cgataaactt	gaatttgaga	4560
gggaacttag	atggtatttg	aaaaaattga	taaaaatagt	tggaacagaa	aagagtatth	4620
tgaccactac	tttgcaagtg	taccttgtag	ctacagcatg	accgttaaag	tggatatcac	4680
acaataaag	gaaaaggga	tgaaactata	tcttgcaatg	ctttattata	ttgcaatgat	4740
tgtaaaccgc	cattcagagt	ttaggacggc	aatcaatcaa	gatggtgaat	tggggatata	4800
tgatgagatg	ataccaagct	atacaatatt	tcacaatgat	actgaaacat	tttccagcct	4860
ttggactgag	tgtaagtctg	actttaaatc	atthtttagca	gattatgaaa	gtgatacgc	4920
acggtatgga	aacaatcata	gaatggaagg	aaagccaaat	gctccggaaa	acathtttaa	4980
tgtatctatg	ataccgtggt	caaccttcga	tggctthaat	ctgaatttgc	agaaaggata	5040
tgattatthg	attcctatth	ttactatggg	gaaatattat	aaagaagata	acaaaattat	5100
acttctcttg	gcaattcaag	ttcatcacgc	agtatgtgac	ggatttcaca	tttgccgtht	5160
tgtaaacgaa	ttgcaggaat	tgataaatag	ttaacttcag	gthttgtctgt	aactaaaaac	5220
aagtathtaa	gcaaaaaacat	cgtagaaata	cggtgthttt	tgttacccta	agthtaaac	5280
cctthttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	thttctgtcc	actgagcgtc	5340
agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	thttttctgc	gcgtaatctg	5400
ctgcttgcaa	acaaaaaac	caccgctacc	agcggtggtt	tgtttgccgg	atcaagagct	5460
accaactctt	thtccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	atactgthct	5520
tctagtgtag	ccgtagthtag	gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	ctacatacct	5580
cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	gataagtctg	gtcttaccgg	5640
gttggactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	tggggctgaa	cggggggtht	5700
gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	ctgagatacc	tacagcgtga	5760
gctatgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	gacaggtatc	cggtaagcgg	5820
cagggctcga	acaggagagc	gcacgaggg	gcttccaggg	ggaaacgcct	ggtatctth	5880
tagtcctgtc	gggtthcggc	acctctgact	tgagcgtcga	thttttgtgat	gctcgtcagg	5940
ggggcggagc	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcggcctth	ttacggthcc	tggcctthtg	6000
ctggccttht	gctcacatgt	tctthcctgc	gttatccct	gattctgtgg	ataaccgtat	6060
taccgcctth	gagtgagctg	ataccgctcg	ccgcagccga	acgaccgagc	gcagcagctc	6120
agtgagcag	gaagcggga	agcgcaccaat	acgcagggcc	ccctgcttcg	gggtcattat	6180
agcgatthtt	tcggtatata	catcctthtt	cgcacgatata	acaggattht	gccaaaggg	6240
tcgtgtagac	thtcttggt	gtatccaacg	gcgtcagccg	ggcaggatag	gtgaagtagg	6300

ES 2 728 726 T3

cccacccgcg agcgggtggt ccttcttcac tgtcccttat tcgcacctgg cggtgctcaa 6360  
 cgggaatcct gctctgag gctggccggc taccgccggc gtaacagatg agggcaagcg 6420  
 gatggctgat gaaaccaagc caaccaggaa gggcagccca cctatcaagg tgtactgcct 6480  
 tccagacgaa cgaagagcga ttgaggaaaa ggcggcggcg gccggcatga gcctgtcggc 6540  
 ctacctgctg gccgtcggcc agggctacaa aatcacgggc gtcgtggact atgagcacgt 6600  
 ccgagagctg gcccgcatca atggcgacct gggccgctg ggcggcctgc tgaaactctg 6660  
 gctcaccgac gaccgcgca cggcgcggtt cggatgatgcc acgatcctcg ccctgctggc 6720  
 gaagatcgaa gagaagcagg acgagcttgg caaggtcatg atgggcgtgg tccgcccag 6780  
 ggcagagcca tgactttttt agccgctaaa acggccgggg ggtgcgcgtg attgccaagc 6840  
 acgtcccat gcgctccatc aagaagagcg acttcgcgga gctggtgaag tacatcaccg 6900  
 acgagcaagg caagaccgat cgggcc 6927

5 <210>21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400>21  
 tggagtgctg gtggcctggt 20

15 <210> 22  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

<400> 22  
 aaaagctgta ctagtagctg atgccgt 27

25 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintético

<400> 23  
 gagctgttac atatagccat catgc 25

35 <210> 24  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintético

<400> 24  
 ctgtaccatt tcaagtccta ttgtgc 27

ES 2 728 726 T3

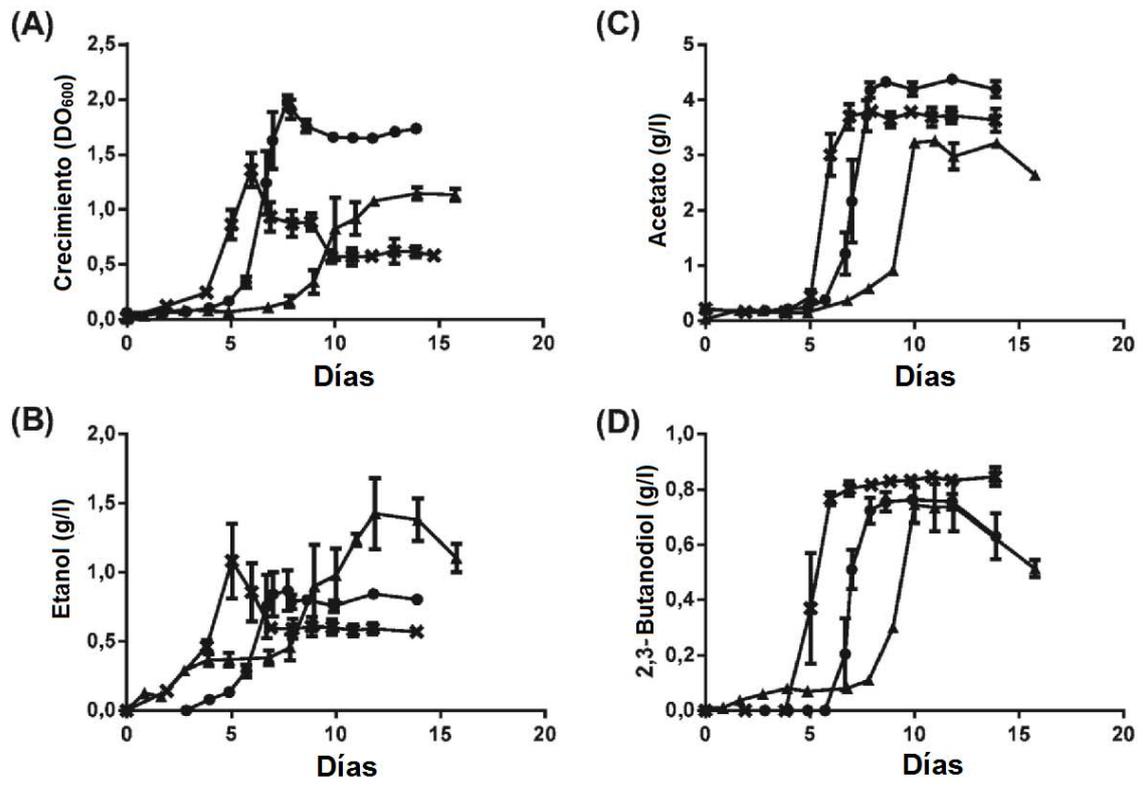
<210> 25  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 25  
 10 gcgagagttt gatcctggct cag 23  
 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 20 <400> 26  
 cgcggttacc ttgttacgac tt 22  
 <210> 27  
 <211> 28  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 30 <400> 27  
 cgaaattaga aacttgcgtt cagtaaac 28  
 <210> 28  
 <211> 32  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 40 <400> 28  
 attactgtga ctggttgca ccaccctctt cg 32  
 <210> 29  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 29  
 55 aagcggccgc agatagtcac aatagtcc 29  
 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 30  
 65 ttccatatga ataattccct ccttaaagc 29

ES 2 728 726 T3

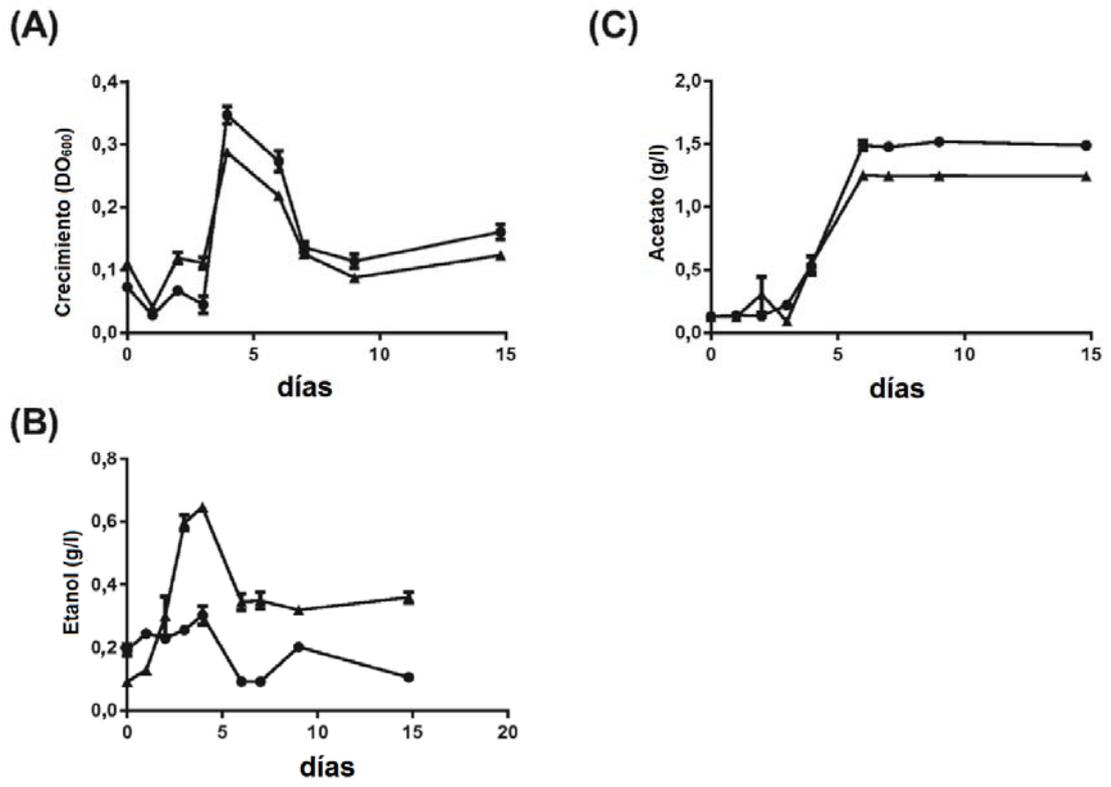
<210>31  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 31  
 10 gggaattagc catatggaag aaaaagc 27  
 <210> 32  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 20 <400> 32  
 atttgagctc tggcatggc 19  
 <210> 33  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 30 <400> 33  
 caagaacca tgtgaagtac agg 23  
 <210> 34  
 <211> 23  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 40 <400> 34  
 cctgtacttc acatgggttc ttg 23  
 <210> 35  
 <211> 28  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 50 <400> 35  
 aggctacttt acaattattg gacaaggc 28  
 <210> 36  
 <211> 28  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 60 <400> 36  
 65 gcccttgat atacacctaa tttctcc 28

**REIVINDICACIONES**

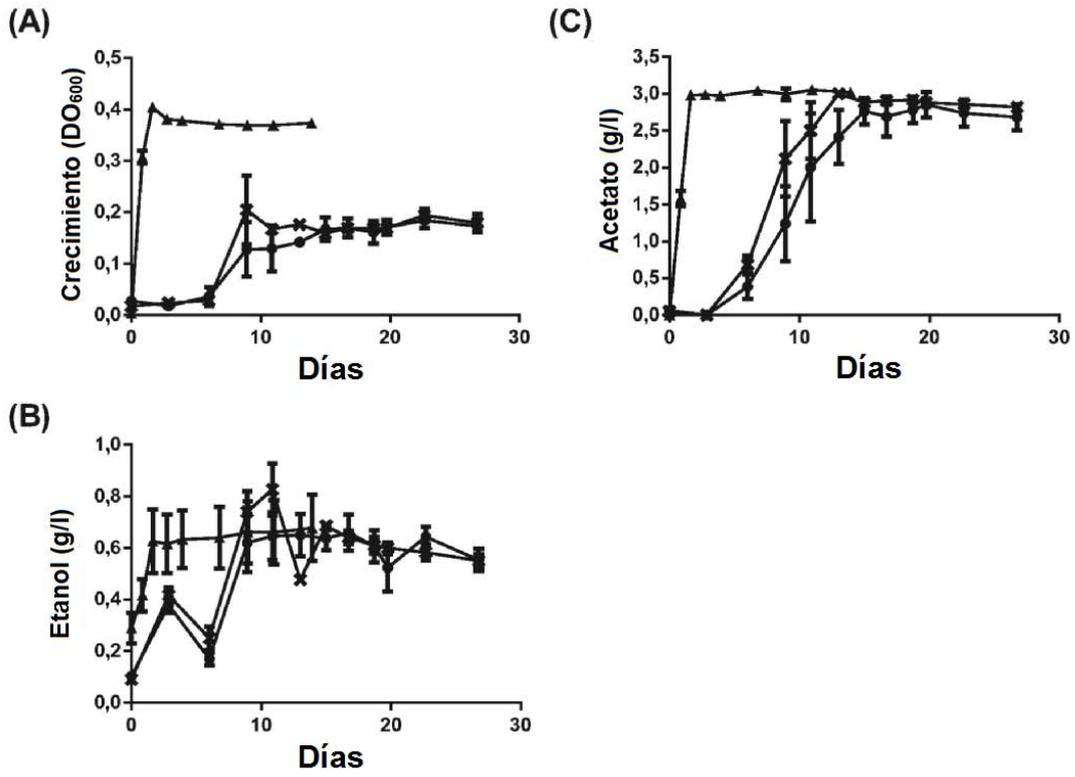
- 5 1. Una bacteria acetógena carboxidotrófica modificada por ingeniería genética que tiene actividad disminuida o eliminada de *CODH1* y/o *CODH2* en comparación con una bacteria parental.
2. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria comprende al menos una mutación negativa en un gen *CODH1* y/o gen *CODH2*.
- 10 3. La bacteria de la reivindicación 2, en donde la mutación negativa:
- (a) disminuye o elimina la expresión del gen *CODH1* y/o el gen *CODH2* en comparación con una bacteria parental; o
- (b) es una mutación de desactivación.
- 15 4. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria tiene además actividad incrementada de CODH/ACS en comparación con la bacteria parental.
5. La bacteria de la reivindicación 4, en donde la bacteria sobreexpresa un gen *CODH/ACS* en comparación con la bacteria parental.
- 20 6. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria produce:
- (a) uno o más de etanol y 2,3-butanodiol; o
- 25 (b) una mayor cantidad de etanol, produce una menor cantidad de acetato, tiene una fase de latencia más corta y/o tiene una tasa de crecimiento mayor en comparación con la bacteria parental.
7. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria consume un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.
- 30 8. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria parental es *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*.
9. Un método para producir un producto, que comprende cultivar la bacteria de la reivindicación 1 en presencia de un sustrato gaseoso que comprende uno o más de CO, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, por lo que la bacteria produce el producto.
- 35 10. El método de la reivindicación 9, en donde la bacteria comprende al menos una mutación negativa en un gen *CODH1* y/o gen *CODH2*.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, en donde la mutación negativa:
- (a) disminuye o elimina la expresión del gen *CODH1* y/o el gen *CODH2* en comparación con una bacteria parental; o
- (b) es una mutación de desactivación.
- 45 12. El método de la reivindicación 9, en donde la bacteria tiene además actividad incrementada de CODH/ACS en comparación con la bacteria parental.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la bacteria sobreexpresa un gen *CODH/ACS* en comparación con la bacteria parental.
- 50 14. El método de la reivindicación 9, en donde:
- (a) el producto comprende uno o más de etanol y 2,3-butanodiol; o
- 55 (b) la bacteria produce una mayor cantidad de etanol, produce una menor cantidad de acetato, tiene una fase de latencia más corta y/o tiene una tasa de crecimiento mayor en comparación con la bacteria parental.
15. El método de la reivindicación 9, en donde la bacteria parental es *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* o *Clostridium ragsdalei*.



Figs. 1A-1D



Figs. 2A-2C



Figs. 3A-3C

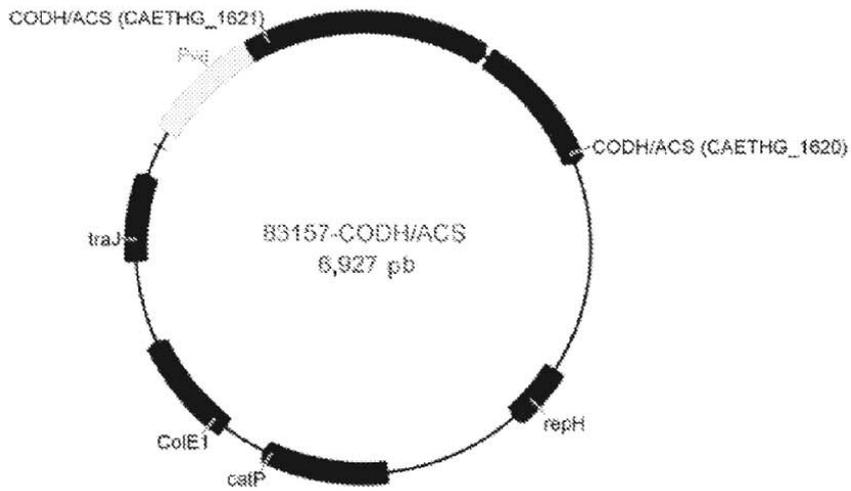
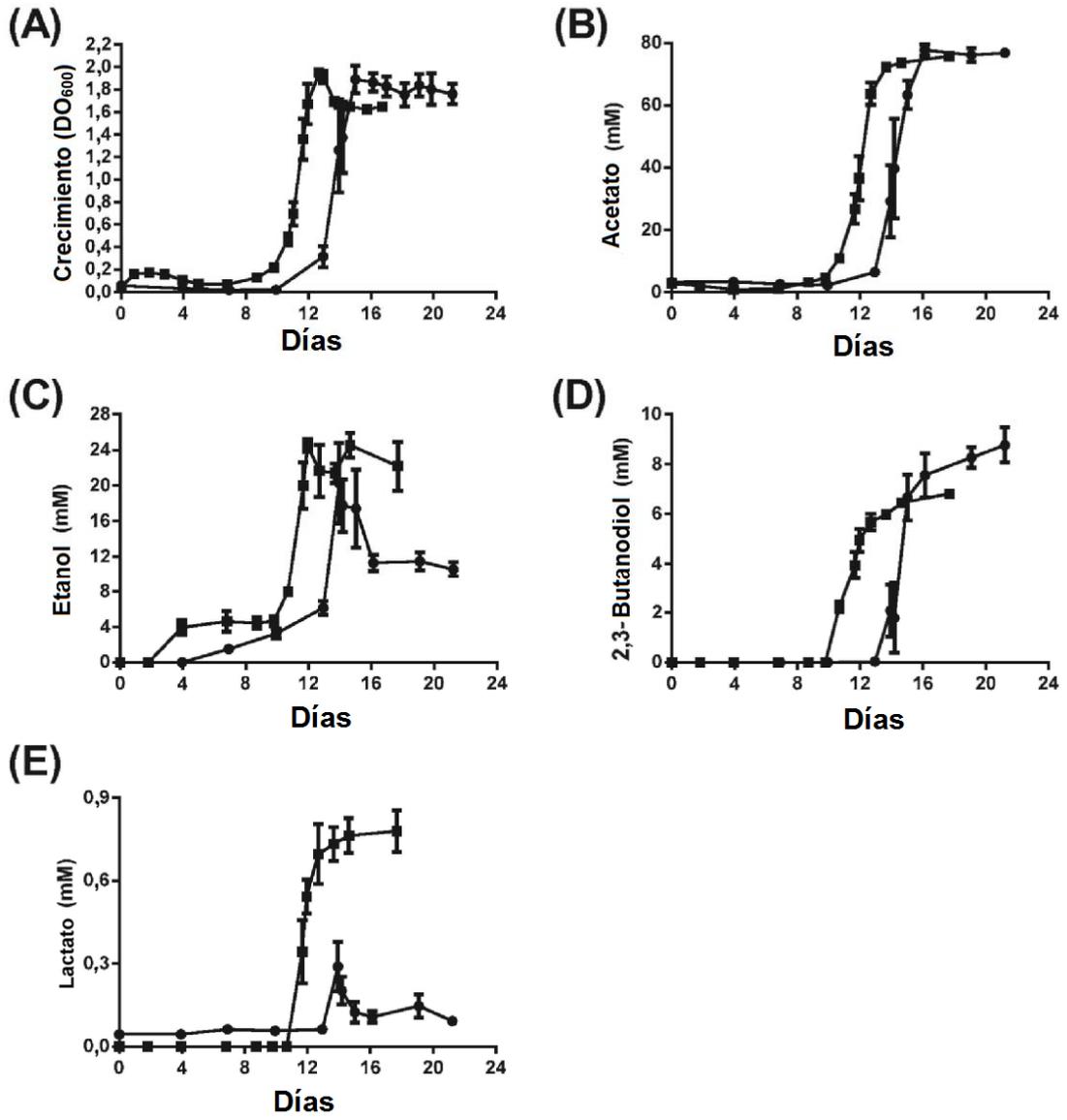
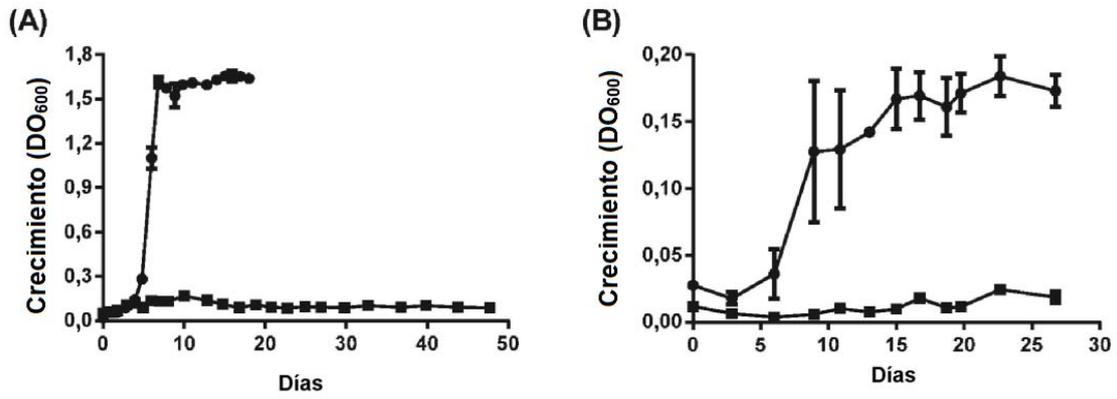


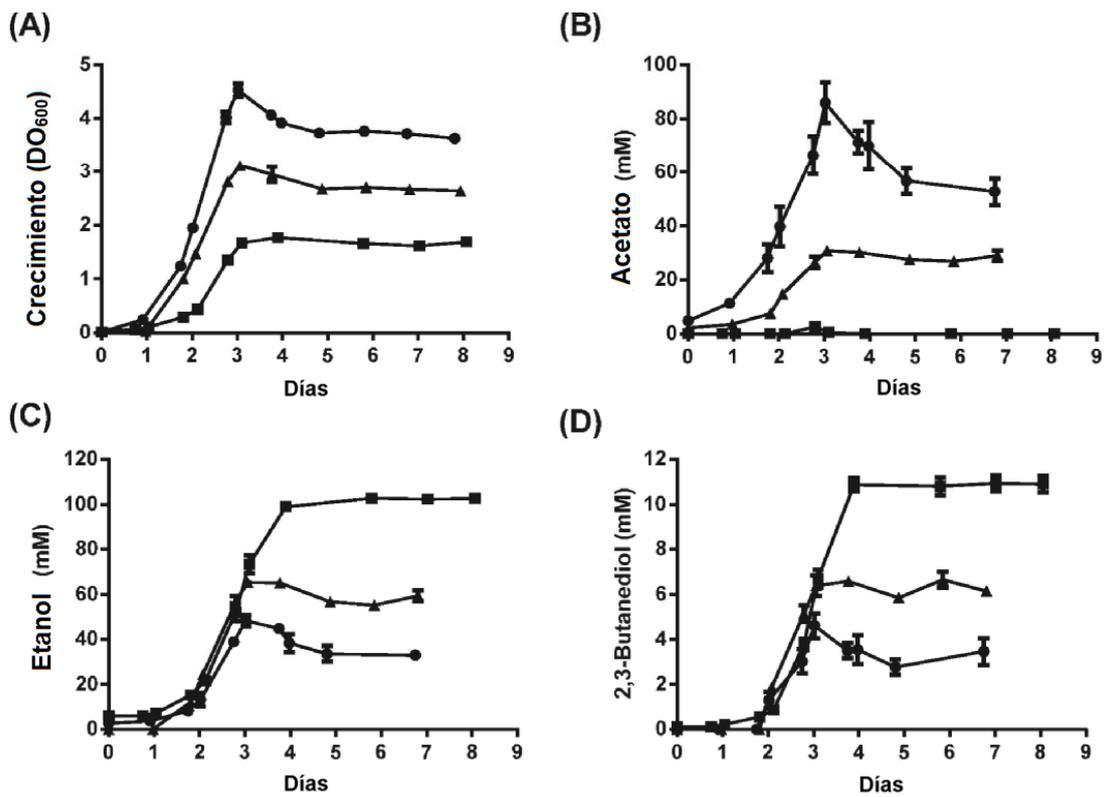
Fig. 4



Figs. 5A-5E



Figs. 6A-6B



Figs. 7A-7D

