



(51) МПК
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01)

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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2006118967/13, 01.06.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.06.2006

(43) Дата публикации заявки: **10.12.2007**

(45) Опубликовано: **20.06.2009** Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **STOUT V et al. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. J Bacteriol. 1991 Mar; 173(5): 1738-47. EBEL W. et al. Escherichia coli RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions To activate its own expression. J Bacteriol. 1999 Jan; 181(2): 577-84. EP 0301572, 01.02.1989. SU 1694643 A1, 30.11.1987.**

Адрес для переписки:
117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1, корп. 1, ЗАО АГРИ, пат.пов. В.М. Белкову, рег.№913

(72) Автор(ы):

**Филиппов Дмитрий Владимирович (RU),
 Ворошилова Эльвира Борисовна (RU),
 Гусятинер Михаил Маркович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Закрытое акционерное общество
 "Научно-исследовательский институт
 Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ) (RU)**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-ТРЕОНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИИ, ПРИНАДЛЕЖАЩЕЙ К РОДУ Escherichia, В КОТОРОЙ ИНАКТИВИРОВАН ГЕН rcsA

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду Escherichia, которая

модифицирована таким образом, что ген rcsA в указанной бактерии инактивирован. Изобретение позволяет получать L-треонин с высокой степенью эффективности. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006118967/13, 01.06.2006**

(24) Effective date for property rights:
01.06.2006

(43) Application published: **10.12.2007**

(45) Date of publication: **20.06.2009 Bull. 17**

Mail address:
**117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, korp. 1,
ZAO AGRI, pat.pov. V.M. Belkovu, reg.№913**

(72) Inventor(s):

**Filippov Dmitrij Vladimirovich (RU),
Voroshilova Ehl'vira Borisovna (RU),
Gusjatiner Mikhail Markovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Nauchno-
issledovatel'skij institut Adzhinomoto-Genetika"
(ZAO AGRI) (RU)**

(54) **METHOD FOR OBTAINING L-THREONINE USING BACTERIUM RELATING TO Escherichia, IN WHICH rcsA GENE IS INACTIVATED**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and represents the method for obtaining L-threonine using the bacterium relating to Escherichia, which is

modified so that rcsA gene is inactivated in the above bacterium.

EFFECT: invention allows obtaining L-threonine with high efficiency degree.

3 cl, 2 dwg, 2 tbl, 11 ex

RU 2 3 5 9 0 2 9 C 2

RU 2 3 5 9 0 2 9 C 2

Область техники

Настоящее изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к способу получения L-аминокислоты с использованием бактерии семейства Enterobacteriaceae, модифицированной таким образом, что экспрессия гена *rcsA* в указанной бактерии ослаблена.

Описание предшествующего уровня техники

Традиционно L-аминокислоты в промышленном масштабе могут быть получены методом ферментации с использованием штаммов микроорганизмов, полученных из природных источников, или их мутантов, специально модифицированных для того, чтобы увеличить продукцию L-аминокислот.

Описано множество методов увеличения продукции L-аминокислот, например, путем трансформации микроорганизма рекомбинантной ДНК (см., например, патент США 4278765). Другие методы основаны на повышении активности ферментов, вовлеченных в биосинтез аминокислот, и/или уменьшении чувствительности целевого фермента к обратному ингибированию продуцируемой L-аминокислотой (см., например, патенты США 4346170; 5661012 и 6040160).

Другим методом увеличения продукции L-аминокислот является ослабление экспрессии одного или нескольких генов, вовлеченных в деградацию целевой L-аминокислоты; генов, экспрессия которых ведет к отвлечению предшественников целевой аминокислоты от пути биосинтеза L-аминокислоты; генов, вовлеченных в перераспределение потоков углерода, азота и фосфора; генов, кодирующих токсины и т.д.

Ген *rcsA* кодирует белок RcsA, нестабильный позитивный регулятор, требуемый для синтеза колановой кислоты полисахарида капсулы в *Escherichia coli*. Деградация белка RcsA *in vivo* зависит от АТФ-зависимой Lon протеазы. Последовательности ДНК и белка в высокой степени гомологичны гену *rcsA* и белку *Klebsiella pneumoniae* и других организмов. Область С-конца RcsA содержит вероятный элемент связывания с ДНК в области «спираль-поворот-спираль», который напоминает последовательность, найденную в области С-конца RcsB, другого позитивного регулятора синтеза капсулы, и в нескольких других транскрипционных регуляторах, включая члены семейства LuxR. Стабильность RcsA дикого типа *in vivo* увеличивается при наличии множества копий RcsB, в то время как деградирует RcsA быстрее в мутантном по *rcsB* хозяине, чем в хозяине дикого типа. Эти результаты позволяют предположить, что RcsA и RcsB взаимодействуют *in vivo*, и согласуются с генетическими экспериментами, которые указывают на взаимодействие между RcsA и RcsB (Stout, V. et.al., J Bacteriol. 1991 March; 173(5): 1738-1747)).

Показано, что RcsA функционирует как активатор собственной экспрессии, поскольку выявлено 100-кратное увеличение экспрессии *rcsA::lacZ* транскрипционного гибрида в штаммах с высоким уровнем белка RcsA, либо благодаря мутации в *lon*, либо благодаря сверхэкспрессии RcsA с мультикопийной плазмиды. Экспрессия *rcsA::lacZ* гибрида увеличивается в отсутствие RcsB. Кроме того, воздействие H-NS, гистоноподобного белка, и RcsB на экспрессию *rcsA* не зависят друг от друга. Последовательность, консервативная для *cps* промотора *E.coli cps* и *ams* промотора *Erwinia amylovora* и, как показано ранее, являющаяся сайтом связывания RcsA-RcsB, была идентифицирована в области промотора *rcsA* и, как показано, требуется для высокого уровня экспрессии *rcsA*. (Ebel, W. and Trempe, J.E., J Bacteriol., 181(2): 577-84 (1999)).

Была исследована роль DnaJ, белка теплового шока, в деградации RcsA. В то

время как функциональный цикл RcsA в мутантном по *dnaJ* хозяине увеличен, накапливающийся белок RcsA в значительной степени агрегирован. Одновременная стабилизация и агрегация RcsA согласуются с моделью, в которой DnaJ (а также, возможно, DnaK и GrpE) действует как косвенный стимулятор протеолиза, способствуя поддержанию RcsA в растворимом виде. Влияние DnaJ на растворимость RcsA не ограничивается белком, сверхпродуцируемым при экспрессии гена, находящегося в составе плазмиды. Было обнаружено, что кодируемый геном на хромосоме белок RcsA в клетках *lon⁻* в основном находится в растворимом виде, но в клетках *lon⁻ dnaJ⁻* - в нерастворимом; более того, нерастворимость связана с неспособностью RcsA функционировать в мутантах по *dnaJ* (Jubete, Y., et.al., J. Biol. Chem., 271(48), 30798-803 (1996)).

Но в настоящее время нет сообщений, описывающих использование инактивации гена *rscA* с целью получения L-аминокислот.

Описание изобретения

Целями настоящего изобретения являются повышение продуктивности штаммов-продуцентов L-аминокислоты и предоставление способа получения L-аминокислоты с использованием этих штаммов.

Вышеупомянутые цели были достигнуты путем установления того факта, что ослабление экспрессии гена *rscA* может привести к повышению продукции L-аминокислот, таких как L-треонин, L-лизин, L-цистеин, L-метионин, L-лейцин, L-изолейцин, L-валин, L-гистидин, L-глицин, L-серин, L-аланин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-глутамин, L-глутаминовая кислота, L-пролин, L-аргинин, L-фенилаланин, L-тирозин и L-триптофан.

Настоящее изобретение предоставляет бактерию семейства Enterobacteriaceae, обладающую способностью к повышенной продукции аминокислот, таких как L-треонин, L-лизин, L-цистеин, L-метионин, L-лейцин, L-изолейцин, L-валин, L-гистидин, L-глицин, L-серин, L-аланин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-глутамин, L-глутаминовая кислота, L-пролин, L-аргинин, L-фенилаланин, L-тирозин и L-триптофан.

Целью настоящего изобретения является представление бактерии-продуцента L-аминокислоты семейства Enterobacteriaceae, модифицированной таким образом, что экспрессия гена *rscA* в указанной бактерии ослаблена.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, в которой ослабление экспрессии указанного гена *rscA* осуществлено путем инактивации указанного гена *rscA*.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом указанная бактерия принадлежит к роду *Escherichia*.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом указанная бактерия принадлежит к роду *Pantoea*.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом указанная L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из ароматической L-аминокислоты и неароматической L-аминокислоты.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом ароматическая L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом неароматическая L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-треонина, L-лизина, L-цистеина, L-метионина, L-лейцина, L-изолейцина,

L-валина, L-гистидина, L-глицина, L-серина, L-аланина, L-аспарагина, L-аспартата, L-глутамина, L-глутаминовой кислоты, L-пролина и L-аргинина.

Также целью настоящего изобретения является предоставление способа получения L-аминокислоты, который включает в себя:

- выращивание описанной выше бактерии в питательной среде с целью продукции и накопления L-аминокислоты в питательной среде, и
- выделение указанной L-аминокислоты из культуральной жидкости.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, при этом указанная L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из ароматической L-аминокислоты и неароматической L-аминокислоты.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, при этом указанная ароматическая L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, при этом указанная неароматическая L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-треонина, L-лизина, L-цистеина, L-метионина, L-лейцина, L-изолейцина, L-валина, L-гистидина, L-глицина, L-серина, L-аланина, L-аспарагина, L-аспартата, L-глутамина, L-глутаминовой кислоты, L-пролина и L-аргинина.

Более детально настоящее изобретение описано ниже.

Подробное описание наилучшего способа осуществления изобретения

1. Бактерия согласно настоящему изобретению

Бактерия согласно настоящему изобретению - это бактерия-продуцент L-аминокислоты семейства Enterobacteriaceae, модифицированная таким образом, что экспрессия гена rcsA в указанной бактерии ослаблена.

Согласно настоящему изобретению «бактерия-продуцент L-аминокислоты» означает бактерию, обладающую способностью к продукции и выделению L-аминокислоты в питательную среду, когда бактерия согласно настоящему изобретению выращивается в указанной питательной среде.

Используемый здесь термин «бактерия-продуцент L-аминокислоты» также означает бактерию, которая способна к продукции L-аминокислоты и вызывает накопление L-аминокислоты в ферментационной среде в больших количествах по сравнению с природным или родительским штаммом E.coli, таким как штамм E.coli K-12, и предпочтительно означает, что указанный микроорганизм способен накапливать в среде целевую L-аминокислоту в количестве не менее чем 0.5 г/л, более предпочтительно не менее чем 1.0 г/л. Термин «L-аминокислота» включает в себя L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновую кислоту, L-цистеин, L-глутаминовую кислоту, L-глутамин, L-глицин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин.

Термин «ароматическая L-аминокислота» включает в себя L-фенилаланин, L-тирозин и L-триптофан. Термин «неароматическая L-аминокислота» включает в себя L-треонин, L-лизин, L-цистеин, L-метионин, L-лейцин, L-изолейцин, L-валин, L-гистидин, L-глицин, L-серин, L-аланин, L-аспарагин, L-аспартат, L-глутамин, L-глутаминовую кислоту, L-пролин и L-аргинин. Наиболее предпочтительны L-треонин, L-лизин, L-цистеин, L-лейцин, L-гистидин, L-глутаминовая кислота, L-фенилаланин, L-триптофан, L-пролин и L-аргинин.

Семейство Enterobacteriaceae включает в себя бактерии, принадлежащие к

родам *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, *Yersinia* и т.д. Более конкретно, могут быть использованы бактерии, классифицируемые как принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae* в соответствии с таксономией, используемой в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Taxonomy/wgetorg?mode=Tree&id=1236&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>). Бактерия, принадлежащая к родам *Escherichia* или *Pantoea*, предпочтительна.

Термин «бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*» означает, что бактерия относится к роду *Escherichia* в соответствии с классификацией, известной специалисту в области микробиологии. В качестве примера микроорганизма, принадлежащего к роду *Escherichia*, использованного в настоящем изобретении, может быть упомянута бактерия *Escherichia coli* (*E. coli*).

Круг бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, не ограничен каким-либо образом, однако, например, бактерии, описанные в книге Neidhardt, F.C. et al. (*Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, Таблица 1), могут быть включены в число бактерий согласно настоящему изобретению.

Термин «бактерия, принадлежащая к роду *Pantoea*» означает, что бактерия относится к роду *Pantoea* в соответствии с классификацией, известной специалисту в области микробиологии. Недавно несколько видов *Enterobacter agglomerans* были классифицированы как *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* или подобные им, на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК и т.д. (*Int. J. Syst. Bacteriol*, 43, 162-173 (1993)).

Термин «бактерия модифицирована таким образом, что экспрессия гена *rcsA* ослаблена» означает, что указанная бактерия была модифицирована таким образом, что в результате модификации такая бактерия содержит пониженное количество белка *RcsA* по сравнению с немодифицированной бактерией, или модифицированная бактерия не способна синтезировать белок *RcsA*.

Термин «инактивация гена *rcsA*» означает, что указанный ген модифицирован таким образом, что такой модифицированный ген кодирует полностью неактивный белок. Также возможно, что естественная экспрессия модифицированного участка ДНК невозможна из-за делеции целевого гена или его части, сдвига рамки считывания данного гена, введения missense/nonsense мутации (мутаций) или модификации прилегающих к гену областей, которые включают последовательности, контролирующие экспрессию гена, такие как промотор(ы), энхансер(ы), аттенуатор(ы), сайт(ы) связывания рибосомы и т.д.

Уровень экспрессии гена можно оценить путем измерения количества мРНК, транскрибируемой с целевого гена, с использованием различных известных методик, включая гибридизацию по Нозерну (Northern blotting), количественный метод ОТ-ПЦР (RT-PCR) и подобные им. Количество белка, кодируемого данным геном, может быть измерено с помощью известных методов, включающих метод SDS-PAGE с последующим иммуноблоттингом (Western blotting) и подобные им.

Ген *rcsA* (синонимы - ECK1949, *cpsR*, b1951) кодирует белок *RcsA* (синонимы - *CpsR*, B 1951). Ген *rcsA* (номера нуклеотидов с 2,021,992 по 2,022,615 в нуклеотидной последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990; SEQ ID NO:1) расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между

геном *fliR* и геном *dsrB*. Нуклеотидная последовательность гена *gcsA* и соответствующая ей аминокислотная последовательность белка *RcsA*, кодируемого геном *gcsA*, приведены в Перечне последовательностей под номерами 1 (SEQ ID NO: 1) и 2 (SEQ ID NO:2) соответственно.

5 Поскольку у представителей различных родов и штаммов семейства *Enterobacteriaceae* возможны некоторые вариации в нуклеотидных последовательностях, понятие инактивируемого гена *gcsA* не ограничивается геном, последовательность которого приведена в Перечне последовательностей под
10 номером 1 (SEQ ID No:1), но также может включать и гомологичные ему гены, кодирующие варианты белка *RcsA*. Термин «вариант белка», как он используется в настоящем изобретении, означает белок с изменениями в последовательности, будь то делеции, вставки, добавления или замены аминокислот, при этом сохраняющий
15 активность белка *RcsA*. Количество изменений в варианте белка зависит от положения или типа аминокислотного остатка в третичной структуре белка. Возможно от 1 до 30, предпочтительно от 1 до 15, более предпочтительно от 1 до 5, изменений в последовательности, приведенной в Перечне последовательностей под номером 2 (SEQ ID No:2). Эти изменения в вариантах белка могут иметь место в
20 областях белка, которые не критичны для функционирования белка. Такие изменения допускаются благодаря тому, что некоторые аминокислоты имеют высокую гомологию друг к другу, поэтому такие изменения не влияют на третичную структуру или активность. Таким образом, вариант белка, кодируемого геном *gcsA*, может быть представлен белком с гомологией не менее 80%, предпочтительно не
25 менее 90% и наиболее предпочтительно не менее 95%, по отношению к полной аминокислотной последовательности, приведенной в Перечне последовательностей под номером 2 (SEQ ID NO.2).

Гомология между двумя аминокислотными последовательностями может быть
30 определена с использованием известных методов, например, компьютерной программы BLAST 2.0, которая считает три параметра: число аминокислот, идентичность и сходство.

Кроме того, ген *gcsA* может быть представлен вариантом, который гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, приведенной в Перечне
35 последовательностей под номером 1 (SEQ ID NO:1), или с зондом, который может быть синтезирован на основе указанной нуклеотидной последовательности, при условии, что указанный вариант кодирует функциональный белок *RcsA*. «Жесткие условия» включают такие условия, при которых специфические гибриды, например
40 гибриды со степенью гомологии не менее 60%, предпочтительно не менее 70%, более предпочтительно не менее 80%, еще более предпочтительно не менее 90%, наиболее предпочтительно не менее 95%, образуются, а неспецифические гибриды, например гибриды со степенью гомологии ниже вышеуказанной, не образуются. Практическим примером жестких условий является однократная отмывка,
45 предпочтительно двух- или трехкратная, при концентрации солей, соответствующей стандартным условиям отмывки при гибридизации по Саузерну, например, $1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS, предпочтительно $0.1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS, при 60°C. Продолжительность отмывки зависит от типа используемой для блоттинга
50 мембраны и, как правило, такова, как рекомендовано производителем. Например, рекомендуемая продолжительность отмывки для нейлоновой мембраны Hybond™ N+ (Amersham) при строгих условиях 15 минут. Предпочтительна двух-трехкратная отмывка. Длина зонда может быть выбрана в зависимости от условий гибридизации,

обычно она составляет от 100 п.н. до 1 т.п.н.

Экспрессия гена *rcsA* может быть ослаблена введением такой мутации в ген на хромосоме, что активность кодируемого геном белка снижена по сравнению с немодифицированным штаммом. Такой мутацией может быть перестановка одного или более оснований с целью получения аминокислотной замены в кодируемом геном белке («миссенс»-мутация), введение стоп-кодона («нонсенс»-мутация), делеция одного или нескольких оснований для сдвига рамки считывания, вставка гена устойчивости к антибиотику или делеция части гена или делеция гена полностью (Qiu, Z. and Goodman, M.F., J. Biol. Chem., 272, 8611-8617 (1997); Kwon, D.H. et al., J. Antimicrob. Chemother., 46, 793-796 (2000)). Экспрессия гена *rcsA* также может быть ослаблена модификацией регулирующей экспрессию последовательности, такой как промотор, последовательность Шайн-Дальгарно (SD) и т.д. (заявка РСТ WO 95/34672, Carrier, T.A. and Keasling, J.D., Biotechnol Prog 15, 58-64 (1999)).

Например, для введения мутации генной рекомбинацией могут применяться следующие методы. Конструируется мутантный ген, кодирующий мутантный белок со сниженной активностью, бактерия для модификации трансформируется фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме заменяется с использованием гомологичной рекомбинации мутантным геном, отбирается полученный штамм. Такое замещение гена с использованием гомологичной рекомбинации может быть проведено методом с использованием линейной ДНК, известным как "Red-зависимая интеграция" (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12, p 6640-6645 (2000), заявка РСТ WO 2005/010175), или методами с использованием плазмиды, репликация которой чувствительна к температуре (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97, 12, p.6640-6645 (2000), патенты США 6303383 и 5616480). Далее, введение сайт-специфической мутации генной заменой с использованием гомологичной рекомбинации, такой, как описано выше, также может быть проведено с использованием плазмиды, неспособной реплицироваться в клетке хозяина.

Экспрессия гена также может быть ослаблена вставкой в кодирующую область гена транспозона или IS-фактора (патент США 5175107) или такими традиционными методами, как мутагенез с использованием УФ-излучения или обработка нитрозогуанидином (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин).

Инактивация гена также может быть осуществлена традиционными методами, такими как мутагенез с использованием УФ-излучения или обработка нитрозогуанидином (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин), сайт-направленный мутагенез, разрушение гена с использованием гомологичной рекомбинации и/или мутагенеза вставкой-делецией (Yu, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12: 5978-83 и Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12: 6640-45), также называемого "Red-зависимая интеграция".

Присутствие белка RcsA может быть определено с использованием поликлональных антител методом, описанным в (Ebel, W. and Trempey, J.E., J Bacteriol., 181(2): 577-84 (1999)).

Присутствие или отсутствие гена *rcsA* на хромосоме бактерии может быть определено известными методами, включая ПЦР, блоттинг по Саузерну, и т.п. Кроме того, уровень экспрессии гена можно оценить измерением количества транскрибируемой с гена РНК с использованием известных методов, включая блоттинг по Нозерну, количественной ОТ-ПЦР и т.п. Количество или молекулярная масса белка, кодируемого геном, может быть измерено известными методами,

включая SDS-ПААГ-электрофорез с последующим иммуноблоттингом (Western blotting analysis) и т.п.

5 Методами получения плазмидной ДНК, разрезания и дотирования ДНК, трансформации, выбора олигонуклеотидов в качестве праймеров и подобными им могут являться обычные методы, хорошо известные специалисту в данной области. Эти методы описаны, например, в книге Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

10 Бактерия-продуцент L-аминокислоты

В качестве бактерии согласно настоящему изобретению, модифицированной таким образом, что экспрессия гена *gcsA* ослаблена, может быть использована бактерия, способная к продукции ароматической или неароматической L-аминокислоты.

15 Бактерия согласно настоящему изобретению может быть получена путем ослабления экспрессии гена *gcsA* в бактерии, уже обладающей способностью к продукции L-аминокислот. С другой стороны, бактерия согласно настоящему изобретению может быть получена путем придания бактерии, в которой экспрессия гена *gcsA* уже ослаблена, способности к продукции L-аминокислот.

20 Бактерия-продуцент L-треонина

Примеры родительского штамма для получения бактерии-продуцента L-треонина согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* TDH-6/pVIC40 (ВКПМ В-3996) (патенты США 5175107 и 5705371), штамм *E. coli* NRRL-21593 (патент США 5939307), штамм *E. coli* FERM BP-3756 (патент США 5474918), штаммы *E. coli* FERM BP-3519 и FERM BP-3520 (патент США 5376538), штамм *E. coli* MG442 (Гусятинер и др., Генетика, 14, 947-956 (1978)), штаммы *E. coli* VL643 и VL2055 (Европейская патентная заявка EP 1149911 A) и подобные им.

30 Штамм TDH-6 является дефектным по гену *thrC*, способен ассимилировать сахарозу и содержит ген *ilvA* с мутацией типа "leaky". Указанный штамм содержит мутацию в гене *rhtA*, которая обуславливает устойчивость к высоким концентрациям треонина и гомосерина. Штамм В-3996 содержит плазмиду pVIC40, которая была получена путем введения в вектор, производный от вектора RSF1010, оперона *thrA*BC*, включающего мутантный ген *thrA*, кодирующий аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I, у которой существенно снижена чувствительность к ингибированию треонином по типу обратной связи. Штамм В-3996 был депонирован 19 ноября 1987 года во Всесоюзном научном центре антибиотиков (РФ, 117105 Москва, Нагатинская ул., 3-А) с инвентарным номером РИА 1867. Указанный штамм также был депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (РФ, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) с инвентарным номером В-3996.

45 В качестве родительского штамма для получения бактерии-продуцента L-треонина согласно настоящему изобретению также может быть использован штамм *E. coli* ВКПМ В-5318 (Европейская заявка 0593792 В). Штамм В-5318 является прототрофным относительно изолейцина, регуляторная область треонинового оперона на плазмиде pVIC40 заменена чувствительным к температуре С1 репрессором фага λ и промотором PR. Штамм ВКПМ В-5318 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) 3 мая 1990 г. с инвентарным номером ВКПМ В-5318.

Предпочтительно, чтобы бактерия согласно настоящему изобретению была далее модифицирована таким образом, чтобы иметь повышенную экспрессию одного или нескольких следующих генов:

- мутантного гена *thrA*, кодирующего аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I, устойчивую к ингибированию треонином по типу обратной связи;
- гена *thrB*, кодирующего гомосеринкиназу;
- гена *thrC*, кодирующего треонинсинтазу;
- гена *rhtA*, предположительно кодирующего трансмембранный белок;
- гена *asd*, кодирующего аспартат-β-семиальдегиддегидрогеназу, и
- гена *aspC*, кодирующего аспартатаминотрансферазу (аспартаттрансаминазу).

Нуклеотидная последовательность гена *thrA*, кодирующего аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 337 по 2799 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrA* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между генами *thrL* и *thrB*. Нуклеотидная последовательность гена *thrB*, кодирующего гомосеринкиназу из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 2801 по 3733 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrB* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между генами *thrA* и *thrC*. Нуклеотидная последовательность гена *thrC*, кодирующего треонинсинтазу из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 3734 по 5020 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrC* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между геном *thrB* и открытой рамкой считывания *uaaX*. Все три указанных гена функционируют как один треониновый оперон. Для усиления экспрессии треонинового оперона область аттенюатора, влияющего на транскрипцию, удаляется из оперона (заявки PCT WO 2005/049808, WO 2003/097839).

Мутантный ген *thrA*, кодирующий аспартокиназу-гомосериндегидрогеназу I, устойчивую к ингибированию треонином по типу обратной связи, так же как и гены *thrB* и *thrC*, могут быть получены в виде единого оперона из хорошо известной плазмиды pVIC40, которая представлена в штамме-продуценте *E. coli* ВКПМ В-3996. Плазмида pVIC40 подробно описана в патенте США 5705371.

Ген *rhtA* расположен на 18 минуте хромосомы *E. coli* около оперона *glnHPQ*, который кодирует компоненты транспортной системы глутамина, ген *rhtA* идентичен ORF1 (ген *ybiF*, номера нуклеотидов с 764 по 1651 в последовательности с инвентарным номером AAA218541 в базе данных GenBank, gi:440181), расположен между генами *rexB* и *ompX*. Участок ДНК, экспрессирующийся с образованием белка, кодируемого рамкой считывания ORF1, был назван геном *rhtA* (*rht*: resistance to homoserine and threonine). Также было показано, что мутация *rhtA23* представляет собой замену А-на-Г в положении -1 по отношению к старт кодону ATG (ABSTRACTS of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjugation with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No.457, EP 1013765 A).

Нуклеотидная последовательность гена *asd* из *E. coli* известна (номера нуклеотидов с 3572511 по 3571408 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.1 в базе данных GenBank, gi:16131307) и может быть получена с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция; ссылка на White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)) с использованием праймеров, синтезированных на основе нуклеотидной последовательности указанного гена. Гены *asd* из других

микроорганизмов могут быть получены сходным образом.

Также нуклеотидная последовательность гена *aspC* из *E. coli* известна (номера нуклеотидов с 983742 по 984932 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.1 в базе данных GenBank, gi:16128895) и может быть получена с помощью ПЦР. Гены *aspC* из других микроорганизмов могут быть получены сходным образом.

Бактерия-продуцент L-лизина

Примеры бактерий-продуцентов L-лизина, принадлежащих к роду *Escherichia*, включают мутанты, обладающие устойчивостью к аналогу L-лизина. Аналог L-лизина ингибирует рост бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, но это ингибирование полностью или частично снимается, когда в среде также присутствует L-лизин. Примеры аналога L-лизина включают, но не ограничиваются оксализином, лизингидроксаматом, S-(2-аминоэтил)-L-цистеином (АЕС), γ -метиллизном, α -хлорокапролактамом и так далее. Мутанты, обладающие устойчивостью к указанным аналогам лизина, могут быть получены путем обработки бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, традиционными мутагенами. Конкретные примеры бактериальных штаммов, используемых для получения L-лизина, включают штамм *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; смотри патент США 4346170) и штамм *Escherichia coli* VL611. В этих микроорганизмах аспартокиназа устойчива к ингибированию L-лизином по принципу обратной связи.

Штамм WC196 может быть использован в качестве бактерии-продуцента L-лизина *Escherichia coli*. Данный бактериальный штамм был получен путем селекции фенотипа устойчивости к АЕС у штамма W3110, производного от штамма *Escherichia coli* K-12. Полученный штамм был назван *Escherichia coli* AJ13069 и был депонирован в Национальном Институте Биологических Наук и Человеческих Технологий, Агентство Промышленной Науки и Технологии (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology), в настоящее время называющийся Национальный Институт Прогрессивной Промышленной Науки и Технологии, Международный Депозитарий Организмов для Целей Патентования, Централ 6, 1-1, Хигаши 1-Чоме, Тсукуба-ши, Ибараки-кен, 305-8566, Япония (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository, Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan), 6 декабря 1994 года и получил инвентарный номер FERM P-14690. Затем было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора 29 сентября 1995 года, и штамм получил инвентарный номер FERM BP-5252 (смотри патент США 5827698).

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-лизина. Примеры ферментов, вовлеченных в биосинтез L-лизина, включают, но не ограничиваются ими, дигидродипиколинатсинтазу (*dapA*), аспартокиназу (*lysC*), дигидродипиколинатредуктазу (*dapB*), диаминопимелатдекарбоксилазу (*lysA*), диаминопимелатдегидрогеназу (*ddh*) (патент США. 6040160), фосфоенолпируваткарбоксилазу (*ppc*), аспартатсемиальдегиддегидрогеназу (*asd*), никотинамидадениндинуклеотидтрансгидрогеназу (*pntAB*) и аспартазу (*aspA*) (европейская заявка EP 1253195 A). Кроме того, родительские штаммы могут иметь

повышенный уровень экспрессии гена, вовлеченного в процесс дыхания (суо) (европейская заявка EP 1170376 A), гена, кодирующего никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназу (pntAB) (патент США 5830716), гена *ubjE* (заявка PCT WO 2005/073390) или комбинации этих генов.

5 Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых снижена или отсутствует активность ферментов, которые катализируют реакции образования отличных от L-лизина соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-лизина. Примеры ферментов, которые катализируют реакции образования отличных от L-лизина соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-лизина, включают гомосериндегидрогеназу, лизиндекарбоксилазу (патент США 5827698) и малатдегидрогеназу (заявка PCT WO 2005/010175).

Бактерия-продуцент L-цистеина

15 Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-цистеина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* JM15, трансформированный различными аллелями гена *cysE*, кодирующими устойчивые к ингибированию по типу обратной связи серинацетилтрансферазы (патент США 6218168, патентная заявка РФ 2003121601); штамм *E. coli* W3110, содержащий гены с повышенной экспрессией, кодирующие белок, способный к секреции соединений, токсичных для клетки (патент США 5972663); штаммы *E. coli*, содержащие цистеиндесульфогидразу со сниженной активностью (патент Японии JP 11155571 A2); штамм *E. coli* W3110 с повышенной активностью позитивного транскрипционного регулятора цистеинового регулона, кодируемого геном *cysB* (международная заявка PCT WO 0127307 A1) и подобные им.

Бактерия-продуцент L-лейцина

30 Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-лейцина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штаммы *E. coli*, устойчивые к аналогам лейцина, включающие, например, β -2-тиенилаланин, 3-гидроксилейцин, 4-азалейцин и 5,5,5-трифлуоролейцин (выложенные патентные заявки Японии 62-34397 и 8-70879), штаммы *E. coli*, полученные с помощью генно-инженерных методов, описанных в заявке PCT 96/06926; *E. coli* штамм H-9068 (JP 08-70879A), и подобные им.

40 Бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, вовлеченных в биосинтез L-лейцина. Примеры таких генов включают в себя гены оперона *leuABCD* и предпочтительно представлены мутантным геном *leuA*, кодирующим изопропилмалатсинтазу со снятым ингибированием L-лейцином по типу обратной связи (патент США 6403342). Кроме того, бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, кодирующих белки, которые экспортируют L-аминокислоту из бактериальной клетки. Примеры таких генов включают в себя гены *b2682* и *b2683* (гены *ugaZH*) (Европейская заявка 1239041 A2).

Бактерия-продуцент L-гистидина

50 Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-гистидина согласно настоящему изобретению, включают в

себя, но не ограничиваются бактериями-продуцентами L-гистидина, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* 24 (ВКПМ В-5945, патент РФ 2003677); штамм *E. coli* 80 (ВКПМ В-7270, патент РФ 2119536); штаммы *E. coli* NRRL В-12116-В12121 (патент США 4388405); штаммы *E. coli* Н-9342 (FERM ВР-6675) и Н-9343 (FERM ВР-6676) (патент США 6344347); штамм *E. coli* Н-9341 (FERM ВР-6674) (Европейский патент 1085087); штамм *E. coli* AI80/pFM201 (патент США 6258554) и подобные им. Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-гистидин согласно настоящему изобретению, также
 5 включают штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-гистидина. Примеры таких генов включают гены, кодирующие АТФ-фосфорибозилтрансферазу (*hisG*),
 10 фосфорибозил-АМФ-циклогидролазу (*hisI*),
 фосфорибозил-АТФ-фосфогидролазу (*hisIE*),
 15 фосфорибозилформимино-5-аминоимидазолкарбоксамидриботидизомеразу (*hisA*),
 амидотрансферазу (*hisH*), гистидинолфосфатаминотрансферазу (*hisC*),
 гистидинолфосфатазу (*hisB*), гистидинолдегидрогеназу (*hisD*) и т.д.

Известно, что гены, кодирующие ферменты биосинтеза L-гистидина
 20 (*hisG*, *hisВНАFI*), ингибируются L-гистидином, поэтому способность к продукции L-гистидина также может быть значительно усилена введением мутации, придающей устойчивость к ингибированию по типу обратной связи, в ген АТФ-фосфорибозидтрансферазы (*hisG*) (патенты РФ. 2003677 и 2119536).

Специфические примеры штаммов, обладающих способностью к продукции
 25 L-гистидина, включают *E. coli* FERM-P 5038 и 5048, в которые был введен вектор, содержащий ДНК, кодирующую фермент биосинтеза L-гистидина (заявка Японии 56-005099 А), штаммы *E. coli*, в которые введен ген *ght*, для экспорта аминокислоты (европейская заявка EP 1016710А), штамм *E. coli* 80, которому придана устойчивость
 30 к сульфатуанидину, DL-1,2,4-триазол-3-аланину и стрептомицину (ВКПМ В-7270, патент РФ. 2119536), и т.д.

Бактерия-продуцент L-глутаминовой кислоты

Примеры родительских штаммов, используемых для получения
 35 бактерии-продуцента L-глутаминовой кислоты согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* VL334thrC⁺ (Европейский патент EP 1172433). Штамм *E. coli* VL334 (ВКПМ В-1641) является ауксотрофом по L-изолейцину и L-треонину с мутациями в генах *thrC* и *ilvA* (патент США 4278765). В
 40 этот штамм была перенесена природная аллель гена *thrC* методом общей трансдукции с использованием бактериофага P1, выращенного на клетках природного штамма *E. coli* K12 (ВКПМ В-7). В результате был получен штамм, ауксотроф по L-изолейцину, VL334thrC⁺ (ВКПМ В-8961). Этот штамм обладает
 45 способностью к продукции L-глутаминовой кислоты.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения
 50 бактерии-продуцента L-глутаминовой кислоты согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-глутаминовой кислоты. Примеры таких ферментов включают глутаматдегидрогеназу (*gdh*), глутаминсинтетазу (*glnA*), глутаматсинтетазу (*gltAB*), изоцитратдегидрогеназу (*icdA*), аконитатгидратазу (*acnA*, *acnB*), цитратсинтазу (*gltA*), фосфоенолпируваткарбоксилазу (*pps*), пируватдегидрогеназу (*aceEF*, *lpdA*),

пируваткиназу (pykA, pykF), фосфоенолпируватсинтазу (ppsA), енолазу (eno), фосфоглицеромутазу (pgmA, pgmI), фосфоглицераткиназу (pgk), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (gapA), триозофосфатизомеразу (triA), фруктозобифосфатальдолазу (fbp), фосфофруктокиназу (pfkA, pfkB) и глюкозофосфатизомеразу (pgi).

Примеры штаммов, модифицированных таким образом, что усилена экспрессия гена цитратсинтетазы, гена фосфоенолпируваткарбоксилазы и/или гена глутаматдегидрогеназы, включают описанные в Европейских заявках EP 1078989 A, EP 955368 A и EP 952221 A.

Примеры штаммов, модифицированных таким образом, что экспрессия гена цитратсинтетазы и/или гена фосфоенолпируваткарбоксилазы снижена, и/или лишены по активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, включают описанные в Европейских заявках EP 1078989 A, EP 955368 A и EP 952221 A.

Примеры родительских штаммов для получения продуцирующих L-глутаминовую кислоту бактерий согласно настоящему исследованию, также включают штаммы, в которых снижена или отсутствует активность ферментов, которые катализируют синтез отличных от L-глутаминовой кислоты соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-глутаминовой кислоты. Примеры таких ферментов включают изоцитратлиазу (aceA), α -кетоглутаратдегидрогеназу (sucA), фосфотрансацетилазу (pta), ацетаткиназу (ack), синтазу ацетогидроксикилот (ilvG), ацетолактатсинтазу (ilvI), форматацетилтрансферазу (pfl), лактатдегидрогеназу (ldh) и глутаматдекарбоксилазу (gadAB). Бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, лишены активности α -кетоглутаратдегидрогеназы или обладающие сниженной активностью α -кетоглутаратдегидрогеназы, и способы их получения описаны в патентах США 5378616 и 5573945. Конкретно, примеры таких штаммов включают в себя следующие штаммы:

E. coli W3110 sucA::Km^R
E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)
E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)
E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

Штамм *E. coli* W3110 sucA::Km^R был получен в результате разрушения гена α -кетоглутаратдегидрогеназы (далее называемого "ген sucA") в штамме *E. coli* W3110. У этого штамма активность α -кетоглутаратдегидрогеназы отсутствует полностью.

Другие примеры бактерии-продуцента L-глутаминовой кислоты включают в себя бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia* и обладающие устойчивостью к антиметаболитам аспарагиновой кислоты и дефицитные по активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, например, штамм AJ13199 (FERM BP-5807) (патент США 5908768), или штамм FERM P-12379, дополнительно обладающий низкой активностью по расщеплению L-глутаминовой кислоты (патент США 5393671); штамм *E. coli* AJ13138 (FERM BP-5565) (патент США 6110714) и подобные им.

Примеры бактерии-продуцента L-глутаминовой кислоты включают в себя мутантные штаммы, принадлежащие к роду *Pantoea*, которые лишены активности α -кетоглутаратдегидрогеназы или имеют сниженную активность α -кетоглутаратдегидрогеназы и могут быть получены описанным выше способом. Примерами таких штаммов являются штамм *Pantoea ananatis* AJ13356 (патент США 6,331,419), штамм *Pantoea ananatis* AJ13356, депонированный в Национальном Институте Биологических Наук и Человеческих Технологий, Агенство

Промышленной Науки и Технологии, Министерство Международной Торговли и Промышленности (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry) (в настоящее время называющийся Национальный Институт Прогрессивной Промышленной Науки и Технологии, Международный Депозитарий Организмов для Целей Патентования, Централ 6, 1-1, Хигаши 1-Чоме, Тсукуба-ши, Ибараки-кен, 305-8566, Япония - National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) 19 февраля, 1998 и получивший инвентарный номер FERM P-16645. Затем было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора от 11 января 1999 г., и штамм получил инвентарный номер FERM BP-6615. Штамм *Pantoea ananatis* AJ13356 не имеет α -KGDH активности в результате разрушения гена α KGDH-E1 субъединицы (*sucA*). Вышеупомянутый штамм при выделении был идентифицирован как *Enterobacter agglomerans* и депонирован как штамм *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Тем не менее позднее он был классифицирован как *Pantoea ananatis* на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК и других доказательств. Несмотря на то что штамм AJ13356 был депонирован в указанный выше депозитарий как *Enterobacter agglomerans*, для целей данного описания он будет упоминаться как *Pantoea ananatis*.

Бактерия-продуцент L-фенилаланина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-фенилаланина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* AJ12739 (*tyrA::Tn10, tyrR*) (ВКМП В-8197); штамм *E. coli* HW1089 (ATCC-55371), содержащий ген *pheA34* (патент США 5354672); мутантный штамм *E. coli* MWEC101-b (KR8903681); штаммы *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 и NRRL B-12147 (патент США 4407952) и подобные им. Также в качестве родительских штаммов могут быть использованы бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, - продуценты L-фенилаланина, такие как штамм *E. coli* K-12 [W3110(*tyrA*)/pPHAB] (FERM BP-3566), штамм *E. coli* K-12 [W3110(*tyrA*)/pPHAD] (FERM BP-12659), штамм *E. coli* K-12 [W3110(*tyrA*)/pPHATerm] (FERM BP-12662) и штамм *E. coli* K-12 [W3110(*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAV], названный как AJ12604 (FERM BP-3579) (Европейский патент EP 488424 B1). Кроме того, также могут быть использованы бактерии-продуценты L-фенилаланина, принадлежащие к роду *Escherichia* с повышенной активностью белков, кодируемых геном *yedA* или геном *yddG* (патентные заявки США 2003/0148473 A1 и 2003/0157667 A1).

Бактерия-продуцент L-триптофана

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-триптофана согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются бактериями-продуцентами L-триптофана, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штаммы *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) и JP6015/pMU91 (DSM10123), лишённые активности триптофанил-тРНК синтетазы, кодируемой мутантным геном *trpS* (патент США 5756345); штамм *E. coli* SV164 (pGH5), содержащий аллель *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, не ингибируемую серином по типу обратной связи, и аллель *trpE*, кодирующий антранилатсинтазу, не ингибируемую триптофаном по типу обратной связи (патент США 6180373); штаммы *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) и AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), в которых отсутствует активность триптофаназы (патент

США 4371614); штамм *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps, в котором усилена способность к синтезу фосфоенолпирувата (заявка РСТ WO 9708333, патент США 6319696), и подобные им. Также могут быть использованы бактерии-продуценты L-триптофана, принадлежащие к роду *Escherichia*, в которых увеличена активность белка, кодируемого геном *yedA* или геном *yddG* (заявки на патент США 2003/0148473 A1 и 2003/0157667 A1).

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-триптофана согласно настоящему изобретению, также включают в себя штаммы, в которых увеличена активность одного или нескольких ферментов, выбранных из группы, состоящей из антранилатсинтазы, фосфоглицератдегидрогеназы и триптофансинтазы. И антранилатсинтаза, и фосфоглицератдегидрогеназа подвержены ингибированию L-триптофаном и L-серином по типу обратной связи, так что в эти ферменты могут быть введены мутации, снижающие чувствительность к ингибированию по типу обратной связи. Специфические примеры штаммов с такой мутацией включают *E. coli* SV164, антранилатсинтаза которой не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи, и штамм-трансформант, полученный введением в *E. coli* SV164 плазмиды pGH5 (заявка РСТ WO 94/08031), которая содержит мутантный ген *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, которая не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-триптофана согласно настоящему изобретению, также включают в себя штаммы, в которые введен триптофановый оперон, содержащий ген, кодирующий антранилатсинтазу, которая не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи (заявка Японии 57-71397 А, заявка Японии 62-244382 А, патент США 4371614). Кроме того, способность к продукции L-триптофана может быть придана путем усиления экспрессии гена (из триптофанового оперона), кодирующего триптофансинтазу. Триптофансинтаза состоит из двух субъединиц α и β , которые кодируются *trpA* и *trpB* соответственно. Кроме того, способность к продукции L-триптофана может быть увеличена усилением экспрессии оперона изоцитратлиазы-малатсинтазы (заявка РСТ WO 2005/103275).

Бактерия-продуцент L-пролина

Примеры бактерий-продуцентов L-пролина, используемых в качестве родительского штамма согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* 702ilvA (ВКПМ В-8012), дефицитного по гену *ilvA* и способного к продукции L-пролина (Европейский патент EP 1172433). Бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, вовлеченных в биосинтез L-пролина. Предпочтительно примеры таких генов для бактерий-продуцентов L-пролина включают ген *proB*, кодирующий глутаматкиназу с десенсibilizированной регуляцией L-пролином по типу обратной связи (патент Германии 3127361). Кроме того, бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, кодирующих белки, секретирующие L-аминокислоту из бактериальной клетки. Примерами таких генов являются гены *b2682* и *b2683* (*ygaZH* гены) (Европейская патентная заявка EP 1239041 A2).

Примеры бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и обладающих способностью к продукции L-пролина, включают следующие штаммы *E. coli*: NRRL

В-12403 и NRRL В-12404 (патент Великобритании GB 2075056), ВКПМ В-8012 (патентная заявка РФ 2000124295), плазмидные мутанты, описанные в патенте Германии DE 3127361, плазмидные мутанты, описанные у Bloom F.R. et al. (The 15th Miami winter symposium, 1983, p.34), и подобные им.

Бактерия-продуцент L-аргинина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-аргинина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* 237 (ВКПМ В-7925) и его производные, содержащие мутантную N-ацетилглутаматсинтазу (патентная заявка РФ 2001112869), штамм *E. coli* 382 (ВКПМ В-7926) (Европейская патентная заявка EP 1170358 A1), штамм-продуцент аргинина, в который введен ген *argA*, кодирующий N-ацетилглутаматсинтазу (Европейская патентная заявка EP 1170361 A1), и подобные им.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-аргинина согласно настоящему изобретению, также включают в себя штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-аргинина. Примеры ферментов биосинтеза L-аргинина включают N-ацетилглутамилфосфатредуктазу (*argC*), орнитинацетилтрансферазу (*argJ*), N-ацетилглутаматкиназу (*argB*), ацетилорнитинтрансминазу (*argD*), орнитинкарбамилтрансферазу (*argF*), синтазу аргининсукциниловой кислоты (*argG*), лиазу аргининсукциниловой кислоты (*argH*) и карбамоилфосфатсинтазу (*carAB*).

Бактерия-продуцент L-валина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-валина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, штаммы, модифицированные с целью сверхэкспрессии оперона *ilvGMEDA* (патент США 5998178). Желательно удалить область оперона *ilvGMEDA*, которая необходима для ослабления экспрессии, с тем чтобы экспрессия оперона не ослаблялась образующимся L-валином. Далее, желательно разрушить в опероне ген *ilvA*, с тем чтобы снизить активность треониндеаминазы.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-валина согласно настоящему изобретению, также включают в себя мутантные штаммы, имеющие мутацию аминоксил-тРНК-синтазы (патент США 5658766). Например, может использоваться штамм *E. coli* VL1970, который имеет мутацию в гене *ileS*, кодирующем изолейцин-тРНК-синтазу. Штамм *E. coli* VL1970 депонирован в Российской Национальной Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 113545 Москва, 1-й Дорожный проезд) 24 июня 1988 г. с инвентарным номером ВКПМ В-4411.

Далее, в качестве родительских штаммов также могут использоваться мутантные штаммы, для роста которых требуется липоевая кислота, и/или с недостаточным количеством H⁺-АТФазы (заявка РСТ WO 96/06926).

Бактерия-продуцент L-изолейцина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-изолейцина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, мутантные штаммы с устойчивостью к 6-диметиламинопурину (заявка Японии 5-304969 А), мутантные штаммы с устойчивостью к аналогу изолейцина, такому как тиаизолейцин и гидроксамат изолейцина, и мутантные штаммы, дополнительно имеющие устойчивость к

DL-этионину и/или гидроксамату аргинина (заявка Японии 5-130882 А). Кроме того, в качестве родительских штаммов также могут использоваться рекомбинантные штаммы, трансформированные генами, кодирующими белки, вовлеченные в биосинтез L-изолейцина, такие как треониндеаминаза и ацетогидроксатсинтаза (заявка Японии 2-458 А, патент Франции 0356739 и патент США 5998178).

2. Способ согласно настоящему изобретению.

Способом согласно настоящему изобретению является способ получения L-аминокислоты, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления L-аминокислоты в питательной среде, и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости.

Согласно настоящему изобретению выращивание, выделение и очистка L-аминокислоты из культуральной или подобной ей жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых аминокислота продуцируется с использованием бактерий.

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, необходимых для роста микроорганизмов. К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, а также различные органические кислоты. В зависимости от характера ассимиляции используемого микроорганизма могут использоваться спирты, такие как этанол и глицерин. В качестве источника азота могут использоваться различные неорганические соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, другие соединения азота, такие как амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, ферментоллизат микроорганизмов. В качестве минеральных добавок могут использоваться фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные им соединения. В качестве витаминов могут использоваться тиамин и дрожжевой экстракт.

Выращивание осуществляется предпочтительно в аэробных условиях, таких как перемешивание культуральной жидкости на качалке, взбалтывание с аэрацией, при температуре в пределах от 20 до 40°C, предпочтительно в пределах от 30 до 38°C. рН среды поддерживают в пределах от 5 до 9, предпочтительно от 6.5 до 7.2. рН среды может регулироваться аммиаком, карбонатом кальция, различными кислотами, основаниями и буферными растворами. Обычно, выращивание в течение от 1 до 5 дней приводит к накоплению целевой L-аминокислоты в культуральной жидкости.

После выращивания твердые остатки, такие как клетки, могут быть удалены из культуральной жидкости методом центрифугирования или фильтрацией через мембрану, а затем L-аминокислота может быть выделена и очищена методами ионообменной хроматографии, концентрирования и/или кристаллизации.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 изображены относительные положения праймеров Р1 и Р2 на плазмиде рАСУС184, используемой для амплификации гена cat.

На фиг.2 изображено конструирование фрагмента хромосомной ДНК, содержащего инактивированный ген rcsA.

Примеры

Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже со ссылкой на

следующие не ограничивающие настоящее изобретение Примеры.

Пример 1. Конструирование штамма с инактивированным геном *rcsA*

1. Деления гена *rcsA*

Штамм, содержащий делецию гена *rcsA*, был сконструирован с использованием методики, разработанной Datsenko, K.A. и Wanner, B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645), известной как "Red-зависимая интеграция". В соответствии с этой методикой были синтезированы ПЦР-праймеры P1 (SEQ ID NO:3) и P2 (SEQ ID NO:4), гомологичные участку, прилегающему к гену *rcsA*, и гену, сообщающему устойчивость к антибиотику, на плазмиде, используемой в качестве матрицы для ПЦР. В качестве матрицы для ПЦР была использована плаزمида pACYC184 (NBL Gene Sciences Ltd., UK) (инвентарный номер X06403 в базе данных GenBank/EMBL). Использовался следующий температурный профиль для ПЦР: денатурация при 95°C в течение 3 мин; два первых цикла: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; и последующие 25 циклов: 30 сек при 95°C, 30 сек при 54°C, 40 сек при 72°C; и заключительная полимеризация: 5 мин при 72°C.

Полученный продукт ПЦР длиной 1152 п.н. (фиг.1), очищенный в агарозном геле, может быть использован для электропорации в *E.coli* MG1655 (ATCC 700926), содержащий плазмиду pKD46 с термочувствительным репликоном. Плаزمида pKD46 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12:6640-45) содержит фрагмент ДНК фага λ длиной 2154 нуклеотида (позиции с 31088 по 33241 нуклеотидной последовательности с инвентарным номером J02459 в базе данных GenBank), а также содержит гены λ Red-гомологичной системы рекомбинации (гены γ , β , ϵ) под контролем промотора P_{araB} , индуцируемого арабинозой. Плаزمида pKD46 необходима для интеграции продукта ПЦР в хромосому штамма MG1655.

Электрокомпетентные клетки были получены следующим образом: ночную культуру *E. coli* MG1655 выращивали при 30°C в среде LB с добавкой ампициллина (100 мг/л), разводили в 100 раз, добавив 5 мл среды SOB (Sambrook et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), содержащей ампициллин и L-арабинозу (1 мМ). Полученную культуру растили с перемешиванием при 30°C до достижения $OD_{600} \approx 0.6$, после чего делали клетки электрокомпетентными путем концентрирования в 100 раз и трехкратного отмывания ледяной деионизированной H_2O . Электропорацию проводили с использованием 70 мкл клеток и ≈ 100 нг продукта ПЦР. После электропорации клетки инкубировали в 1 мл среды SOC (Sambrook et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) при 37°C в течение 2.5 часов, после чего высевали на чашки с L-агаром, содержащим хлорамфеникол (30 мкг/мл) и выращивали при 37°C для отбора Sm^R -рекомбинантов. Затем для удаления плазмиды pKD46 проводили 2 пассажа на L-агаре с Sm при 42°C и полученные колонии проверяли на чувствительность к ампициллину.

2. Подтверждение деления гена *rcsA* с помощью ПЦР.

Мутанты с делегированным геном *rcsA*, содержащие ген устойчивости к Sm , были проверены с помощью ПЦР. Лocus-специфичные праймеры P3 (SEQ ID NO:5) и P4 (SEQ ID NO:6) были использованы для проверки делеции с помощью ПЦР. Использовался следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: денатурация при 94°C в течение 3 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 54°C, 1 мин при 72°C; заключительный шаг: 7 мин при 72°C. Длина продукта

ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток родительского штамма *rcaA*⁺ MG1655, составляет 722 п.н. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы

клеток мутантного штамма MG1655 $\Delta rcaA::cat$, составляет 1214 п.н. (фиг.2).

Мутантный штамм назвали MG1655 $\Delta rcaA::cat$.

Пример 2. Продукция L-треонина штаммом *E. coli* В-3996- $\Delta rcaA$.

Для оценки влияния инактивации гена *rcaA* на продукцию треонина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 $\Delta rcaA::cat$

перенесли в штамм-продуцент L-треонина *E. coli* В-3996 (ВКПМ В-3996) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма В-3996- $\Delta rcaA$. Штамм В-3996 был депонирован 19 ноября 1987 года во Всесоюзном научном центре антибиотиков

(РФ, 117105 Москва, Нагатинская ул., 3-А) с инвентарным номером РИА 1867.

Указанный штамм также был депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (РФ, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 7 апреля 1987 г. с инвентарным номером В-3996.

Оба штамма *E. coli*, В-3996 и В-3996- $\Delta rcaA$, выращивали в течение 18-24 часов при температуре 37°C на чашках с L-агаром. Для получения посевной культуры указанные штаммы выращивали при 32°C в течение 18 часов на роторной качалке (250 об/мин) в пробирках размером 20×200 мм, содержащих 2 мл L-бульона с 4% глюкозой. Затем в ферментационную среду вносили по 0.21 мл (10%) посевной культуры. Ферментацию проводили в 2 мл минимальной ферментационной среды в пробирках размером 20×200 мм. Клетки выращивали в течение 72 часов при 32°C с перемешиванием (250 об/мин).

После выращивания количество накопленного в среде L-треонина определяли с помощью бумажной хроматографии, с использованием подвижной фазы следующего состава: бутанол: уксусная кислота: вода = 4:1:1 (v/v). Для визуализации использовали раствор (2%) нингидрина в ацетоне. Пятно, содержащее L-треонин, вырезали; L-треонин элюировали 0.5% водным раствором $CdCl_2$, после чего количество L-треонина оценивали спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Результаты восьми независимых пробирочных ферментаций приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, штамм В-3996- $\Delta rcaA$ накапливал большее количество L-треонина по сравнению со штаммом В-3996. Использовали ферментационную среду следующего состава (г/л):

Глюкоза	80.0
$(NH_4)_2SO_4$	22.0
NaCl	0.8
KH_2PO_4	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02
Тиамин гидрохлорид	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
$CaCO_3$	30.0

Глюкозу и сульфат магния стерилизовали отдельно. $CaCO_3$ стерилизовали сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. pH доводили до 7.0. Антибиотик добавляли в

среду после стерилизации.

Пример 3. Продукция L-лизина штаммом *E. coli* WC196- Δ rscA.

Для оценки влияния инактивации гена *rscA* на продукцию лизина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rscA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-лизина *E. coli* AJ11442) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма AJ11442- Δ rscA.

Плазмида pCABD2 содержит ген *dapA*, кодирующий дигидродипиколинатсинтазу с мутацией, вызывающей устойчивость к ингибированию по типу обратной связи L-лизином, ген *lysC*, кодирующий аспартокиназу III с мутацией, вызывающей устойчивость к ингибированию по типу обратной связи L-лизином, ген *dapB*, кодирующий дигидродипиколинатредуктазу, и ген *ddh*, кодирующий диаминопимелатдегидрогеназу (патент США 6040160).

Оба штамма *E. coli*, AJ11442 и AJ11442- Δ rscA, могут быть выращены в L-среде, содержащей 20 мг/л стрептомицина, при 37°C; и 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 20 мл ферментационной среды, содержащей необходимые антибиотики, в колбы объемом 500 мл. Культивирование может проводиться при 37°C в течение 16 часов с использованием возвратно-поступательной качалки со скоростью перемешивания 115 об/мин. После выращивания количество L-лизина и остаточной глюкозы в среде может быть измерено известным способом (Biotech-analyzer AS210, производитель - Sakura Seiki Co.). Затем для каждого из штаммов может быть рассчитан выход L-лизина в пересчете на потребленную глюкозу. Может быть использована ферментационная среда следующего состава (г/л):

Глюкоза	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	24
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ 5H ₂ O	0.01
Дрожжевой экстракт	2.0

pH доводят до 7.0 с помощью KOH и среду автоклавируют при 115°C в течение 10 мин. Глюкозу и MgSO₄×7H₂O стерилизуют отдельно. Также добавляют CaCO₃ до концентрации 30 г/л, предварительно простерилизованный сухим жаром при 180°C в течение 2 часов.

Пример 4. Продукция L-цистеина штаммом *E. coli* JM15(ydeD)- Δ rscA.

Для оценки влияния инактивации гена *rscA* на продукцию L-цистеина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rscA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-цистеина *E. coli* JM15(ydeD) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), в результате чего может быть получен штамм JM15(ydeD)- Δ rscA.

Штамм *E. coli* JM15(ydeD) является производным штамма *E. coli* JM15 (патент США 6218168), который может быть трансформирован ДНК, содержащей ген *ydeD*, кодирующий мембранный белок, не вовлеченный в пути биосинтеза ни одной из L-аминокислот (патент США 5972663). Штамм JM15 (CGSC# 5042) может быть получен в Генетической коллекции Coli при *E. coli* Genetic Resource Center, MCD Biology

Department, Yale University (<http://cgsc.biology.yale.edu/>).

Условия ферментации для оценки продукции L-цистеина детально описаны в Примере 6 патента США 6218168.

Пример 5. Продукция L-лейцина штаммом *E. coli* 57- Δ rscA.

Для оценки влияния инактивации гена *rscA* на продукцию L-лейцина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rscA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-лейцина *E. coli* 57 (ВКПМ В-7386, патент США 6124121) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), в результате чего может быть получен штамм 57-pMW- Δ rscA. Штамм 57 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 19 мая 1997 г. с инвентарным номером ВКПМ В-7386.

Оба штамма *E. coli*, 57 и 57- Δ rscA, могут быть выращены в течение 18-24 часов при температуре 37°C на чашках с L-агаром. Для получения посевной культуры указанные штаммы могут быть выращены на роторной качалке (250 об/мин) при 32°C в течение 18 часов в пробирках размером 20×200 мм, содержащих 2 мл L-бульона с 4% глюкозы. Затем в ферментационную среду может быть внесено по 0.21 мл (10%) посевной культуры. Ферментацию можно проводить в 2 мл минимальной ферментационной среды в пробирках размером 20×200 мм. Клетки могут быть выращены в течение 48-72 часов при 32°C с перемешиванием (250 об/мин). Количество L-лейцина может быть измерено с помощью бумажной хроматографии (состав подвижной фазы: бутанол - уксусная кислота - вода = 4:1:1).

Может быть использована ферментационная среда следующего состава (г/л) (рН 7.2):

Глюкоза	60.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
Тиамин	0.01
CaCO ₃	25.0

Глюкозу и CaCO₃ следует стерилизовать отдельно.

Пример 6. Продукция L-гистидина штаммом *E. coli* 80- Δ rscA.

Для оценки влияния инактивации гена *rscA* на продукцию L-гистидина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rscA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-гистидина *E. coli* 80 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма 80- Δ rscA. Штамм 80 описан в патенте РФ 2119536 и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 15 октября 1999 г. с инвентарным номером ВКПМ В-7270, затем 12 июля 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора. Оба штамма *E. coli*, 80 и 80- Δ rscA, могут быть выращены в L-бульоне при 29°C в течение 6 часов. Затем 0.1 мл каждой из полученных культур может быть внесено в 2 мл ферментационной среды в пробирки размером 20×200 мм, и культуры могут быть выращены при 29°C в течение 65 часов на роторной качалке (350

об/мин). После выращивания количество накопленного в среде гистидина может быть определено с помощью бумажной хроматографии. Может быть использована подвижная фаза следующего состава: *n*-бутанол - уксусная кислота - вода = 4:1:1 (v/v). Раствор нингидрина (0.5%) в ацетоне может быть использован для визуализации.

Состав ферментационной среды (рН 6.0) (г/л):

	Глюкоза	100.0
	Мамено(гидролизат сои) 0.2 общего азота	
10	L-пролин	1.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0
	KH ₂ PO ₄	2.0
	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
15	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
	MnSO ₄	0.01
	Тиамин	0.001
	Бетаин	2.0
20	CaCO ₃	60.0

Глюкозу, пролин, бетаин и CaCO₃ стерилизуют отдельно. рН доводят до 6.0 перед стерилизацией.

Пример 7. Продукция L-глутаминовой кислоты штаммом *E. coli* VL334thrC⁺-Δ*rcsA*.

Для оценки влияния инактивации гена *rcsA* на продукцию L-глутаминовой кислоты ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ*rcsA*::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-глутаминовой кислоты *E.*

VL334thrC⁺ (EP 1172433) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), в результате чего может быть получен штамм VL334thrC⁺-Δ*rcsA*. Штамм VL334thrC⁺ депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 6 декабря 2004 г. с инвентарным номером В-8961, затем 8 декабря 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Оба штамма, VL334thrC⁺ и VL334thrC⁺-Δ*rcsA*, могут быть выращены на чашках с L-агаром при 37°C в течение 18-24 часов. Далее, одна петля клеток может быть перенесена в пробирки, содержащие 2 мл ферментационной среды.

Ферментационная среда должна содержать глюкозу 60 г/л, сульфат аммония 25 г/л, KH₂PO₄ 2 г/л, MgSO₄ 1 г/л, тиамин 0.1 мг/мл, L-изолейцин 70 мкг/мл и CaCO₃ 25 г/л (рН 7.2). Глюкозу и CaCO₃ следует стерилизовать отдельно. Выращивание может производиться при 30°C в течение 3 дней с перемешиванием. После выращивания количество полученной L-глутаминовой кислоты может быть определено с помощью бумажной хроматографии (состав подвижной фазы: бутанол - уксусная кислота - вода = 4:1:1) с последующим окрашиванием нингидрином (1% раствор в ацетоне) и дальнейшим элюированием полученных соединений в 50% этаноле с 0.5% CdCl₂.

Пример 8. Продукция L-фенилаланина штаммом *E. coli* AJ12739-Δ*rcsA*.

Для оценки влияния инактивации гена *rcsA* на продукцию L-фенилаланина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ*rcsA*::cat

могут быть перенесены в штамм-продуцент L-фенилаланина *E. coli* AJ12739 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма AJ12739- Δ rcsA. Штамм AJ12739 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 6 ноября 2001 года с инвентарным номером ВКПМ В-8197, затем 23 августа 2002 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Оба штамма, AJ12739- Δ rcsA и AJ12739, могут быть выращены при 37°C в течение 18 часов в питательном бульоне; 0.3 мл каждой из полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды в пробирки размером 20×200 мм, и культуры могут быть выращены при 37°C в течение 48 часов на роторной качалке. По окончании ферментации количество накопленного в среде фенилаланина может быть определено с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). Для этой цели могут быть использованы TLC-пластинки размером 10×15 см, покрытые 0.11 мм-слоем силикагеля Сорбфил без флуоресцентного индикатора (Акционерное Общество Сорбполимер, Краснодар, Россия). Пластинки Сорбфил могут быть экспонированы в подвижной фазе следующего состава: пропан-2-ол: этилацетат: 25% водного аммиака: вода = 40:40:7:16 (v/v). Раствор (2%) нингидрина в ацетоне может быть использован для визуализации.

Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	16.0
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ 5H ₂ O	0.01
Тиамин HCl	0.0002
Дрожжевой экстракт	2.0
Тирозин	0.125
CaCO ₃	20.0

Глюкозу и сульфат магния стерилизуют отдельно. CaCO₃ стерилизуют сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. pH доводят до 7.0.

Пример 9. Продукция L-триптофана штаммом *E. coli* SV164 (pGH5)- Δ rcsA.

Для оценки влияния инактивации гена rcsA на продукцию L-триптофана ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rcsA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-триптофана *E. coli* SV164 (pGH5) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма SV164(pGH5)- Δ rcsA. Штамм SV164 содержит аллель trpE, кодирующий антранилатсинтазу, которая не подвержена ингибированию триптофаном по типу обратной связи. Плазмида pGH5 содержит мутантный ген serA, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, которая не подвержена ингибированию серином по типу обратной связи. Штамм SV164 (pGH5) детально описан в патенте США 6180373 и в Европейском патенте 0662143.

Оба штамма, SV164(pGH5)- Δ rcsA4 и SV164(pGH5), могут быть выращены с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона с

добавлением тетрациклина (маркера плазмиды pGH5, 20 мг/мл). По 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды, содержащей тетрациклин (20 мг/мл), в пробирках размером 20×200 мм; и культуры могут быть выращены при 37°C в течение 48 часов на роторной качалке при 250 об/мин. После выращивания количество накопленного в среде триптофана может быть определено с помощью TLC, как описано в Примере 8. Компоненты ферментационной среды представлены в табл. 1, но группы компонентов А, В, С, D, Е, F и H следует стерилизовать отдельно, как и показано в табл. 1, чтобы избежать нежелательных взаимодействий во время стерилизации.

Пример 10. Продукция L-пролина штаммом *E. coli* 702ilvA- Δ rcsA.

Для оценки влияния инактивации гена *rcsA* на продукцию L-пролина ДНК-фрагменты из хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rcsA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-пролина *E. coli* 702ilvA с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма 702ilvA- Δ rcsA. Штамм 702ilvA депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 18 июля 2000 г. с инвентарным номером ВКПМ В-8012, затем 18 мая 2001 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Оба штамма *E. coli*, 702ilvA и 702ilvA- Δ rcsA, могут быть выращены в течение 18-24 часов при температуре 37°C на чашках с L-агаром. Затем ферментация с использованием этих штаммов может производиться в тех же условиях, как описано в Примере 7.

Пример 11. Продукция L-аргинина штаммом *E. coli* 382- Δ rcsA.

Для оценки влияния инактивации гена *rcsA* на продукцию L-аргинина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rcsA::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-аргинина *E. coli* 382 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма 382- Δ rcsA. Штамм 382 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 10 апреля 2000 года с инвентарным номером ВКПМ В-7926, затем 18 мая 2001 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора. Оба штамма, 382- Δ rcsA и 382, могут быть выращены с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона; по 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды в пробирки размером 20×200 мм, и культуры могут быть выращены при 32°C в течение 48 часов на роторной качалке. После выращивания количество накопленного в среде L-аргинина может быть определено с помощью бумажной хроматографии, при этом может быть использован следующий состав подвижной фазы: бутанол: уксусная кислота: вода = 4:1:1 (v/v). Раствор нингидрина (2%) в ацетоне может быть использован для визуализации. Пятно, содержащее L-аргинин, может быть вырезано; L-аргинин может быть элюирован 0.5% водным раствором CdCl₂, после чего количество L-аргинина может быть определено спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Состав ферментационной среды (г/л):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35.0
KH_2PO_4	2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
Тиамин HCl	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
L-изолейцин	0.1
CaCO_3	5.0

5

10

Глюкозу и сульфат магния стерилизуют отдельно. CaCO_3 стерилизуют сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. pH доводят до 7.0.

15

Хотя указанное изобретение описано в деталях со ссылкой на наилучший способ осуществления изобретения, для специалиста в указанной области техники очевидно, что могут быть совершены различные изменения и произведены эквивалентные замены, и такие изменения и замены не выходят за рамки настоящего изобретения. Каждому из упомянутых выше документов соответствует ссылка, и все цитируемые документы являются частью описания настоящего изобретения.

20

Штамм	OD_{540}	L-треонин, г/л
B-3996	29.4 ± 0.7	25.9 ± 0.7
B-3996-ΔrcsA	29.8 ± 0.5	27.7 ± 0.8

25

Растворы	Компонент	Конечная концентрация, г/л
A	KH_2PO_4	1.5
	NaCl	0.5
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5
	L-метионин	0.05
	L-фенилаланин	0.1
	L-тирозин	0.1
	Матено (общий N)	0.07
	B	Глюкоза
35	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3
	C	CaCl_2
D	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075
	Цитрат натрия	1.0
E	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00015
	H_3BO_3	0.0025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00007
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00025
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0016
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0003
F	Тиамин HCl	0.005
G	CaCO_3	30.0
H	Пиридоксин	0.03

50

pH раствора A довели до значения 7.1 при помощи NH_4OH . Каждый раствор стерилизовали отдельно, перемешивали и затем растворы смешивали.

Формула изобретения

1. Бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, - продуцент L-треонина, модифицированная таким образом, что в указанной бактерии инактивирован ген *gcsA*.

5 2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанный ген *gcsA* инактивирован за счет делеции гена *gcsA* в хромосоме бактерии.

3. Способ получения L-треонина, включающий:
10 выращивание бактерии по любому из пп.1 и 2 в питательной среде, вызывающее продукцию и накопление L-треонина в культуральной жидкости, и выделение L-треонина из культуральной жидкости.

15

20

25

30

35

40

45

50

Перечень последовательностей

<110> Ajinomoto-Genetika Research Institute

<120> A METHOD FOR PRODUCING AN L-AMINO ACID USING BACTERIUM OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY HAVING EXPRESSION OF THE rcsA gene ATTENUATED

<130> rcsA

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 624

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(624)

<223>

<400> 1

atg tca acg att att atg gat tta tgt agt tac acc cga cta ggt tta	48
Met Ser Thr Ile Ile Met Asp Leu Cys Ser Tyr Thr Arg Leu Gly Leu	
1 5 10 15	
acc ggg tat ctg ttg agt aga ggg gtt aaa aaa aga gaa atc aac gac	96
Thr Gly Tyr Leu Leu Ser Arg Gly Val Lys Lys Arg Glu Ile Asn Asp	
20 25 30	
att gaa acc gtt gat gac ctt gcc ata gct tgt gat tca cag cgc cct	144
Ile Glu Thr Val Asp Asp Leu Ala Ile Ala Cys Asp Ser Gln Arg Pro	
35 40 45	
tca gtg gtg ttt att aat gag gac tgt ttc atc cac gat gct tct aac	192
Ser Val Val Phe Ile Asn Glu Asp Cys Phe Ile His Asp Ala Ser Asn	
50 55 60	
agt cag cgt atc aag ctc atc att aat caa cat ccc aat acg tta ttt	240
Ser Gln Arg Ile Lys Leu Ile Ile Asn Gln His Pro Asn Thr Leu Phe	
65 70 75 80	

atc gtt ttt atg gca att gcc aat gtt cat ttt gat gaa tat cta ttg 288
 Ile Val Phe Met Ala Ile Ala Asn Val His Phe Asp Glu Tyr Leu Leu
 85 90 95

gtc aga aaa aat tta ttg atc agt tct aaa tcg att aaa ccg gaa tct 336
 Val Arg Lys Asn Leu Leu Ile Ser Ser Lys Ser Ile Lys Pro Glu Ser
 100 105 110

ctc gac gat atc ctt ggc gat att ctg aaa aaa gag aca acg ata acc 384
 Leu Asp Asp Ile Leu Gly Asp Ile Leu Lys Lys Glu Thr Thr Ile Thr
 115 120 125

tcg ttt tta aat atg ccg acg tta tca ttg agc cga acc gaa tcg agt 432
 Ser Phe Leu Asn Met Pro Thr Leu Ser Leu Ser Arg Thr Glu Ser Ser
 130 135 140

atg ttg cga atg tgg atg gca ggt cag gga acc att caa atc tct gac 480
 Met Leu Arg Met Trp Met Ala Gly Gln Gly Thr Ile Gln Ile Ser Asp
 145 150 155 160

caa atg aat atc aaa gcc aag acc gtt tca tcg cat aaa ggt aat att 528
 Gln Met Asn Ile Lys Ala Lys Thr Val Ser Ser His Lys Gly Asn Ile
 165 170 175

aaa cgt aag atc aaa acg cat aat aaa cag gtt atc tac cat gtc gtc 576
 Lys Arg Lys Ile Lys Thr His Asn Lys Gln Val Ile Tyr His Val Val
 180 185 190

cga ctg acg gat aat gtg act aat ggt att ttt gtc aac atg cgc taa 624
 Arg Leu Thr Asp Asn Val Thr Asn Gly Ile Phe Val Asn Met Arg
 195 200 205

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Ser Thr Ile Ile Met Asp Leu Cys Ser Tyr Thr Arg Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Thr Gly Tyr Leu Leu Ser Arg Gly Val Lys Lys Arg Glu Ile Asn Asp
 20 25 30

Ile Glu Thr Val Asp Asp Leu Ala Ile Ala Cys Asp Ser Gln Arg Pro
 35 40 45

Ser Val Val Phe Ile Asn Glu Asp Cys Phe Ile His Asp Ala Ser Asn
 50 55 60

Ser Gln Arg Ile Lys Leu Ile Ile Asn Gln His Pro Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Ile Val Phe Met Ala Ile Ala Asn Val His Phe Asp Glu Tyr Leu Leu
 85 90 95

Val Arg Lys Asn Leu Leu Ile Ser Ser Lys Ser Ile Lys Pro Glu Ser
 100 105 110

Leu Asp Asp Ile Leu Gly Asp Ile Leu Lys Lys Glu Thr Thr Ile Thr
 115 120 125

Ser Phe Leu Asn Met Pro Thr Leu Ser Leu Ser Arg Thr Glu Ser Ser
 130 135 140

Met Leu Arg Met Trp Met Ala Gly Gln Gly Thr Ile Gln Ile Ser Asp
 145 150 155 160

Gln Met Asn Ile Lys Ala Lys Thr Val Ser Ser His Lys Gly Asn Ile
 165 170 175

Lys Arg Lys Ile Lys Thr His Asn Lys Gln Val Ile Tyr His Val Val
 180 185 190

Arg Leu Thr Asp Asn Val Thr Asn Gly Ile Phe Val Asn Met Arg
 195 200 205

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence: primer P1

<400> 3

atgtcaacga ttattatgga tttatgtagt tacacctagt aagccagtat aactcc 57

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence: primer P2

<400> 4

cagcctgact ggtgggaaac caccagtcag aatgtgtaa gggcaccaat aactgcc 57

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence: primer P3

<400> 5

tcgttacgca ttgagtgagg g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

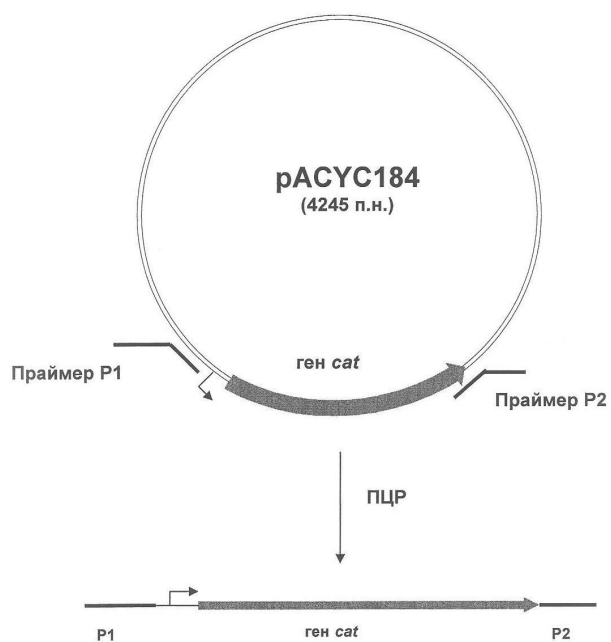
<213> Artificial sequence: primer P4

<400> 6

cggtatcttt gtggagaaag c

21

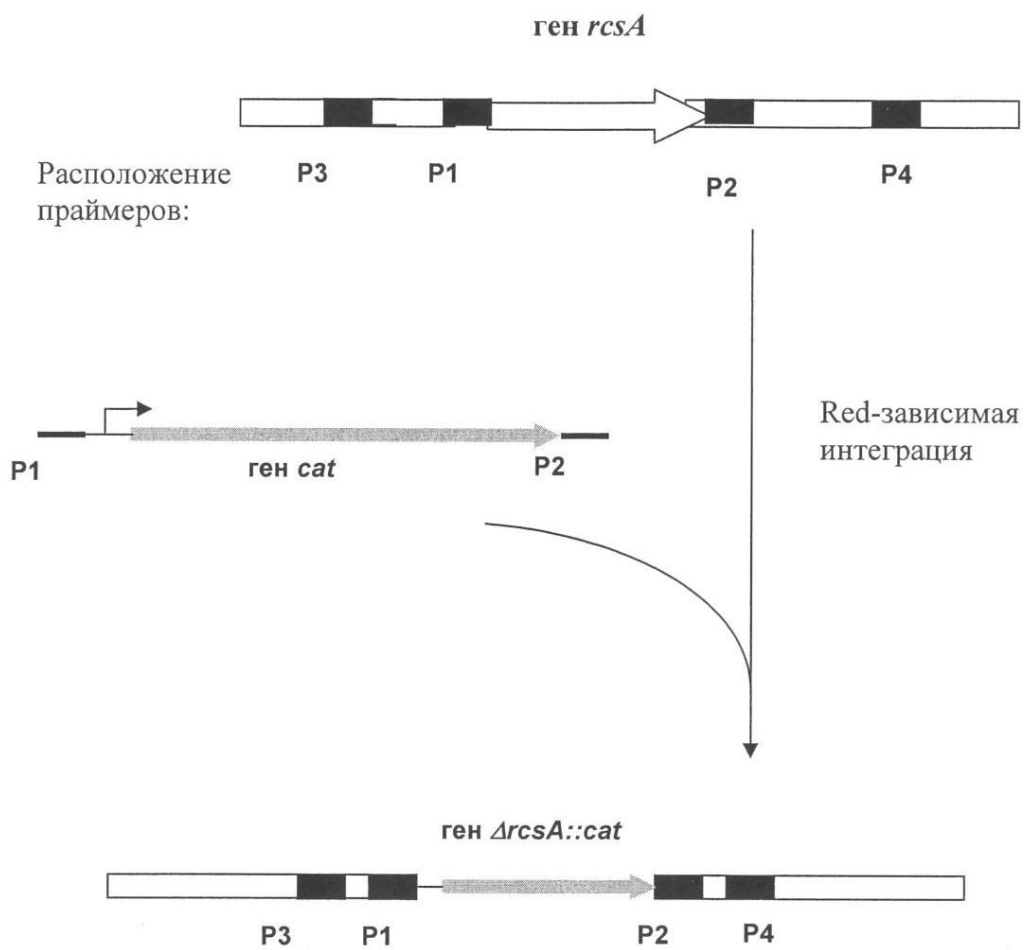
Расположение праймеров P1 и P2 на плазмиде pACYC184.



Полученный ПЦР-продукт (1152 п.н.)

Фиг. 1

Конструирование хромосомного фрагмента ДНК, содержащего инактивированный ген *rcsA*.



1214 п.н.

Фиг. 2