



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 230 114**⁽¹³⁾ **C2**
 (51) МПК⁷ **C 12 N 1/21, 9/10, 15/11, C 12**
P 13/14// (C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

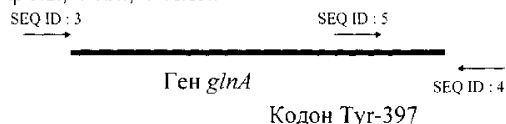
(21), (22) Заявка: 2001132473/13, 30.11.2001
 (24) Дата начала действия патента: 30.11.2001
 (43) Дата публикации заявки: 20.08.2003
 (46) Дата публикации: 10.06.2004
 (56) Ссылки: RU 2175351 C1, 27.10.2001. US 4430430, 07.02.1984. US 4278765, 14.07.1981.
 (98) Адрес для переписки:
 117279, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 55А, ЗАО
 "Фирма "центр патентных услуг", пат.пов.
 Е.А.Харченко

(72) Изобретатель: Гусятинер М.М. (RU),
 Ивановская Л.В. (RU), Леонова Т.В.
 (RU), Муханова Е.И. (RU), Ростова Ю.Г.
 (RU), Филиппов Д.В. (RU), Чудакова Д.А. (RU)
 (73) Патентообладатель:
 Закрытое акционерное общество
 "Научно-исследовательский институт
 Аджиномото-Генетика" (RU)

(54) МУТАНТНАЯ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗА, ФРАГМЕНТ ДНК, ШТАММ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ L-ГЛУТАМИНА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ

(57) Аминокислоты, такие как L-глутамин, L-аргинин, L-триптофан, L-гистидин и L-глутамат получают культивированием бактерии, принадлежащей к роду Escherichia, трансформированной фрагментом ДНК, кодирующим мутантную глутаминсинтетазу, в которой аминокислотный остаток тирозина, соответствующий положению 397 в природной глутаминсинтетазе, заменен

остатком другой аминокислоты, предпочтительно фенилаланином. В качестве штамма-продуцента может быть использован штамм Escherichia coli VL334thrC⁺/pMWglnAphe-4. 4 с. и 5 з.п. ф-лы, 1 ил., 1 табл.



RU 2 230 114 C2

RU 2 230 114 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 230 114** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 1/21, 9/10, 15/11, C 12 P 13/14// (C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001132473/13, 30.11.2001
(24) Effective date for property rights: 30.11.2001
(43) Application published: 20.08.2003
(46) Date of publication: 10.06.2004
(98) Mail address:
117279, Moskva, ul. Miklukho-Maklaja, 55A,
ZAO "Firma "tsentr patentnykh uslug",
pat.pov. E.A.Kharchenko

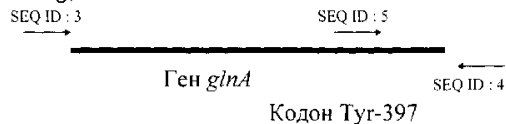
(72) Inventor: Gusjatiner M.M. (RU),
Ivanovskaja L.V. (RU), Leonova T.V.
(RU), Mukhanova E.I. (RU), Rostova Ju.G.
(RU), Filippov D.V. (RU), Chudakova D.A. (RU)
(73) Proprietor:
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo
"Nauchno-issledovatel'skij institut
Adzhinomoto-Genetika" (RU)

(54) **MUTANT GLUTAMINE SYNTHETASE, DNA FRAGMENT, STRAIN OF ESCHERICHIA COLI AS P RODUCER OF L-GLUTAMINE AND METHOD FOR PREPARING L-AMINO ACIDS**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology, biochemistry, molecular biology, biotechnology. SUBSTANCE: invention relates to a method for preparing amino acids L-glutamine, L-arginine, L-tryptophan, L-histidine and L-glutamic acid that involves culturing microorganism belonging to genus Escherichia transformed with DNA fragment encoding mutant glutamine synthetase wherein tyrosine amino acid residue corresponding to the position 397 in

the natural glutamine synthetase is replaced with residue of another amino acid, preferably with phenylalanine. The strain of Escherichia coli VL33thrC⁺/pMWglnApe-4 can be used as a strain-producer. EFFECT: valuable properties of strain. 9 cl, 1 tbl, 1 dwg, 3 ex



RU 2 230 114 C2

RU 2 230 114 C2

Область техники.

Настоящее изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к способу получения L-аминокислот. Конкретно, настоящее изобретение касается использования нового фермента, вовлеченного в биосинтез глутамина и пути ассимиляции азота в штаммах *E.coli* - продуцентах аминокислот, таких как глутамин и аргинин. Более конкретно, настоящее изобретение представляет новую мутантную глутаминсинтетазу и способ получения аминокислот, таких как глутамин, аргинин, триптофан, гистидин и глутамат, с использованием штаммов *E.coli*, содержащих указанный фермент.

Предшествующий уровень техники

У глутаминсинтетазы (GS) из *E.coli* две функции: образование глутамина и ассимиляция аммиака в условиях недостатка аммиака. Глутамин является донором азота в синтезе пуринов и пиримидинов, а также некоторых аминокислот, таких как аргинин, триптофан, аспарагин, гистидин и глутамат. В биосинтезе аргинина глутамин играет значительную роль, поскольку является единственным физиологическим донором аминогруппы в синтезе карбамоилфосфата - общего предшественника для аргинина и пиримидинов. При образовании триптофана глутамин используется в первой реакции биосинтеза триптофана, заключающейся в конверсии хоризмата и глутамина в антранилат, глутамин и пируват. Глутамин-зависимая аспарагинсинтетаза использует глутамин вместе с аспаратом и АТФ в главном пути биосинтеза аспарагина. В имидазольном кольце гистидина азот 3 получается из глутамина. И наконец, глутамин используется глутаматоксиглуларат аминотрансферазой (глутамат синтазой) (GOGAT) в синтезе глутамата.

Ввиду множества функций и важности GS в клеточном метаболизме обе ее каталитические активности и ее синтез тщательно регулируются.

Общая структура активной GS состоит из 12 субъединиц, скомпонованных в два гексамера друг напротив друга. Аденилирование тирозина-397 каждой субъединицы GS снижает ферментативную активность *in vivo*. Как аденилирование, так и де-аденилирование GS катализируется аденилтрансферазой, кодируемой геном *glnE*. Направление катализа определяется регуляторным белком PII (*glnB*), активность которого также определяется обратной модификацией: немодифицированная форма белка PII активирует аденилирование, в то время как уридиллированная форма белка PII активирует де-аденилирование GS. Специфическая уридиллирансфераза катализирует перенос уридиллильной группы с УТФ на белок PII, в то время как активность по удалению уридиллильной группы вызывает процесс, противоположный уридиллированию белка PII. Обе активности определяются геном *glnD*. Глутамин стимулирует активность по удалению уридиллильной группы, 2-оксиглуларат стимулирует уридиллирование белка PII. Таким образом, в конечном счете глутамин вызывает аденилирование GS, в то время как 2-оксиглуларат способствует образованию де-аденилированной (активной)

формы GS (*Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition, Editor in Chief: F.C.Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

Ранее были описаны мутантные глутаминсинтетазы из различных видов, не способные к аденилированию. Такими мутантами являются мутантная GS из *Rhizobium meliloti* (Arcondeguy et al, FEMS Microbiol. Lett., 1996, 145:1, 33-40), Y398F мутантная GS из *Rhodospirillum rubrum* (Zhang et al, J. Bacteriol., 2000, 182:4, 938-92) и Y407F мутантная GS из *Azobacter vinelandii* (Colnaghi et al, Microbiology, 2001, 147:5, 1267-76). Приведенные мутантные GS обладают уровнем активности природного фермента. Но в настоящее время нет сообщений об использовании мутантной GS, не способной к аденилированию, для продукции аминокислот.

Описание изобретения

В настоящем изобретении описывается конструирование мутантного и высокоактивного фермента, играющего ключевую роль в биосинтезе глутамина и аргинина в *E.coli*.

В настоящем изобретении описывается замена кодона TAT, кодирующего тирозин в положении 397 белка GS, на кодон TTT, кодирующий аминокислотный остаток фенилаланина, в гене *glnA*. Замена указанного аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности приводит к экспрессии мутантного белка, не способного к аденилированию, причем уровень его активности соответствует уровню активности природного белка. Было установлено, что GS, мутированная, как описано выше, становится нечувствительной к непрямоу (опосредованному) ингибированию глутамином. Затем авторы настоящего изобретения обнаружили, что бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, - продуцент глутаминовой кислоты, трансформированная с помощью ДНК, содержащей такой мутантный ген, становится способной к продукции глутамина. Таким образом было совершено настоящее изобретение.

Настоящее изобретение включает в себя следующее:

(1). Глутаминсинтетаза, состоящая из последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1, в которой остаток тирозина, соответствующий положению 397 в последовательности под номером 1, заменен на остаток любой другой аминокислоты;

(2). Глутаминсинтетаза в соответствии с (1), которая состоит из последовательности аминокислот, включающей делеции, замены, вставки и добавления одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких положениях, отличных от положения 397, в последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1;

(3). Глутаминсинтетаза в соответствии с (1) или (2), в которой остаток, соответствующий положению 397 в последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1, заменен на фенилаланин;

(4). Глутаминсинтетаза в соответствии с (1)-(3), которая является глутаминсинтетазой

из *Escherichia coli*;

(5). ДНК, кодирующая глутаминсинтетазу в соответствии с любым из (1)-(4);

(6). Бактерия, трансформированная с помощью ДНК в соответствии с (5);

(7). Бактерия в соответствии с (6), принадлежащая к роду *Escherichia*;

(8). Бактерия в соответствии с (7), обладающая способностью к продукции L-аминокислот.

(9). Способ получения L-аминокислоты, включающий стадии:

- выращивания бактерии в соответствии с (6)-(8) в питательной среде с целью продукции и накопления L-аминокислоты в питательной среде, и

- выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости.

(10). Способ в соответствии с (9), в котором L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-глутамин, L-аргинина, L-триптофана, L-гистидина, L-глутамата.

(11). Способ в соответствии с (10), в котором L-аминокислотой является L-глутамин.

Описанная выше GS, содержащая замену остатка тирозина, соответствующего положению 397 в последовательности под номером 1 в Списке последовательностей, упоминается как "мутантная GS". ДНК, кодирующая мутантную GS, упоминается как "мутантный ген *glnA*", а GS, не содержащая замен, упоминается как "природная GS". Далее настоящее изобретение более детально будет описано ниже.

<1> Мутантная GS и мутантный ген *glnA*.

Известно, что тирозин в положении 397 является местом аденилирования GS (нумерация остатков аминокислот указанного фермента приводится в соответствии с G.Colombo и J.J.Villafranca. J.Biol. Chem., Vol.261. Issue 23, 10587-10591, 1986). Аденилирование GS приводит к инактивации фермента. Замена аминокислотного остатка, соответствующего тирозину в положении 397, любой другой аминокислотой, предпочтительно фенилаланином, в последовательности аминокислот природной GS приводит к образованию мутантного белка с уровнем активности природного белка и не способного к аденилированию. Мутантная GS становится нечувствительной к непрямому (опосредованному) ингибированию глутамином.

Мутантная GS может быть получена на основе последовательности природного гена *glnA* путем введения мутаций с использованием обычных методов. В качестве природного гена *glnA* может быть упомянут ген *glnA* из *E.coli* (нуклеотиды с 6558 по 7967 в последовательности AE000462 U00096 в базе данных GenBank, SEQ ID NO:2).

Мутантная GS может содержать делеции, замены, вставки и добавления одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких положениях, кроме положения 397, при условии, что активность GS не нарушается. Термин "активность GS" означает активность по катализу реакции образования глутамин из глутамата и аммиака с использованием ATP.

Число "нескольких" аминокислот различно в зависимости от положения или типа остатка аминокислоты в трехмерной структуре белка.

Это объясняется следующими причинами. Например, некоторые аминокислоты являются в достаточной степени взаимозаменяемыми и отличия в этих аминокислотах не влияют в значительной степени на трехмерную структуру белка. Следовательно, мутантной GS согласно настоящему изобретению может быть мутантная GS, у которой степень гомологии не ниже чем 30-50%, предпочтительно 50-70%, по отношению ко всем остаткам аминокислот, составляющим GS согласно настоящему изобретению, и которая обладает активностью GS.

В настоящем изобретении "последовательность аминокислот, соответствующая положению 397" означает последовательность аминокислот, соответствующую последовательности аминокислот в положении 397 в последовательности аминокислот под номером 1 (SEQ ID NO:1). Положение остатка аминокислоты может быть изменено. Например, если какой-либо остаток аминокислоты добавлен в N-концевой участок, то остаток аминокислоты, находившийся ранее в положении 397, оказывается в положении 398. В таком случае остаток аминокислоты, соответствующий первоначальному положению 397, рассматривается как остаток аминокислоты в положении 397 согласно настоящему изобретению.

ДНК, кодирующая практически такой же белок, как мутантная GS, описанная выше, может быть получена, например, путем модификации последовательности нуклеотидов методом сайт-специфического мутагенеза таким образом, что белок, кодируемый подобной ДНК, будет в определенном положении содержать делеции, замены, вставки или добавления одного или нескольких остатков аминокислот. ДНК, модифицированная описанным выше способом, может быть получена традиционными способами мутагенеза.

К делециям, заменам, вставкам или добавлениям нуклеотидов, описанным выше, относятся мутации, которые встречаются в природных условиях (мутанты или варианты), например, в случае индивидуальных или родовых и видовых различий бактерий, содержащих GS.

<2> Бактерия согласно настоящему изобретению, принадлежащая к роду *Escherichia*.

Бактерией, принадлежащей к роду *Escherichia*, согласно настоящему изобретению является бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, в которую введен мутантный ген *glnA*, описанный выше. Примером бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, является *E.coli*. Мутантный ген *glnA* может быть введен, например, путем трансформации бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, рекомбинантной плазмидой, содержащей вектор, функционирующий в бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, и мутантный ген *glnA*. Мутантный ген *glnA* также может быть введен заменой гена *glnA* в хромосоме на мутантный ген *glnA*.

Примерами векторов, которые можно использовать для введения мутантного гена *glnA*, являются плазмидные векторы, такие как pMW118, pBR322, pUC19 или подобные

им, фаговые векторы, такие как 11059, 1BF101, M13mp9 или подобные им, и транспозоны, такие как Mu, Tn10, Tn5 или подобные им.

Введение ДНК в бактерию, принадлежащую к роду *Escherichia*, может быть осуществлено, например, по методу D.A.Morrison (Methods in Enzymology, 68, 326 (1979)) или методом, в котором бактериальная клетка - реципиент обрабатывается хлоридом кальция для увеличения проницаемости для ДНК (Mandel, M. and Higa, A., J.Mol.Biol. 53, 159 (1970)) или подобным им методом.

Бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, которые обладают способностью к продукции значительных количеств L-глутамин, к настоящему времени описано не было. Отмечалось, что выращивание штамма *E.coli* K-12 в питательной среде, содержащей более 10 весовых частей азота на 100 весовых частей углерода, приводит к накоплению 0,36 мг/мл L-глутамин (патент Великобритании № 1113117). Таким образом, продуцируемое количество L-глутамин может быть увеличено путем введения мутантного гена *glnA* в бактерию дикого типа, принадлежащую к роду *Escherichia*, и экскретирующую глутамин.

Примерами бактерий, принадлежащих к другим родам, обладающих способностью к продукции L-глутамин, являются *Brevibacterium flavum* FERM-P 4272, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Microbacterium flavum* FERM-BP 664 (AJ 3684), *Brevibacterium flavum* FERM-BP 662 (AJ 3409), *Corynebacterium acetoglulamicum* ATCC 13870, *Corynebacterium glutamicum* FERM-BP 663 (AJ 3682) (патент США 5164307).

Количество продуцируемого L-глутамин может быть увеличено путем введения мутантного гена *glnA* в бактерию, принадлежащую к роду *Escherichia*, - продуцент глутаминовой кислоты.

Примерами бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, обладающих способностью к продукции L-глутаминовой кислоты, являются следующие штаммы *E.coli*: штаммы, обладающие устойчивостью к антиметаболитам аспарагиновой кислоты, и дефицитные по активности альфа-кетоглутаратдегидрогеназы, такие как AF13199 (FERM BP-5807) (патент США 5908768), или штамм FERM P-12379 дополнительно имеющий низкую активность по разложению L-глутаминовой кислоты (патент США 5393671); штамм *E.coli* AJ13138 (FERM BP-5565) (патент США 6110714) и подобные им.

Примерами бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, обладающих способностью к продукции L-аргинина, являются штамм *E.coli* 237 (ВКПМ В-7925) (Российская патентная заявка 2000116481), штаммы продуценты аргинина, в которые введен ген *argA*, кодирующий N-ацетилглутаматсинтетазу (выложенная заявка Японии № 57-5693) и подобные им.

Примерами бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, обладающих способностью к продукции L-триптофана, являются штаммы *E.coli* - производные штамма Genesoc JB102/pBE7, содержащие триптофановый оперон, ген *aroG* и ген *serA* из *E.coli* (патент США 5939295), штаммы *E.coli*

DSM10118, DSM 10121, DSM10122, DSM10123 (патент США 5756345), штамм *E.coli* SV164 (pGH5) (EP1149911A2), штаммы *E.coli* NRRL B-12257-NRRL B-12264 (патент США 4371614) и подобные им.

5 Примерами бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, обладающих способностью к продукции L-гистидина, являются штаммы *E.coli* NRRL B-12116, NRRL B-12118, NRRL B-12119, NRRL B-12120, NRRL B-12121 (патент США 4388405) и подобные им.

10 <3> Способы получения L-аминокислот. К способам согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-аминокислоты, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью 15 продукции и накопления L-аминокислоты в указанной питательной среде, и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости.

20 Как детально объяснено в нижеследующих примерах, к способу согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-глутамин, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления 25 L-глутамин в указанной питательной среде, и выделения L-глутамин из культуральной жидкости.

Глутамин является донором азота в синтезе пуринов и пиримидинов, а также некоторых аминокислот, таких как L-аргинин, L-триптофан, L-гистидин и L-глутамат. В биосинтезе аргинина глутамин играет значительную роль, поскольку является единственным физиологическим донором аминокислотной группы в синтезе карбамоилфосфата - общего предшественника для аргинина и пиримидинов. При образовании триптофана глутамин используется в первой реакции биосинтеза триптофана, заключающейся в конверсии хоризмата и глутамин в антранилат, глутамин и пируват. Глутамин-зависимая аспарагинсинтетаза использует глутамин вместе с аспаратом и АТФ в главном пути биосинтеза аспарагина. В имидазольном кольце гистидина азот 3 40 получается из глутамин. И наконец, глутамин используется глутаматоксоглутарат аминотрансферазой (глутамат синтазой) (GOGAT) в синтезе глутамата. В случае, когда 45 пути биосинтеза вышеперечисленных аминокислот оптимизированы для их продукции, доступность глутамин становится одним из лимитирующих факторов. Исходя из 50 вышесказанного, увеличение способности микроорганизма к продукции L-глутамин также приводит к увеличению способности микроорганизма к продукции L-аргинина, L-триптофана, L-гистидина и L-глутамата. Поэтому к способам согласно настоящему изобретению относится способ продукции 55 L-аргинина, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления L-аргинина в указанной питательной среде, и выделения L-аргинина из культуральной жидкости. Также к способам согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-триптофана, включающий стадии 60 выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления L-триптофана в

указанной питательной среде, и выделения L-триптофана из культуральной жидкости. Также к способам согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-гистидина, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления L-гистидина в указанной питательной среде, и выделения L-гистидина из культуральной жидкости. И к способам согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-глутамата, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления L-глутамата в указанной питательной среде, и выделения L-глутамата из культуральной жидкости.

В способе согласно настоящему изобретению выращивание бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, сбор и очистка L-глутамата из культуральной жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых L-глутамин продуцируется с использованием бактерии. Также в способе согласно настоящему изобретению выращивание бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, сбор и очистка L-аргинина из культуральной жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых L-аргинин продуцируется с использованием бактерии. Также в способе согласно настоящему изобретению выращивание бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, сбор и очистка L-триптофана из культуральной жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых L-триптофан продуцируется с использованием бактерии. Также в способе согласно настоящему изобретению выращивание бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, сбор и очистка L-гистидина из культуральной жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых L-гистидин продуцируется с использованием бактерии. Также в способе согласно настоящему изобретению выращивание бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, сбор и очистка L-глутамата из культуральной жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых L-глутамат продуцируется с использованием бактерии.

Питательная среда, используемая для выращивания, может быть как синтетической, так и натуральной, при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, минеральные добавки и, если необходимо, соответствующее количество питательных добавок, которые требуются микроорганизму для роста. К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, и различные органические кислоты. В зависимости от степени ассимиляции используемого микроорганизма могут использоваться спирты, такие как этанол и глицерин. В качестве источника азота могут использоваться аммиак, различные соли аммония, такие как сульфат аммония, другие

соединения азота, такие как амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов и ферментализат микроорганизмов. В качестве минеральных добавок используются монофосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция. Некоторые питательные добавки могут быть добавлены в питательную среду, если необходимо. Например, если микроорганизму для роста необходим изолейцин (ауксотрофия по изолейцину), подходящее количество изолейцина может быть добавлено в питательную среду для ферментации.

Выращивание осуществляется предпочтительно в аэробных условиях, таких как перемешивание, ферментация с аэрацией, при температуре от 20 до 40°C, предпочтительно от 30 до 38°C. Обычно выращивание осуществляют при pH питательной среды в пределах от 5 до 9, предпочтительно от 6,5 до 7,2. pH среды может регулироваться аммиаком, карбонатом кальция, различными кислотами, основаниями и буферами. Обычно выращивание в течение от 1 до 3 дней приводит к накоплению целевой L-аминокислоты в культуральной жидкости.

Выделение L-глутамата после выращивания может быть осуществлено путем удаления из культуральной жидкости твердых остатков, такие как клетки, методом центрифугирования или фильтрацией, а затем L-глутамин может быть собран и очищен методами ионообменной хроматографии, концентрирования и кристаллизации или подобными им.

Краткое описание чертежа.

На чертеже показано относительное положение затравок SEQ ID NO:3, 4 и 5, использованных в ПУР при получении матунтного гена *glnA*.

Наилучший способ осуществления изобретения

Настоящее изобретение более детально описано со ссылкой на следующие примеры.

Пример 1. Клонирование мутантного реагента *glnA*.

Природный ген *glnA* был получен методом амплификации с помощью ПЦР и клонирован в вектор pMW118. Полученная плазмида была названа pMWglnA12. Хромосомная ДНК штамма *E.coli* K-12 была использована в качестве матрицы, олигонуклеотиды, приведенные в Списке последовательностей под номерами 3 и 4, использовались в качестве затравок. ПЦР проводили следующим образом: предварительная обработка при 94°C в течение 5 мин, затем 40 циклов при 55°C в течение 30 сек, 72°C в течение 2 мин и 93°C в течение 30 сек. Полученный таким образом продукт ПЦР был обработан рестриктазами *Xba*I и *Hind*III и лигирован в вектор pMW118, предварительно обработанный теми же рестриктазами. Полученная плазмида была названа pMWglnA12. Для замены кодона TAT, кодирующего тирозин-397 в белке GS, кодоном TTT, кодирующим фенилаланин, была использована процедура сайт-направленного мутагенеза. Плазмида pMWglnA12, содержащая природный ген *glnA*, использовалась в качестве матрицы, олигонуклеотиды, приведенные в Списке

последовательностей под номерами 4 и 5, использовались в качестве затравок. ПЦР проводили следующим образом: 55°C в течение 30 сек, 72°C в течение 1 мин и 94°C в течение 30 сек, 25 циклов. Полученный таким образом продукт ПЦР был обработан рестриктазами NcoI и HindIII и лигирован в плазмиду pMWglnA12, предварительно обработанную теми же рестриктазами. Полученная плаزمид была названа pMWglnAphe-4.

Пример 2. Конструирование штамма, дефицитного по *ilvA*, - производного штамма *E. coli* K-12, содержащего мутацию в гене *ilvA*.

Штамм VL334 (ВКПМ В-1641) является штаммом, ауксотрофным по изолейцину и треонину, содержащим мутации в генах *thrC* и *ilvA* (патент США 4278765). Аллель дикого типа гена *thrC* был перенесен методом общей трансдукции с использованием бактериофага P1, выращенного на природном штамме *E. coli* K-12 (ВКПМ В-7). В результате был получен штамм VL334*thrC*⁺.

Затем плазмид pMWglnAphe-4 была введена в клетки штамма VL334*thrC*⁺. Полученный штамм был назван VL334*thrC*⁺/pMWglnAphe-4. В качестве контроля плазмид pMWglnA12 также была введена в клетки штамма VL334*thrC*⁺. Полученный штамм был назван VL334*thrC*⁺/pMWglnA12.

Пример 3. Продукция глутамин и глутаминовой кислоты штаммом, содержащим мутантный ген *glnA*, при ферментации в пробирках.

Условия выращивания при ферментации в пробирках были следующие. Питательная среда для ферментации содержала 60 г/л глюкозы, 35 г/л сульфата аммония, 2 г/л K₂HPO₄, 1 г/л MgSO₄, 0,1 мг/л тиамин, 50 мг/л L-изолейцина, 5 г/л дрожжевого экстракта Difco, 25 г/л мела (рН 7,2). Глюкоза и мел стерилизовались отдельно. 2 мл питательной среды помещались в пробирку, засеивались одной петлей тестируемых микроорганизмов, и выращивание продолжалось при 37°C в течение 2 дней с перемешиванием. Накопленное в культуральной жидкости количество глутамин и глутаминовой кислоты было определено с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). Состав подвижной фазы для ТСХ: изопропанол: этилацетат: NH₄OH: H₂O=16:8:5:10 (v/v). Результаты приведены в таблице.

Штамм	Накопление глутаминовой кислоты, мг/л	Накопление глутамин, г/л
VL334 <i>thrC</i> ⁺	12,0	0
VL334 <i>thrC</i> ⁺ /pMWglnA12	7,5	0
VL334 <i>thrC</i> ⁺ /pMWglnAphe-4	1,3	1,3

Как видно из таблицы, штамм VL334*thrC*⁺/pMWglnAphe-4, содержащий мутантный ген *glnA*, приобрел способность к

продукции L-глутамин.

Формула изобретения:

1. Мутантная глутаминсинтетаза, описанная в пункте (А) или (В): (А) глутаминсинтетаза, состоящая из последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1, в которой остаток тирозина, соответствующий положению 397 в последовательности под номером 1, заменен на остаток любой другой аминокислоты; (В) глутаминсинтетаза, состоящая из последовательности аминокислот, включающей делеции, замены, вставки и добавления одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких положениях, отличных от положения 397, в последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1, при этом остаток тирозина, соответствующий положению 397 в последовательности под номером 1, заменен на остаток любой другой аминокислоты.

2. Мутантная глутаминсинтетаза по п.1, отличающаяся тем, что в такой глутаминсинтетазе остаток, соответствующий положению 397 в последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1, заменен на фенилаланин.

3. Мутантная глутаминсинтетаза по п.1 или 2, отличающаяся тем, что такой глутаминсинтетазой является глутаминсинтетаза из *Escherichia coli*.

4. Фрагмент ДНК, кодирующий глутаминсинтетазу по любому из пп. 1-3.

5. Штамм *Escherichia coli* VL334*thrC*⁺/pMWglnAphe-4, трансформированный фрагментом ДНК, кодирующим мутантную глутаминсинтетазу, в которой остаток, соответствующий положению 397 в последовательности аминокислот, приведенной в Списке последовательностей под номером 1, заменен на фенилаланин, - продуцент L-глутамин.

6. Способ получения L-аминокислоты методом ферментации, включающий стадии выращивания штамма бактерии *Escherichia coli* - продуцента L-аминокислоты в питательной среде и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости, отличающийся тем, что в качестве штамма - продуцента используют штамм, трансформированный фрагментом ДНК по п.4.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-глутамин, L-аргинина, L-триптофана, L-гистидина, L-глутамата.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что такой L-аминокислотой является L-глутамин.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что в качестве штамма продуцента L-глутамин используют штамм *Escherichia coli* VL334*thrC*⁺/pMWglnAphe-4.

60

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ajinomoto-Genetika Research Institute

<120> NEW MUTANT GLUTAMINE SYNTHETASE AND METHOD FOR PRODUCING AMINO ACIDS.

<130>

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 468

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Ser	Ala	Glu	His	Val	Leu	Thr	Met	Leu	Asn	Glu	His	Glu	Val	Lys	Phe
1				5				10						15	
Val	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asp	Thr	Lys	Gly	Lys	Glu	Gln	His	Val	Thr
			20					25					30		
Ile	Pro	Ala	His	Gln	Val	Asn	Ala	Glu	Phe	Phe	Glu	Glu	Gly	Lys	Met
		35				40						45			
Phe	Asp	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Gly	Trp	Lys	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Asp
	50					55					60				
Met	Val	Leu	Met	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Asp	Pro	Phe	Phe
	65				70					75					80
Ala	Asp	Ser	Thr	Leu	Ile	Ile	Arg	Cys	Asp	Ile	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr
				85					90					95	
Leu	Gln	Gly	Tyr	Asp	Arg	Asp	Pro	Arg	Ser	Ile	Ala	Lys	Arg	Ala	Glu
			100					105					110		
Asp	Tyr	Leu	Arg	Ser	Thr	Gly	Ile	Ala	Asp	Thr	Val	Leu	Phe	Gly	Pro
		115					120					125			
Glu	Pro	Glu	Phe	Phe	Leu	Phe	Asp	Asp	Ile	Arg	Phe	Gly	Ser	Ser	Ile
	130					135					140				
Ser	Gly	Ser	His	Val	Ala	Ile	Asp	Asp	Ile	Glu	Gly	Ala	Trp	Asn	Ser
	145				150					155				160	
Ser	Thr	Gln	Tyr	Glu	Gly	Gly	Asn	Lys	Gly	His	Arg	Pro	Ala	Val	Lys
				165					170					175	
Gly	Gly	Tyr	Phe	Pro	Val	Pro	Pro	Val	Asp	Ser	Ala	Gln	Asp	Ile	Arg
			180					185					190		
Ser	Glu	Met	Cys	Leu	Val	Met	Glu	Gln	Met	Gly	Leu	Val	Val	Glu	Ala
		195					200					205			

RU 2230114 C2

RU 2230114 C2

His His His Glu Val Ala Thr Ala Gly Gln Asn Glu Val Ala Thr Arg
 210 215 220
 Phe Asn Thr Met Thr Lys Lys Ala Asp Glu Ile Gln Ile Tyr Lys Tyr
 225 230 235 240
 Val Val His Asn Val Ala His Arg Phe Gly Lys Thr Ala Thr Phe Met
 245 250 255
 Pro Lys Pro Met Phe Gly Asp Asn Gly Ser Gly Met His Cys His Met
 260 265 270
 Ser Leu Ser Lys Asn Gly Val Asn Leu Phe Ala Gly Asp Lys Tyr Ala
 275 280 285
 Gly Leu Ser Glu Gln Ala Leu Tyr Tyr Ile Gly Gly Val Ile Lys His
 290 295 300
 Ala Lys Ala Ile Asn Ala Leu Ala Asn Pro Thr Thr Asn Ser Tyr Lys
 305 310 315 320
 Arg Leu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Pro Val Met Leu Ala Tyr Ser Ala
 325 330 335
 Arg Asn Arg Ser Ala Ser Ile Arg Ile Pro Val Val Ser Ser Pro Lys
 340 345 350
 Ala Arg Arg Ile Glu Val Arg Phe Pro Asp Pro Ala Ala Asn Pro Tyr
 355 360 365
 Leu Cys Phe Ala Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn
 370 375 380
 Lys Ile His Pro Gly Glu Ala Met Asp Lys Asn Leu Tyr Asp Leu Pro
 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Ala Lys Glu Ile Pro Gln Val Ala Gly Ser Leu Glu Glu
 405 410 415
 Ala Leu Asn Glu Leu Asp Leu Asp Arg Glu Phe Leu Lys Ala Gly Gly
 420 425 430
 Val Phe Thr Asp Glu Ala Ile Asp Ala Tyr Ile Ala Leu Arg Arg Glu
 435 440 445
 Glu Asp Asp Arg Val Arg Met Thr Pro His Pro Val Glu Phe Glu Leu
 450 455 460
 Tyr Tyr Ser Val
 465

<210> 2
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 2
 atgtccgctg aacacgtact gacgatgctg aacgagcagc aagtgaagtt tgttgatttg 60
 cgcttcaccg atactaaagg taaagaacag cagctcacta tccttgctca tcaggtgaat 120
 gctgaattct tcgaagaagg caaatgttt gacggctcct cgattggcgg ctggaaaggc 180

```

attaacgagt ccgacatggt gctgatgcca gacgcatcca cgcagtgat tgacccggtc 240
ttcgccgact ccaccctgat taccogttgc gacatccttg aacctggcac cctgcaagge 300
tatgaccgtg acccgcgctc cattgccaag cgcgcggaag attacctggc ttccactggc 360
attgcccaca ccgtactggt cgggccagaa cctgaattct tctgttcca tgacatccgt 420
ttcggatcat ctatctccgg ttcccacggt gctatcgacg atatcgaagg cgcattggaac 480
tctccacccc aatacgaagg tggtaacaaa ggtcacgctc cggcagtgaaggggcggttac 540
ttcccgggtc caccggtaga ctccggctcag gatattcggt ctgaaatgtg tctgggtgatg 600
gaacagatgg gtctgggtgg tgaagcccat caccacgaag tagcgactgc tggtcagaac 660
gaagtggcta cccgottcaa taccatgacc aaaaaagctg acgaaattca gatctacaaa 720
tatgttgtgc acaacgtagc gcaccogtto ggtaaaaccg cgacctttat gccaaaaccg 780
atgttcgggtg ataacggctc cggtatgcac tgccacatgt ctctgtctaa aaacggcggt 840
aacctgttcg caggcgacaa atacgcaggt ctgtctgagc aggcgctgta ctacattggc 900
ggcgtaatca aacacgctaa agcgattaac gccctggcaa acccgaccac caactcttat 960
aagcgtctgg tcccgggcta tgaagcaccg gtaatgctgg cttactctgc gcgtaaccgt 1020
tctgcgtcta tccgtattcc ggtggtttot tctccgaaag cacgtcgtat cgaagtacgt 1080
ttcccggatc cggcagctaa cccgtacctg tgctttgctg cctgtctgat ggccgggtctt 1140
gatggtatca agaacaagat ccaccggggc gaagccatgg acaaaaaacct gtatgacctg 1200
ccgccagaag aagcgaaga gatcccacag gttgcaggct ctctggaaga agcactgaac 1260
gaactggatc tggaccgcga gttcctgaaa gccgggtggcg tgttactga cgaagcaatt 1320
gatgcgtaca tcgctctgcg tcgcgaagaa gatgaccgcg tgcgtatgac tccgcatccg 1380
gtagagtttg agctgtacta cagcgtctaa 1410

```

```

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

```

```

<400> 3
attctagatt tcgttaccac gacgacc 27

```

```

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

```

```

<400> 4
ataagcttca cgttggagag cgactc 26

```

```

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

```

```

<400> 5
gcgaagccat ggacaaaaac ctgtttgacc tgccgc 36

```

RU 2230114 C2

RU 2230114 C2