



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 111 247** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 1/20, 1/21, 15/01, C 12**
P 13/22

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 95113171/13, 23.09.1993
(30) Приоритет: 28.09.1992 DE P 4232468.8
(46) Дата публикации: 20.05.1998
(56) Ссылки: 1. WO, заявка, 87/01130, кл. C 12 N 15/01, 1987. 2. SU, авторское свидетельство, 990814, кл. C 12 P 13/22, 1983.
(86) Заявка PCT:
EP 93/02588 (23.09.93)

(71) Заявитель:
Консортиум Фюр Электрохемише Индустри
ГмбХ (DE)
(72) Изобретатель: Гюнтер Вих[DE],
Вальфред Ляйнфельдер[DE], Кейт Бэкман[US]
(73) Патентообладатель:
Консортиум Фюр Электрохемише Индустри
ГмбХ (DE)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА, СПОСОБ ПРОДУЦИРОВАНИЯ ТРИПТОФАНА

(57) Реферат:
Изобретение относится к микробиологии, а именно к способам получения микроорганизмов для продуцирования триптофана и способам продуцирования триптофана. Изобретение позволяет получить микроорганизмы с повышенной степенью

продуцирования триптофана. В штамм микроорганизма вводят устойчивый к регуляции по типу обратной связи Ser A - аллель с величиной K_i для серина между 0,1 мМ и 50 мМ. Полученный микроорганизм используют в качестве продуцента триптофана. 2 с.п. ф-лы, 19 ил., 3 табл.

RU 2 1 1 1 2 4 7 C 1

RU 2 1 1 1 2 4 7 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 111 247** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 1/20, 1/21, 15/01, C
12 P 13/22**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95113171/13, 23.09.1993
(30) Priority: 28.09.1992 DE P 4232468.8
(46) Date of publication: 20.05.1998
(86) PCT application:
EP 93/02588 (23.09.93)

(71) Applicant:
Konsortium Fjur Ehlektrokhemishe Industri
GmbH (DE)
(72) Inventor: Gjunter Vikh[DE],
Val'fred Ljajnfel'der[DE], Kejt Behkman[US]
(73) Proprietor:
Konsortium Fjur Ehlektrokhemishe Industri
GmbH (DE)

(54) **METHOD OF PREPARING MICROORGANISM STRAIN, METHOD OF TRYPTOPHAM PRODUCING**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology, amino acids production. SUBSTANCE: method involves insertion of Ser A-allele in microorganism strain. This allele shows resistance to regulation by feed-back inhibition type, its value \$\$\$ for serine is between 0.1 mM and

50 mM. Obtained microorganism is used as a producer of tryptophan. Invention ensures to obtain microorganisms showing the increased degree of tryptophan production. EFFECT: improved method of microorganism preparing. 2 cl, 3 tbl, 19 dwg

RU 2 1 1 1 2 4 7 C 1

RU 2 1 1 1 2 4 7 C 1

Изобретение относится к микроорганизмам для продуцирования триптофана и способам их получения.

Известно, что метаболизм триптофана во всех до сих пор исследованных микроорганизмах протекает по единому пути биосинтеза (Somerville, R.Z., Hermann, K. M., 1983, Aminoacids, Biosynthesis and Genetic Regulation, Adelson-Wesley Publishing Company, США: 301-322 и 351-378; Aida и др., 1986, Biotechnology of amino acid production, progress in industrial microbiology, т.24, Elsevier Science Publishers, Амстердам: 188 - 206). Метаболизм триптофана, его связь с метаболизмом серина, а также кодирующие важнейшие ферменты гены представлены на фиг. 5.

Известные способы продуцирования триптофана основываются на том, что измененный *trpE*-ген, который копирует нечувствительную к триптофану антранилатсинтазу, вместе с другими генами *trp*- оперона экспримируется на пригодном автономно-реплицируемом векторе. Благодаря более высокому числу генов приходят к повышенной экспрессии *trp*-генов и соответственно к повышенному количеству отдельных ферментов метаболизма триптофана. Это приводит к сверхпродуцированию триптофана.

Примеры таких способов описаны для ряда организмов: например для *E. coli*: европейский патент N 0293207, патент США N 4371614; для *Bacillus* (*Bacillus*): патент США N 4588687; для коринебактерии и брeвибактерии: европейский патент N 0388474. В случае этих способов возникает ряд проблем при осуществлении процесса. Это может быть нестабильность и потеря вектора или замедленный рост продуцирующего штамма.

В европейском патенте NA-0401375 (заявитель; Kyowa Hakko Kogyo Co.) описывается способ продуцирования L-триптофана с помощью штаммов коринебактерий и брeвибактерий, которые содержат рекомбинантные плазмиды. Эти плазмиды несут генетическую информацию для синтеза ферментов ДАНР-синтазы, антранилатсинтазы, индол-3-глицерин-Р-синтазы, триптофансинтазы и фосфоглицератдегидрогеназы. Применяют устойчивые к регуляции по типу обратной связи аллели антранилатсинтазы.

Далее, известно повышение продуцирования триптофана в штаммах с регулируемым метаболизмом триптофана за счет введения нескольких генов дикого типа *ser A* или *ser A*, *B*, *C*. Так, в Chemical Abstracts (С.А.)III (1989) 16 86 88 g и С.А. III (1989) 16 86 89 г описывается применение штаммов *Bacillus*, которые переэкспримируют *ser A* -аллель дикого типа, соответственно все гены дикого типа метаболизма серина (*ser A*, *ser B* и *ser C*) на плаزمиде для продуцирования триптофана. В ВОИС-A-87/01130 описывается использование *ser A*-, *ser B*-, *ser C*-аллелей дикого типа для продуцирования триптофана в *E. coli*.

Повышение выхода триптофана за счет предотвращения разложения серина в клетке известно из европейского патента N A-

0149539 (заявитель: Stauffer Chemical Company). В этой заявке на патент описываются *E. coli* K12 - мутанты, в которых разрушен разлагающий серин фермент сериндеаминаза (*Sda*). Там описывается также применение таких штаммов для продуцирования аминокислот. В примере VIII описывается использование такого штамма для сверхпродуцирования триптофана из антранилата. Улучшенный по сравнению со штаммом с интактной сериндеаминазой выход триптофана в европейской заявке на патент объясняется тем, что в микроорганизмах, в которых запас триптофана на предшествующей стадии очень высок, серин, соответственно производительность биосинтеза серина является фактором, лимитирующим скорость продуцирования триптофана.

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения триптофана путем глубинного культивирования продуцирующих его микроорганизмов *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15 в условиях аэрации на питательной среде (SU, авторское свидетельство, 990814, кл. С 12 Р 13/22, 1983).

Задачей изобретения является поиск микроорганизмов, которые в повышенной степени продуцируют триптофан, и разработка способов, которые позволяют получать такие микроорганизмы.

Задача решается благодаря штаммам микроорганизмов, которые отличаются тем, что они обладают регулируемым метаболизмом триптофана и разрегулированным по крайней мере за счет устойчивого к регуляции по типу обратной связи *ser A*-аллеля метаболизмом серина.

В изобретении под устойчивыми к регуляции по типу обратной связи *ser A*-аллелями нужно понимать мутанты *ser A*-гена, которые кодируют фосфоглицератдегидрогеназу с чувствительностью к серину, пониженной по сравнению с соответствующей фосфоглицератдегидрогеназой дикого типа соответствующего микроорганизма.

Благодаря предлагаемой согласно изобретению комбинации по меньшей мере одного устойчивого к регуляции по типу обратной связи *ser A*-аллеля с микроорганизмом с разрегулированным метаболизмом триптофана удивительным образом повышается выход триптофана вплоть до в 2,6 раза по сравнению с выходом, которого можно достигать с помощью тех же микроорганизмов без устойчивого к регуляции по типу обратной связи *ser A*-аллеля при прочих равных условиях культивирования.

То, что предлагаемые в изобретении штаммы в повышенной степени продуцируют триптофан, является неожиданным, так как устойчивые к регуляции по типу обратной связи *ser A*-аллели обладают эффектом только при высоком внутриклеточном уровне серина (Tosa T., Piger L.T., 1971, Journal of Bacteriology, т. 106: 972 - 982; Winicov J., Piger L.T. 1974, Journal of Biological Chemistry, т. 249, с. 1348 - 1355). Согласно уровню техники (например, европейский патент NA-0149539), микроорганизмы с разрегулированным метаболизмом триптофана, однако, имеют низкий уровень серина. Поэтому благодаря предлагаемому

согласно изобретению введению устойчивого к регуляции по типу обратной связи *ser* A-аллеля в микроорганизмы с разрегулированным метаболизмом триптофана нельзя ожидать никакого повышения продуцирования триптофана.

Так как в случае всех известных микроорганизмов метаболизм триптофана протекает по представленному на фиг. 5 пути метаболизма и применяемые для получения предлагаемых в изобретении штаммов способы в принципе известны и применимы ко всем микроорганизмам, предлагаемые согласно изобретению штаммы получают из любых микроорганизмов.

Для получения предлагаемого согласно изобретению штамма предпочтительно пригодны бактерии. Особенно предпочтительны грамотрицательные бактерии, в особенности *E. coli*.

Предлагаемые согласно изобретению штаммы можно получать таким образом, что в любом триптофан-прототрофном исходном штамме полностью или частично ликвидируется регуляция метаболизма триптофана и в этот штамм вводится устойчивый к регуляции по типу обратной связи *ser* A-аллель.

Предлагаемые согласно изобретению штаммы также можно получать таким образом, что в триптофан-ауксотрофных исходных штаммах восстанавливают способность синтезировать триптофан, причем реконструированный метаболизм триптофана разрегулирован, и в такие штаммы вводят устойчивый к регуляции по типу обратной связи *ser* A-аллель.

Разрегулирование метаболизма триптофана в микроорганизмах возможно за счет ряда различных способов, которые известны из уровня техники.

Возможностью разрегулирования метаболизма триптофана является изменение фермента анранилатсинтазы. Этот фермент во всех микроорганизмах катализирует первую стадию специфического в отношении триптофана биосинтеза. Он подавляется в своей активности триптофаном и в зависимости от количества триптофана тем самым регулирует поток метаболитов за счет пути биосинтеза триптофана. Фермент кодируется *trp* E-геном.

Измененные *trp* E-гены, которые кодируют анранилатсинтазы с пониженной по сравнению с соответствующей анранилатсинтазой дикого типа чувствительностью по отношению к триптофану, в дальнейшем обозначаемые также как устойчивые к регуляции по типу обратной связи *trp* E-аллели, можно получать путем мутагенеза и последующей селекции триптофан-прототрофного исходного штамма. Для этой цели соответствующий штамм подвергают индуцирующей мутации обработке (Miller J.H. 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, США: 113-185).

Обработанный штамм выращивают на питательной среде, которая содержит по меньшей мере один антагонист триптофана в количестве, достаточном для подавления штамма в росте. Примерами пригодных антагонистов триптофана являются 4-метилтриптофан, 5-метилтриптофан, 6-метилтриптофан, галогенированные

триптофаны, триптазан, индол, индолакриловая кислота.

Резистентные клоны испытывают на чувствительность к триптофану их анранилатсинтазы. Для определения чувствительности к триптофану анранилатсинтазы можно использовать любой метод, который позволяет определять активность этого фермента в присутствии триптофана. Например, хорисмат в пригодной буферной системе можно вводить во взаимодействие с его реакционным компонентом глутамином при ферментативном катализе (Bauerle R. и др., 1987, Methods in Eugymology, 142, 366-386). Из тест-смеси кинетически отбирают аликвоту и с помощью ВЭЖХ-анализа определяют образующееся во времени количество продукта реакции. Образующееся во времени (в единицу времени) количество анранилата является прямой мерой активности анранилатсинтазы. Тест осуществляют в присутствии и в отсутствие триптофана, чтобы определить чувствительность испытываемой анранилатсинтазы.

Также можно получать нечувствительные к триптофану *trp* E-аллели путем прямого способа геной инженерии (Bauerle R. и др., 1987, Methods in Engymology, 142, 366 - 386). Описано число мутаций в аминокислотной последовательности анранилатсинтазы различных организмов, которое приводит к пониженной чувствительности фермента по отношению к триптофану (например, для сальмонеллы; Caliguiri M. G., Baucle R., 1991, J. of Biol. Chem., 266, 8328 - 8335, для бревибактерии, коринебактерии: Mafsuji K. и др., 1987, J. Bact., 169, 5330 - 5332).

Известны методы, которые позволяют проводить в ДНК-фрагменте, в специфическом сайте, мутацию. Такие методы описаны в следующих публикациях: Sakar G., Sommerauer S.S., 1990, Bio Techniques, 8, 404-407 описывают зависящий от реакции цепи полимеразы сайт-направленный мутагенез; Ausubel F.M. и др. 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates описывают зависящие от фага M13 методы; Smith M., 1985, Ann. Rev. Genet. 19 423 - 462 описывает другие методы.

ДНК-фрагмент, который охватывает *trp* E-ген дикого типа, рекомбинируется с помощью уже описанных стандартных способов для получения рекомбинантной ДНК на векторе. Благодаря применению вышеуказанных методов сайт-направленного мутагенеза один или несколько нуклеотидов ДНК-последовательности изменяют так, что закодированная теперь геном аминокислотная последовательность соответствует аминокислотной последовательности нечувствительной к триптофану анранилатсинтазы. С помощью описанных способов в любом *trp* E-гене можно проводить одну или несколько мутаций, которые способствуют тому, что закодированная анранилатсинтаза имеет приводящую к нечувствительности к триптофану аминокислотную последовательность.

Дополнительно желательны, но необязательны в предлагаемом согласно изобретению штамме следующие свойства: дефектный белок-репрессор триптофана,

дефектный аттенуационный контроль экспрессии *trp*-оперона, дефектная триптофаназа. Эти свойства могут достигаться в предлагаемом согласно изобретению штамме проще всего путем выбора исходного штамма, который уже имеет одно или несколько соответствующих свойств. Получение или выбор можно осуществлять путем комбинации указанных далее методов селекции.

Белок-репрессор триптофана представляет собой высший регуляторный белок биосинтеза триптофана. Вместе с триптофаном в качестве апорепрессора этот белок репримирует экспрессию *trp*-оперон-генов. Белок кодирует геном *trp* R.

Мутанты-репрессоры триптофана можно выбирать, например, среди мутантов, которые резистентны против антагонистов триптофана, например, 5-метилтриптофан. Примеры описываются в *J. Mol. Biol.* 44, 1969, 185-193, или *Genetics*, 52, 1965, 1303-1316.

Наряду с контролем с помощью *trp* R-кодированного белка *trp*-оперон дополнительно подлежит аттенуационному контролю. Ответственным за регуляцию является ДНК-участок до первого гена *trp*-оперона. Мутации или делеции в этой области могут приводить к разрегулированию. Такие мутанты можно выбирать среди мутантов, которые резистентны к антагонистам триптофана, как 5-метилтриптофан. Между прочим, такие мутации, особенно делеции, получают тем, что благодаря способу сайт-направленного мутагенеза индуцируют это изменение сайт-специфически в аттенуационной области ДНК. За счет уже описанных способов сайт-специфического мутагенеза можно рекомбинировать инактивированную аттенуационную область в хромосоме предлагаемого в изобретении штамма на участке природной аттенуационной области.

Фермент триптофаназа (*tna* A) катализирует разложение триптофана на индол, пируват и NH₃. Желательно, чтобы этот фермент был неактивен в штаммах продуцирования триптофана. Штаммы, которые дефектны в этом ферменте, можно получать таким образом, что организмы подвергают мутагенной обработке и среди мутантов ищут такие, которые более не в состоянии использовать триптофан в качестве источника углерода и азота. Подобный пример описывается в *J. Bact.* 85, 1965, 680-685. Альтернативно также можно с помощью вышеуказанных способов проводить сайт-специфические делеции в *tnaA*-гене, которые приводят к инактивации.

Ряд дополнительных мутаций исходного штамма пригоден для того, чтобы способствовать дальнейшему увеличению продуцирования триптофана. Так, наряду со способом биосинтеза триптофана дополнительно предпочтителен нечувствительный к регуляции общий путь биосинтеза ароматических аминокислот (способ через шикимовую кислоту). Поэтому штаммы, которые обладают нечувствительной к регуляции синтазой дегидроарабиногептулозоновой кислоты и белок-репрессор тирозина (*tyr* R) которых инактивирован за счет мутации штаммов для получения предлагаемых согласно

изобретению штаммов. Также предпочтительны штаммы, метаболизм фенилаланина и тирозина которых нарушен. Благодаря этому обеспечивается исключительное превращение молекулы-предшественника хорисмата в триптофан. Такие штаммы имеют, например, мутации или делеции в генах *phe* A и/или *tyr* A.

Известен ряд штаммов, которые разрегулированы в одной или нескольких стадиях биосинтеза триптофана или в способе получения через шикимовую кислоту и перепродуцируют триптофан. Примерами являются *Bacillus subtilis* Ferm BP-4, Ferm P 1483 (патент ФРГ N 3123001); *Brevibacterium flavum* ATCC 21427 (патент США N 3849251); *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21842-21851 (патент США N 3594279, патент США N 3849251); *Micrococcus luteus* ATCC 21102 (патент США N 3385762), *E. coli* ATCC 31743 (патент Канады N 1182409). Эти штаммы также пригодны в качестве исходных штаммов для получения предлагаемых согласно изобретению штаммов. Они показывают, что штаммы продуцирования триптофана согласно изобретению можно получать в самых различных группах организмов.

Наряду со штаммами с разрегулированным метаболизмом триптофана для получения предлагаемых согласно изобретению штаммов необходим по меньшей мере один ген, который кодирует фосфоглицератдегидрогеназу с пониженной по сравнению с соответствующей фосфоглицератдегидрогеназой дикого типа чувствительностью к серину.

Фосфоглицератдегидрогеназа (PGD) кодируется геном *ser* A. Последовательность *ser* A-гена дикого типа известна (Tobey K.L., Grant G.A., 1986, *J. Bac.* 261, N 26, 1279-1283). Сверхэкспрессия продукта, вырабатываемого *ser* A-геном дикого типа, через плазмидный вектор также известна (Schuller и др., 1989, *J. Biol. Chem.* 264, 2645-2648).

Получение устойчивых к регуляции по типу обратной связи *ser* A-аллелей с помощью классических генетических способов описывается у Tosa T., Piger L.T., 1971, *J. Bac.*, 106 N 3, 972-982. При этом селекцию осуществляют через резистентность мутантов по отношению к аналогу серина - серингидроксамату. Мутации в этом литературном источнике подробнее не охарактеризовываются; влияние мутации на метаболизм не исследуется.

Устойчивые к регуляции по типу обратной связи *ser* A-аллели, например, также получают тем, что микроорганизмы подвергают мутагенезу. В качестве мутагенов принимают во внимание УФ-облучение и любые химические мутагены, как например этилметансульфонат или N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин. Дозировку и длительность экспозиции выбранного мутагена определяют обычным способом (Miller J.H., 1972, *Experiments in molecular Genetics*, Cold Spruig Harbor Laboratories, США, 113-143).

Обработанные мутагеном популяции организмов подвергают селекции на клоны с *ser* A-генами, которые кодируют нечувствительные к серину

фосфолицератдегидрогеназы. Например, обработанную мутагеном популяцию инкубируют на твердой среде культивирования, которая содержит серингидроксамат в достаточном количестве, чтобы подавлять рост нерезистентных бактерий. Резистентные клоны испытывают на чувствительность в серину их фосфолицератдегидрогеназы. Например, вариант осуществления этого способа описывается у Tosa и Piger, 1972, J. Bact., 100, N 3, 972-982.

Аллели, которые кодируют нечувствительную к серину фосфолицератдегидрогеназу, также можно получать с помощью способов генной инженерии.

Участок PGD, который способствует регуляции серина, находится в С-концевой области белка. Поэтому вставки, замещения или делеции отдельных или нескольких аминокислот предпочтительно осуществляют в 25% С-концевых аминокислот, PGD-белка, особенно предпочтительно в 50% С-концевых аминокислот PGD-белка. Это приводит к пониженной чувствительности PGD к серину.

Аллели, которые кодируют такие PGDs, получают тем, что изменяют 3'-область сег А-гена, который кодирует указанные С-концевые области PGD. Для этой цели неизменный сег А-ген путем применения известных специалисту приемов для получения рекомбинантной ДНК, таких как рестрикция, лигирование и трансформация (Maniatis T., Fritsch E.F., и Sambrook J., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory), рекомбинируют на векторе клонирования. Специфические изменения в 3'-области структурного гена достигается, например, путем приемов сайт-направленного мутагенеза.

Примеры нечувствительных к серину PGDs, которые пригодны для экспрессии в микроорганизмах с разрегулированным метаболизмом триптофана, приводятся в табл. 1 в виде представленных их С-концевых аминокислотных последовательностей. Вплоть до представленной области белковые последовательности ферментов не отличаются от последовательностей дикого типа.

Для того чтобы испытывать генные продукты сег А-аллелей на PGD-активность и чувствительность к серину, применяют следующие тесты:

PGD-Активность определяют путем обнаружения прямой или обратной реакции фермента по методу Mckitrick J.C. и Lewis J.P., 1980, J.Bact., 141 235-245. Активность фермента при этом измеряется без серина и с различными концентрациями серина. Указанный тест пригоден для определения чувствительности к серину любой фосфолицератдегидрогеназы. Также можно применять любой другой способ измерения PGD-активности.

В качестве меры чувствительности к серину фермента служит K_i -значение, т. е. концентрации серина, которые подавляют активность фермента на 50% K_i -значения и С-концевые аминокислотные последовательности некоторых устойчивых к регуляции по типу обратной связи сег А-аллелей, а также сег А-гена дикого типа

(ser AWT) представлены в табл. 1.

Для получения предлагаемых согласно изобретению штаммов предпочтительно пригодны сег А-аллели с K_i -значением 100 μ М - 50 мМ.

5 Для экспрессии PGD-белков в предлагаемом согласно изобретению штамме можно использовать любой рекомбинантный вектор, который приводит к экспрессии нечувствительного к серину сег А-аллеля. Пригодный для получения предлагаемых в изобретении штаммов рекомбинантный вектор охватывает по меньшей мере сег А-ген, который кодирует PGD, обладающую пониженной по сравнению с диким типом чувствительностью по отношению к серину, и долю вектора, который автономно реплицируется в реципиентном штамме.

10 Примеры векторов, которые автономно реплицируются в E.coli, указаны у Pouwels P.H., Enger - Ualk B.E., Brammer W.J., 1985, Cloning Vectors, Elsevier, Амстердам. Такими векторами являются:

20 плазмиды с высоким числом копий, например pBR 322, pUC12;

плазмиды со средним числом копий, например pACYC1184, 177;

25 плазмиды с низким числом копий, например pSC101,

векторы-фаги, например M13, λ -векторы.

30 Сравниваемые векторы описываются для большого числа бактерий (например, в европейском патенте N 0401735 для коринебактерий и брeвибактерий или в С. А. 111 (1989) 168588g).

Предпочтительно пригодны векторы с числом копий от среднего до низкого; особенно предпочтительны векторы с р15А-репликоном, такие как pACYC184 (ATCC 37033) или pAC1C177 (ATCC 37031).

35 Большое число векторов для других бактерий описано в литературе (Pouwels и др., 1985, Cloning Vectors Elsevier Science Publishers, Амстердам).

40 Пригодные рекомбинантные векторы можно получать с помощью стандартных способов для получения рекомбинантной ДНК. Эти способы подробно описаны, например, у Maniatis T., Fritsch E.F., и Sambrook H., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, США; или Ausubel F.M. и др., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, США.

Получение рекомбинантных векторов, например, возможно благодаря тому, что ДНК донорного организма, который имеет сег А-аллель в хромосоме или на рекомбинантном векторе, кодирующий нечувствительную к серину PGD, фрагментируют с помощью рестрикционных ферментов.

45 Фрагментированную ДНК легируют с помощью обычных методов, например путем использования фермента T4-ДНК-лигазы, с также переведенной в линейную форму с помощью рестрикционных ферментов векторной молекулой. Смесь после легирования используют для того, чтобы трансформировать реципиентные штаммы с разрегулированным метаболизмом триптофана известными способами, такими как кальцийхлоридный шок или электропорация. Векторы, которые содержат желательные сег А-аллели, могут получаться в реципиентных штаммах, например,

60

благодаря вышеуказанным способам, например селекции на резистентность к антибиотикам или комплементирование *ser* A-мутаций.

В следующем варианте осуществления предлагаемых согласно изобретению штаммов *ser* A-аллели интегрируют в виде единичных копий в хромосомы. Это может достигаться, во-первых, благодаря тому, что вышеописанные стратегии в отношении мутагенеза и селекции осуществляют с помощью триптофанразрегулированного исходного штамма. Во-вторых, также можно *ser* A-аллели, которые находятся на рекомбинатных векторах, интегрировать в хромосому продуцируемого штамма. Число методов для такой интеграции известно. Описания этих способов (приемов) см. в следующих публикациях:

Интеграция через посредство Lambda - фагов: Balakrishnan и Backmann, 1998, Gene, 67, 97-103; Simons R.W. и др. 1987, Gene, 53, 85-89; гес D-зависимая замена гена: Shervell и др., 1987, J. Bact., 141,235-245; другие методы: Silhavy и др., 1988, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory.

При ферментации предлагаемых согласно изобретению штаммов оказалось, что штаммы, содержащие устойчивый к регуляции по типу обратной связи *ser* A-аллель с K_i -значением для серина от 100 μ M до 50 mM и с разрегулированным метаболизмом триптофана и содержащие *trp* E-аллель с K_i -значением для триптофана 0,1 mM - 20 mM, дают самый высокий выход триптофана.

Пример 1. Скрининг устойчивых к регуляции по типу обратной связи *trp* E-аллелей и интеграция этих аллелей в хромосому.

Для поиска устойчивых к регуляции по типу обратной связи *trp*E-аллелей используют триптофан-аналог: 5-метилтриптофан. В качестве мутагенного агента служит N-метил-N'-нитро-N-нитрозо-гуанидин (NG). Используемым исходным штаммом является *E. coli* K12 УМС9 ATCC 33927. При осуществлении мутагенеза руководствуются указаниями Miller (Miller J.H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Нью-Йорк, 125-129).

Примерно $2 \cdot 10^9$ клеток УМС9 из экспоненциальной фазы роста культуры, выращиваемой в LB, помещенных в 4 мл 0,1 M натрийцитратного буфера с pH 5,5, инкубируют в течение 30 мин при 37°C с 50 мкг/мл NG. После двукратной промывки с помощью 0,1 M фосфатного буфера с pH 7,0, 0,1 мл клеток выдерживают в течение ночи при 37°C при встряхивании в LB. Затем 0,1 мл клеток из различных разбавлений (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} в 0,9% NaCl) наносят на пластины с минимальной средой со 100 мкг/мл 5-метилтриптофана. Наряду с 5-метилтриптофаном минимальная среда содержит 5 г/л глюкозы; 5 мг/л витамина B₁; 3 г/л KH₂PO₄; 12 г/л K₂HPO₄; 0,3 г/л MgSO₄•7H₂O; 0,1 г/л NaCl; 5 г/л (NH₄)₂SO₄; 14,7 мг/л CaCl₂•2H₂O; 2 мг/л FeSO₄•7H₂O; 1 г/л Na₃-цитрата и 15 г/л агара. Спустя 24 - 48 ч выдерживания при 37 °C

субкультивируются резистентные 5-метилтриптофану клоны и разъединяются на вышеуказанных пластинах.

Для характеристики полученных мутантов определяют K_i -значение для вырабатываемого *trp*E-геном продукта триптофана (Bauerle R. и др., 1987, Methods in Enzymology, 142, 366-386). При этом мутанты можно подразделять на два класса. Мутанты класса 1 включают устойчивые к регуляции по типу обратной связи антранилатсинтазы. Мутанты класса 2 включают ферменты с повышенной антранилатсинтаза-активностью при неизменном K_i -значении.

Для охарактеризования на молекулярном уровне соответствующие ДНК-области различных мутантов клонируют и секвенируют. Для этой цели соответствующую хромосомную ДНК изолируют и расщепляют в смеси с рестрикционными ферментами NheI и ClaI. Фрагменты величиной примерно 5 к.о. (тысяч пар оснований) изолируют и лигируют с размером 4158 п.о. (комплементарных пар гетероциклических оснований ДНК) NheI/ClaI - фрагментом pBR 322. Легированную смесь трансформируют в *trp*E-штамм *E. coli* KB 862 (DSM 7196). Селектируют на клоны, которые могут расти на минимальной среде без триптофана. Все комплементирующие плазмиды содержат величиной 5 к.о. Nhe I/Cla I-фрагмент. Наряду с *trp*E- и *trp*D-генами этот размером 5 к.о. NheI/ClaI-фрагмент содержит также ДНК-области, идущие вверх от *trp*E (примерно 0,8 к.о.) и вниз от *trp*D (примерно 1 к.о.). В табл. 2 перечислены различия аминокислотных последовательностей и K_i -значения мутантов класса 1. В непредставленных областях последовательности мутантов совпадают с последовательностью дикого типа.

Анализ на секвенирование мутантов класса 2 показывает, что мутации имеют место либо в области оператора *trp*-промотора, либо в ДНК-области, которая кодирует *trp*-лидерный-пептид. Обозначаемые с помощью Δ *trp*L1 и соответственно Δ *trp*L2 мутации имеют 136 п.о. и соответственно 110 п.о. - делецию в ДНК-области, которая кодирует лидерный пептид. В случае Δ *trp*L1 мутации делеция охватывает область от нуклеотидной позиции 33 вплоть до позиции 168, в случае Δ *trp*L2 мутации - область от нуклеотидной позиции 11 до позиции 120 в хранящейся под AC-номером V 00372 в EMBL-банке данных последовательности.

Для того чтобы достичь более сильной экспрессии устойчивых к регуляции по типу обратной связи *trp* E-аллелей, комбинируют оба класса мутантов. Для этой цели применяют мутацию Δ *trp*L1 класса 2. На фиг. 6 схематически представлено положение Δ *trp* L1-мутации (класс 2) и мутаций *trp* E0, *trp* E5, *trp* E6 и *trp* E8 (класс 1).

Из плазмиды p Δ *trp*L (фиг. 6) выделяют размером 1,6 к.о. NruI-фрагмент, который несет Δ *trp*L1-мутацию, и обменивают на соответствующий NruI-фрагмент дикого типа плазмид pE0, pE5, pE6, соответственно, pE8 (фиг. 6). Полученные плазмиды обозначают pE0, pE5, pE6, соответственно pE8 и применяют для хромосомной интеграции путем гомологичной рекомбинации. Для этой

цели из указанных плазмид выделяют соответствующий, величиной примерно 5 к.о., хромосомный NheI / ClaI-фрагмент, такой как описанный в примере 2, из агарозы с низкой температурой плавления и трансформируют в линейной форме в recD - штамм PD 106 (Δ trp LD 102). В качестве метода трансформации используют CaCl₂-метод согласно Cohen и др., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69, 2110-2114. Штамм PD 106 депонирован согласно будапештскому соглашению от 28.07.1992 в немецкой коллекции микроорганизмов (DSM) под номером 7195 (DSM 7195). Селекционируют на клоны, которые могут расти на минимальной среде без триптофана и чувствительны к ампициллину, т.е. свободны от плазмиды. Благодаря P1-трансдукции (Miller J.H., 1972, Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, 201-205) trpE-аллели, которые кодируют различно устойчивые в регуляции по типу обратной связи trpE-ферменты и, смотря по обстоятельствам, скомбинированы с Δ trpL1-мутацией, из соответствующих штаммов переводятся в KB 862. Штамм KB 862, согласно будапештскому соглашению от 28.07.1992 г., депонирован в немецкой коллекции микроорганизмов (DSM) под номером 7196 (DSM 7196). Селекцию осуществляют при выращивании на свободной от триптофана минимальной среде. Полученные штаммы обозначают как PD 103 (trp E0), KB 862 (trp E5), SV 164 (trp E8) и SV 163 (trp E6).

Пример 2. Получение ser A-генов, которые кодируют нечувствительные к серину фосфоглицератдегидрогеназы.

ser A-Ген дикого типа из E.Coli - штамма E.coli B (ATCC 23226) клонируют на плазмидном векторе pUC 18.

Для того чтобы получить хромосомную ДНК этого штамма, его выращивают в течение ночи при 37°C в питательной среде Лурия. Клетки бактерий собирают путем центрифугирования (4000 g). Лизис клеток и очистку ДНК осуществляют согласно протоколу, описанному Ausubel и др., 1987, 2.4.1 - 2.4.2, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates. Полученное количество ДНК определяют спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Выходы составляют 600 мкг/100 мл.

10 мкг Хромосомной ДНК расщепляют с помощью рестрикционного фермента SphI (Boehringer Mannheim GmbH) при указанных изготовителем условиях. Примерно 3 мкг смеси фрагментов лигируют с 0,2 мкг также SphI-разрезанного автономного реплицируемого плазмидного вектора pUC18 (фирма Boehringer Mannheim GmbH) за счет фермента T₄-лигазы (фирма Boehringer Mannheim GmbH) при предписанных изготовителем условиях. Лигированную смесь используют для того, чтобы трансформировать ser A-мутанты PC 1523 (CGSC # : 5411) (CGSC E.coli Genetic Stock Centre, Department of Biology 255 OML, Yale University, Postbox 6666, New Haven, CT, USA). В качестве способа трансформации применяют CaCl₂-метод Cohen и др., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci., США, 69, 2110-2114. Трансформированные бактерии высевают на

минимальную среду без серина. Клоны, которые растут без серина, содержат ser A-ген из E.coli на 3,5 к.о. SphI-фрагмента. Последовательность дикого типа Ser A-гена воспроизведена на фиг. 7-9 (SEQ ID N 13; SEQ ID N 14). Рекомбинантный вектор с ser A-геном обозначен как pGC3 (фиг. 10).

ser A-Аллель ser A5 получают тем, что плазмиду pGC3 разрезают с помощью рестрикционных ферментов Sall и KpnI (фирма Boehringer Mannheim GmbH), согласно указаниям изготовителя. Полученные фрагменты разделяют путем электрофореза на геле агарозы. Sall - KpnI-фрагмент величиной 2,0 к.о., который содержит полный ser A-ген вплоть до 8 С-концевого кодона, выделяют очищенным из геля. Для этой цели проводят электрофорез на "низкоплавкой" агарозе (фирма Boehringer Mannheim GmbH) так, что ДНК можно извлечь путем простого расплавления агарозы. 0,2 мкг этого фрагмента лигируют с эквимолекулярными количествами HindIII / Sall - разрезанного pUC18 и синтетически полученного двунитевого олигонуклеотида с помощью T₄-лигазы (фирма Boehringer Mannheim GmbH) согласно указаниям изготовителя. Нуклеотидная последовательность этого олигонуклеотида следующая:

```

5'                                     3'
      CATTTCGGCCCGTCTGCTGTAATA
CGTAGGTAAGCGCGGGCAGACGACATTATT CGA SEQ ID NO: 11
3'                                     5'

```

Этот олигонуклеотид дополняет 7 и 8 последних С-концевых кодонов ser A-генов. Вместо восьмого кодона вводится Stop-триплет TAA. Кодированная с помощью этого ser A-гена фосфоглицератдегидрогеназа таким образом сокращается на одну С-концевую аминокислоту. Аминокислотная последовательность измененной PGD представлена в табл. 1 (ser A5). Рекомбинантная плаزمида обозначается как pGH5 (фиг. 11). С помощью лигированной смеси трансформируют ser A-мутанты PC1523.

ser A-Аллель ser A1508 получают следующим образом. Плазмиду pGC3 разрезают с помощью SphI / Sall (фирма Boehringer Mannheim GmbH) согласно указаниям изготовителя. Фрагмент величиной 3 к.о., который несет полный ser A-ген, очищают электрофоретически и лигируют с разрезанным с помощью SphI / Sall вектором pUC 18. Полученная в результате плазмиды обозначается как pKB1321 (фиг. 12).

pKB1321 с рестрикционной эндонуклеазой Hind II (фирма Boehringer Mannheim GmbH) инкубируют в условиях, которые позволяют осуществлять только частичное разрезание (0,05 ед. фермента на 1 мкг ДНК в течение 10 мин, остальные реакционные условия согласно указаниям изготовителя). Благодаря этому образуется фракция фрагментов, которая разрезана в позиции 1793 ser A-гена с помощью Hind II. В этот сайт путем лигирования вводят ДНК-линкер с XbaI-сайтом. Последовательность ДНК-линкера следующая:

```

5'                                     3'
      TGCTCTAGAGCA
ACGAGATCTCGT SEQ ID NO: 12
3'                                     5'

```

Вставка приводит к PGD, которая на этом

участке содержит 4 дополнительные аминокислоты. Ее последовательность представлена в табл. 1. Плазмида со вставкой обозначается как pKB1508 (фиг. 13). Ее трансформируют в ser A-мутант PC1523.

ser A-Аллель сер А II получают тем, что плазмиду pGH5 разрезают с помощью Sall и KpnI (фирма Boehringer Mannheim GmbH) согласно указаниям изготовителя и фрагмент размером 2,8 к.о. из смеси фрагментов выделяют очищенным после гель-электрофореза из "низкоплавкой" агарозы. Этот фрагмент содержит векторную часть из pUC18 и С-концевую область ser A5. Плазмиду pKB 1508 также разрезают с помощью Sall /KpnI. ДНК-фрагмент величиной 2,0 к.о. элюируют из низкоплавящегося геля агарозы. Этот фрагмент содержит ser A-аллель ser A 1508 с инсерционной мутацией, однако отсутствуют 8 С-концевых кодонов. Оба фрагмента лигируют друг с другом и таким образом трансформируют ser А-мутанты PC 1523. Полученную в результате рекомбинантную плазмиду обозначают как pGH11 (фиг. 14). Кодированная фосфолипиддегидрогеназа объединяет инсерционную мутацию ser A 1508 с делеционной мутацией ser A5. Область с мутациями в кодированной аминокислотной последовательности представлена в табл. 1.

Для экспрессии измененных ser A-аллелей в продуцирующих штаммах их переклонировывают в векторе pACVC (ATCC 37033), векторе со средним числом копий. Для этой цели плазмиду pGH5 и плазмиду pGH11 разрезают с помощью Sall / Hind III и, смотря по обстоятельствам, величиной примерно 2 к.о., содержащие ser A-аллели ser A5 и ser A1 ДНК-фрагменты выделяют из "низкоплавких" гелей агарозы. Фрагменты в разделенных смесях обрабатывают фрагментом Кленова ДНК-полимеразы-1 из E.coli (фирмы Boehringer Mannheim GmbH) согласно предписанию изготовителя, чтобы 5'-выступающие концы среза рестрикционных ферментов перевести в ровные концы. Для этой цели 1 мкг соответствующего фрагмента в 20 мкл реакционной смеси смешивают с 5 ед. фермента Кленова, 0,5 мМ dATP, dGTP, dTTP и dCTP рекомендуемым изготовителем буфером и инкубируют в течение 15 мин при 30°C.

С ровными концами ДНК-фрагменты лигируют, смотря по обстоятельствам, с разрезанным с помощью PvuII вектором pAC1C 184. Лигированные смеси используют для трансформации ser А-мутантов PC 1523. Комплементирующие плазмиды получили названия pGH5/11, соответственно pGH 11/11 (фиг. 15, 16). Плазмиду pKB 1508 разрезают с помощью Sall / SphI. Фрагмент величиной 3 к.о., который содержит ser А-аллель ser A 1508, очищают путем гель-электрофореза. Фрагмент, который, как описано выше, становится ровным на концах, лигируют с разрезанным с помощью PvuII вектором pACYC 184, и лигированную смесь трансформируют в E. coli PC 1523. Комплементирующие плазмиды получили названия pKB 1508/11 (фиг. 17).

Плазмиды pGH5/11 (ser A5), pGH11/11 (ser A11) и pKB 1508/11 используют для трансформации штаммов PD 103 (tr pE0), KB 862 (tr pE5) SV 164 (tr pE8), SV 163 (tr pE6).

Пример 3. Конструирование

хромосомного, устойчивого к регуляции по типу обратной связи ser A5-аллеля с помощью рекомбинантного λ -профага.

Для интеграции в хромосомный Lambda - "сайт связывания" (att λ) ser A5-аллель клонируют в плазмиде pRS 551 (Simons и др., 1987, Gene 53, 85 - 96). Для этой цели величиной примерно 2 к.о. ser A5-несущий Hind III / Sall-фрагмент выделяют из плазмиды pGH5. 5'-Выступающие концы дополняют с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы 1 (фирма Boehringer Mannheim GmbH) согласно указаниям изготовителя и после присоединения EcoRI-линкеров (Maniatis и др., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, с. 396 - 397), размером 2 к.о. фрагмент лигируют с расщеплением с помощью EcoRI вектором pR S551. Рекомбинантную плазмиду выбирают и обозначают как pRS5.

Путем приготовления лизата по методу агаровых слоев на несущем pRS5 гес А⁺-штамме (например, Y MC9 ATCC 33927) с λ RS45-фагом получают ин виво, путем гомологичной рекомбинации, гетерогенный λ -лизат, который наряду с λ RS45-фагом содержит также рекомбинантные, ser A5-несущие λ RS45-производные (Simons и др., 1987, Gene, 53, 85 - 96).

Для селекции на рекомбинантных λ RS45-производных применяют ser А-штамм PC 1523 (CGSC # : 5421). Для этой цели PC1523 инфицируют с помощью гетерогенного λ -лизата (см. выше) и затем пассируют на содержащих канамицин (25 мг/л) LB-планшетах. Полученные лизогенные, резистентные к канамицину клоны затем испытывают на их способность расти на планшетах с минимальной средой без серина. Серин-прототрофный клон выбирают и применяют для получения гомогенного ser A5-лизата (путем УФ-индукции; Simons и др., 1987, Gene, 53, 85 - 96).

С помощью этого гомогенного ser A5- λ -лизата инфицируют продуцирующий триптофан штамм. Полученный штамм SV164 att λ :: ser A5, ферментируют, как описано в примере 4. Соответствующие среды вместо тетрациклина в качестве агента селекции содержат, смотря по обстоятельствам, 25 мг/л канамицина.

Выходы триптофана составляют 12,5 г/л по сравнению с 3,5 г/л при использовании такого же штамма, но без ser A5.

Пример 4. Продуцирование триптофана коринебактериями.

Плазмиду pGH5 разрезают с помощью рестрикционных ферментов Sall и Hind III (фирма Boehringer Mannheim GmbH) и величиной 2 к.о., содержащий ser А-ген ДНК-фрагмент выделяют из низкоплавкого геля агарозы. ДНК-фрагмент, как описано в примере 2, выравнивают на концах путем воздействия фрагмента Кленова ДНК-полимеразы 1 из E.coli (фирма Boehringer Mannheim GmbH). Вектор pWST1 разрезают с помощью рестрикционного фермента SmaI (фирма Boehringer) и лигируют с ровным на концах ДНК-фрагментом. Вектор pWST1 представляет собой челночный вектор E. coli

/коринебактерии и может реплицироваться как в *E. coli*, так и также в коринебактериях. Коринебактериальный репликон этого вектора происходит из штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC 19223. Получение вектора pWST1 описано в патенте США N A-4 965197. Лигированную смесь используют для трансформации *E. coli*-штамма PC 1523. Комплементирующие плазмиды получили названия pGH5/III (рис. 18).

Плазмиду pGH5/III используют для трансформации продуцирующей триптофан *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21851. Трансформация протекает через электропорацию согласно подробно описанному у Wolf H. и др., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 283-289 способу. Клоны, которые несут рекомбинантную плазмиду pGH5/III, селекционируют на агаровых пластинах с 25 мг/л канамицина по устойчивости к канамицину кодированной плазмидой.

Плазмиду pGC3 разрезают с помощью рестрикционных ферментов SphI и Sall. Величиной 2 к.о. ДНК-фрагмент, который несет аллель *ser A*-дикого типа, очищают и лигируют вышеуказанным образом с вектором pWST1. Полученный вектор pGC3/1 (фиг. 19) используют для трансформации *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21851.

Аналогичным образом получают штамм *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21581, который несет *ser A*-аллель 1455 на плазмиде.

При ферментации оказывается, что в случае штамма, который несет *ser A5*-аллель на плазмиде, достигаются самые высокие выходы триптофана.

Пример 5. Влияние различных, кодируемых плазмидой *ser A*-аллелей на продуцирование триптофана различными *trp E*-штаммами.

С помощью различных, представленных в табл. 3, продуцирующих триптофан штаммов, инфицируют внесенные в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл и 10 мл LB-среды (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl), которая смешана с 15 мг/л тетрациклина. После инкубации в течение 8 - 9 ч при встряхивании при 150 об./мин при 30 °С соответствующие предкультуры переносят в 100 мл SMI-среды. SMI-среда содержит 5 г/л глюкозы; 3 г/л KH_2PO_4 ; 12 г/л K_2HPO_4 ; 0,1 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 мг/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 г/л Na_3 цитрата $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 мл/л раствора микроэлементов (см. ниже); 40 мг/л L-фенилаланина; 40 мг/л L-тирозина; 5 мг/л витамина B₁ и 15 мг/л тетрациклина. Раствор микроэлементов составляет из 0,15 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,5 г/л H_3BO_3 ; 0,7 г/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 г/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,6 г/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 0,3 г/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Культуры встряхивают в колбах Эрленмейера емкостью 1 л при 30 °С в течение 12-16 ч при скорости 150 об./мин. После этой инкубации OD₆₀₀ составляет 2-4. Дальнейшую ферментацию осуществляют в ферментерах BIOSTAT[®]M фирмы Braun-Melsungen. Используют емкость для культивирования общим объемом 2 л.

Среда содержит 17,5 г/л глюкозы; 5 г/л

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 г/л NaCl; 0,3 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 мг/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 75 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 г/л Na_3 цитрат $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5 г/л KH_2PO_4 , 1 мл раствора микроэлементов (см. выше); 5 мг/л витамина B₁ (тиамин); 0,75 г/л L-фенилаланина; 0,75 г/л L-тирозина; 2,5 г/л дрожжевого экстракта (Difco); 2,5 г/л триптона (Difco) и 20 мг/л тетрациклина.

Концентрацию глюкозы в ферментере устанавливают путем закачки 700 г/л (вес/объем) раствора глюкозы (автоклавирован), при 17,5 г/л. Перед инокуляцией в ферментационную среду добавляют тетрациклин вплоть до конечной концентрации 20 мг/л. Далее устанавливают pH-значение 6,7 путем закачки 25%-ного раствора NH_4OH .

В емкость ферментера закачивают 100 мл предкультуры для инокуляции. Начальный объем составляет примерно 1 л. Культуры сначала перемешивают со скоростью мешалки 400 об./мин и пропускают 1,5 м³ стерилизованного через стерильный фильтр сжатого воздуха. Ферментацию проводят при температуре 30 °С.

pH-Значение поддерживают равным 6,7 за счет автоматической поправки с помощью 25%-ного раствора NH_4OH . Насыщение кислородом в культуральной жидкости ни в один момент времени ферментации не должно падать ниже 20%. Насыщение кислородом при ферментации контролируют за счет скорости мешалки.

Через двух-, трехчасовой интервал определяют содержание глюкозы в питательном растворе, оптическую плотность и выход триптофана. Определение содержания глюкозы осуществляют ферментативно с помощью анализатора глюкозы фирмы YSI. Концентрацию глюкозы устанавливают при 5 - 20 г/л за счет непрерывной добавки.

Содержание триптофана в среде после ферментации определяют с помощью ВЭЖХ. Среду разделяют на нуклеосил 100-7/C8 (250/4 мм; Macherey-Nagel). Колонка работает в изократическом режиме со скоростью истечения 2 мл/мин. В качестве элюирующего средства используют смесь воды с ацетонитрилом (83 : 17), к которой добавляют 0,1 мл H_3PO_4 (85%-ной) на литр. Детектируют либо с помощью диодного детектора (Diodenarraydetektor), либо при установленной длине волны 215, соответственно 275 нм. Спустя 44-50 ч ферментацию прерывают. Продуцированные количества триптофана в г/л при этой ферментации спустя 48 ч представлены в табл. 3.

Выход триптофана при различных комбинациях *ser A*/*trp E* см. в табл. 3.

Протокол секвенирования.

(2) Информация к SEQ ID N 1

(I) Характеристика последовательности:

(A) длина: 52 аминокислоты
(B) род: аминокислота
(C) форма нити: одностреловая
(D) топология: линейная

(II) Род молекулы: белок

(III) Гипотетичность: JA

(V) Род фрагмента: C-концевой

(VI) Первоначальное происхождение

(A) организм: *Escherichia coli*

(B) штамм: B
 (VII) Непосредственное происхождение:
 (B) клон: pGC3
 (XI) Описание последовательности: SEQ ID N 1:

AlaGluGlnGlyValAsnIleAlaAlaGlnTyrLeuGlnThrSerAla
 1 5 10 15
 GlnMetGlyTyrValValIleAspIleGluAlaAspGluAspValAla
 20 25 30
 GluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIleProGlyThrIleArgAla
 35 40 45
 ArgLeuLeuTyr
 50

(2) Информация к SEQ ID N 2
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 51 аминокислота
 (B) род: аминокислота
 (C) форма нити: однонитевая
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: С-концевой
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: B
 (VII) Непосредственное происхождение:
 (B) клон: pGH5
 (XI) Описание последовательности: SEQ ID N 2:

AlaGluGlnGlyValAsnIleAlaAlaGlnTyrLeuGlnThrSerAla
 1 5 10 15
 GlnMetGlyTyrValValIleAspIleGluAlaAspGluAspValAla
 20 25 30
 GluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIleProGlyThrIleArgAla
 35 40 45
 ArgLeuLeu
 50

(2) Информация к SEQ ID N 3
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 56 аминокислот
 (B) род: аминокислота
 (C) форма нити: однонитевая
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: С-концевой
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: B
 (VII) Непосредственное происхождение:
 (B) клон: pKB 1508
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 3:

AlaGluGlnGlyValCysSerArgAlaAsnIleAlaAlaGlnTyrLeu
 1 5 10 15
 GlnThrSerAlaGlnMetGlyTyrValValIleAspIleGluAlaAsp
 20 25 30
 GluAspValAlaGluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIleProGly
 35 40 45
 ThrIleArgAlaArgLeuLeuTyr
 50 55

(2) Информация к SEQ ID N 4
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина : 55 аминокислот
 (B) род : аминокислота
 (C) форма нити : однонитевая
 (D) топология : линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: С-концевой
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм : B
 (VII) Непосредственное происхождение:
 (B) клон: pGH II

(XI) Описание последовательности SEQ ID N 4:

AlaGluGlnGlyValCysSerArgAlaAsnIleAlaAlaGlnTyrLeu
 1 5 10 15
 GlnThrSerAlaGlnMetGlyTyrValValIleAspIleGluAlaAsp
 20 25 30
 GluAspValAlaGluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIleProGly
 35 40 45
 ThrIleArgAlaArgLeuLeu
 50 55

(2) Информация к SEQ ID N 5
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина : 47 аминокислот
 (B) род : аминокислота
 (C) форма нити : однонитевая
 (D) топология : линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: С-концевой
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм : Escherichia coli
 (B) штамм: B
 (VII) Непосредственное происхождение:
 (B) клон: pKB 1455
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 5:

AlaGluGlnGlyValAsnIleAlaAlaGlnTyrLeuGlnThrSerAla
 1 5 10 15
 GlnMetGlyTyrValValIleAspIleGluAlaAspGluAspValAla
 20 25 30
 GluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIleProGlyThrIleArg
 35 40 45

(2) Информация к SEQ ID N 6
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 32 аминокислоты
 (B) род: аминокислота
 (C) форма нити: однонитевая
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: внутренний
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: Y MC9
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 6:

AsnProThrAlaLeuPheHisGlnLeuCysGlyAspArgProAlaThr
 1 5 10 15
 LeuLeuLeuGluSerAlaAspIleAspSerLysAspAspLeuLysSer
 20 25 30

(2) Информация к SEQ ID N 7
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 32 аминокислоты
 (B) род: аминокислоты
 (C) форма нити: однонитевая
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (III) Антисмысловая: нет
 (V) Род фрагмента: внутренний
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: PD 103
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 7:

AsnProThrAlaLeuPheHisGlnLeuCysGlyAspArgProAlaThr
 1 5 10 15
 LeuLeuLeuGluSerAlaAspIleAspSerLysAspAspLeuGluSer
 20 25 30

(2) Информация к SEQ ID N 8
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 32 аминокислоты
 (B) род: аминокислота
 (C) форма нити: однонитевая
 (D) топология: линейная

(II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: внутренний
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: KB 862
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 8:

AsnSerThrAlaLeuPheHisGlnLeuCysGlyAspArgProAlaThr
 1 5 10 15
 LeuLeuLeuGluSerAlaAspIleAspSerLysAspAspLeuLysSer
 20 25 30

(2) Информация к SEQ ID N 9
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 32 аминокислоты
 (B) род: аминокислота
 (C) форма нити: одноплетенная
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: внутренний
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: SV 163
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 9:

AsnProThrAlaLeuPheHisGlnLeuCysGlyAspArgProAlaThr
 1 5 10 15
 LeuLeuLeuGluPheAlaAspIleAspSerLysAspAspLeuGluSer
 20 25 30

(2) Информация к SEQ ID N 10
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 32 аминокислоты
 (B) род: аминокислота
 (C) форма нити: одноплетенная
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: белок
 (III) Гипотетичность: JA
 (V) Род фрагмента: внутренний
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: SV 164
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 10:

AsnSerThrAlaLeuPheHisGlnLeuCysGlyAspArgProAlaThr
 1 5 10 15
 LeuLeuLeuGluSerAlaAspIleAspSerLysAspAspLeuLysSer
 20 25 30

(2) Информация к SEQ ID N 11
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 32 пары основания
 (B) род: нуклеиновая кислота
 (C) форма: двуцепочечная
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: DNS
 (III) Гипотетичность: нет
 (III) Антисмысловая: нет
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: синтезированный *in vitro*
 DNS-фрагмент
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 11:

AGCTTATTAC AGCAGACGGG CGCGAATGGG TC
 32

(2) Информация к SEQ ID N 12:
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина : 12 пар оснований
 (B) род: нуклеиновая кислота
 (C) форма: двуцепочечная
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: DNS
 (III) Гипотетичность: нет
 (III) Антисмысловая: нет
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: синтезированный *in vitro*
 DNS-фрагмент
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 12:

TGCTCTAGAG CA
12

(2) Информация к SEQ ID N 13
 (I) Характеристика последовательности:
 (A) длина: 1233 пар оснований
 (B) род: нуклеиновая кислота
 (C) форма нити: двуцепочечная
 (D) топология: линейная
 (II) Род молекулы: DNS (геномная)
 (III) Предположительно: нет
 (III) Антисмысловая: нет
 (VI) Первоначальное происхождение:
 (A) организм: Escherichia coli
 (B) штамм: B
 (IX) Признаки:
 (A) название/ключ: CDS
 (B) положение: 1..1233
 (C) род обнаружения: экспериментальный
 (D) прочие данные: стартовый кодон - 1,
 EC-число=1.1.1.95,
 продукт="D-3-фосфоглицератдегидрогеназа",
 доказательство - экспериментальное, ген =
 "ser A, стандартное название - "ser A",
 ссылка = (/1/).
 (X) Опубликованная информация: Tobey
 K.L., Grant G.A. The Nucleotide sequence of
 the ser A gene of Escherichia coli and the
 amino acid sequence of the encoded protein,
 d-3-phosphoglycerate dehydrogenase. -J.
 Biol. Chem., 261, p. 12179 - 12183, 1986.
 (XI) Описание последовательности SEQ ID N 13, 14 см. на фиг. 1 - 4.

Формула изобретения:

1. Способ получения штамма
 микроорганизма с улучшенной продукцией
 триптофана, обладающего
 45 разрегулированным метаболизмом
 триптофана, предусматривающий введение в
 штамм ser A-аллеля, отличающийся тем, что
 вводят устойчивый к регуляции по типу
 обратной связи ser A-аллель.
 2. Способ продуцирования триптофана,
 предусматривающий культивирование
 50 микроорганизма продуцента триптофана,
 отличающийся тем, что в качестве
 микроорганизма продуцента используют
 микроорганизм с разрегулированным
 55 триптофановым и сериновым метаболизмом,
 который разрегулирован устойчивым по
 обратной связи ser A-аллелем с величиной К_i
 для серина между 0,1 мМ и 50 мМ.

60

RU 2111247 C1

RU 2111247 C1

Таблица 1

C-Концевые аминокислотные последовательности измененных ser A-аллелей

| | К/ммМ |
|-----------|---|
| ser AWT | AEQG V ___ NIA AQYL QTSA QMGY WVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLLY |
| serA 5 | AEQG V ___ NIA AQYL QTSA QMGY WVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLL_ |
| serA 1508 | AEQG VCSR ANIA AQYL QTSA QMGY WVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLLY |
| serA 11 | AEQG VCSR ANIA AQYL QTSA QMGY WVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIRA RLL_ |
| serA 1455 | AEQG V ___ NIA AQYL QTSA QMGY WVID IEAD EDVA EKAL QAMK AIPG TIR_ |

Таблица 2

Аминокислотные последовательности измененных trpE-аллелей

| | К/ммМ |
|---------|-------|
| trpE WT | |
| trpE 0 | DLKS |
| trpE 5 | E |
| trpE 6 | E |
| trpE 8 | E |

| | К/ммМ |
|---------|-------------------|
| trpE WT | |
| trpE 0 | 0,01 SEQ ID NO: 6 |
| trpE 5 | 0,1 SEQ ID NO: 7 |
| trpE 6 | 3,0 SEQ ID NO: 8 |
| trpE 8 | > 15 SEQ ID NO: 9 |
| | 15 SEQ ID NO: 10 |

Таблица 3

| | serAWT | serAS | serA1508 | serA11 | serA1455 |
|--------|--------|-------|----------|--------|----------|
| trpE 0 | 15,7 | 20,2 | n. b. | n. b. | 6,7 |
| trpE 5 | 12,5 | 18,9 | 15,0 | 20,0 | 7,5 |
| trpE 8 | 11,6 | 24,1 | 13,8 | 24,0 | 4,0 |
| trpE 6 | 7,5 | 18,0 | n. b. | 11,5 | 3,9 |

n. b. не определялось

```

ATG GCA AAG GTA TCG CTG GAG AAA GAC AAG ATT AAG TTT CTG CTG GTA
48
Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
1 5 10 15

GAA GGC GTG CAC CAA AAG GCG CTG GAA AGC CTT CGT GCA GCT GGT TAC
96
Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
20 25 30

ACC AAC ATC GAA TTT CAC AAA GGC GCG CTG GAT GAT GAA CAA TTA AAA
144
Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys
35 40 45

GAA TCC ATC CGC GAT GCC CAC TTC ATC GGC CTG CGA TCC CGT ACC CAT
192
Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His
50 55 60

CTG ACT GAA GAC GTG ATC AAC GCC GCA GAA AAA CTG GTC GCT ATT GGC
240
Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly
65 70 75 80

TGT TTC TGT ATC GGA ACA AAC CAG GTT GAT CTG GAT GCG GCG GCA AAG
288
Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys
85 90 95

CGC GGG ATC CCG GTA TTT AAC GCA CCG TTC TCA AAT ACG CGC TCT GTT
336
Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
100 105 110

GCG GAG CTG GTG ATT GGC GAA CTG CTG CTG CTA TTG CGC GGC GTG CCG
384
Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro
115 120 125

```

Фиг. 1

GAA GCC AAT GCT AAA GCG CAC CGT GGC GTG TGG AAC AAA CTG GCG GCG
 432
 Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
 130 135 140

GGT TCT TTT GAA GCG CGC GGC AAA AAG CTG GGT ATC ATC GGC TAC GGT
 480
 Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
 145 150 155 160

CAT ATT GGT ACG CAA TTG GGC ATT CTG GCT GAA TCG CTG GGA ATG TAT
 528
 His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
 165 170 175

GTC TAC TTT TAT GAT ATT GAA AAT AAA CTG CCG CTG GGC AAC GCC ACT
 576
 Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
 180 185 190

CAG GTA CAG CAT CTT TCT GAC CTG CTG AAT ATG AGC GAT GTG GTG AGT
 624
 Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
 195 200 205

CTG CAT GTA CCA GAG AAT CCG TCC ACC AAA AAT ATG ATG GGC GCG AAA
 672
 Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys
 210 215 220

GAA ATT TCA CTA ATG AAG CCC GGC TCG CTG CTG ATT AAT GCT TCG CGC
 720
 Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
 225 230 235 240

GGT ACT GTG GTG GAT ATT CCG GCG CTG TGT GAT GCG CTG GCG AGC AAA
 768
 Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
 245 250 255

CAT CTG GCG GGG GCG GCA ATC GAC GTA TTC CCG ACG GAA CCG GCG ACC
 816
 His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
 260 265 270

AAT AGC GAT CCA TTT ACC TCT CCG CTG TGT GAA TTC GAC AAC GTC CTT
 864
 Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
 275 280 285

CTG ACG CCA CAC ATT GGC GGT TCG ACT CAG GAA GCG CAG GAG AAT ATC
 912
 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
 290 295 300

Фиг.2

RU 2111247 C1

RU 2111247 C1

GGC CTG GAA GTT GCG GGT AAA TTG ATC AAG TAT TCT GAC AAT GGC TCA
960
Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
305 310 315 320

ACG CTC TCT GCG GTG AAC TTC CCG GAA GTC TCG CTG CCA CTG CAC GGT
1008
Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Gly
325 330 335

GGG CGT CGT CTG ATG CAC ATC CAC GAA AAC CGT CCG GGC GTG CTA ACT
1056
Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
340 345 350

GCG CTG AAC AAA ATC TTC GCC GAG CAG GGC GTC AAC ATC GCC GCG CAA
1104
Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
355 360 365

TAT CTG CAA ACT TCC GCC CAG ATG GGT TAT GTG GTT ATT GAT ATT GAA
1152
Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
370 375 380

GCC GAC GAA GAC GTT GCC GAA AAA GCG CTG CAG GCA ATG AAA GCC ATT
1200
Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile
385 390 395 400

CCG GGT ACC ATT CGC GCC CGT CTG CTG TAC TA
1233
Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
405 410

Информация к SEQ ID NO: 14:

- ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
(A) ДЛИНА: 410 АМИНОКИСЛОТ
(B) РОД: АМИНОКИСЛОТА
(D) ТОПОЛОГИЯ: ЛИНЕЙНАЯ
(ii) РОД МОЛЕКУЛЫ: БЕЛОК
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID N 14:

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

Фиг.3

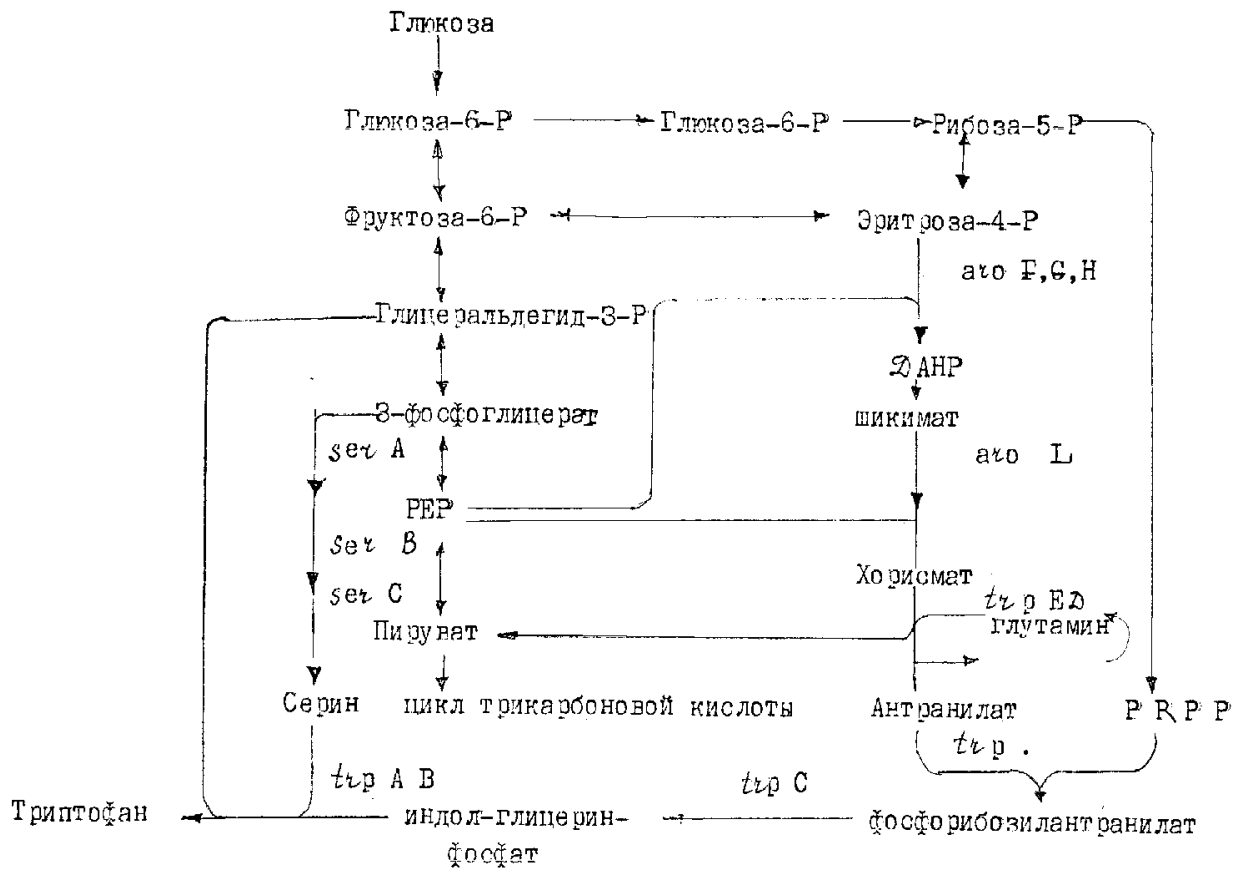
1

Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
 100 105 110
 Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro
 115 120 125
 Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
 130 135 140
 Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
 145 150 155 160
 His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
 165 170 175
 Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
 180 185 190
 Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
 195 200 205
 Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys
 210 215 220
 Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
 245 250 255
 His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
 260 265 270
 Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
 275 280 285
 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
 290 295 300
 Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Gly
 325 330 335
 Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
 340 345 350
 Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
 355 360 365
 Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
 370 375 380
 Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile
 385 390 395 400
 Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
 405 410

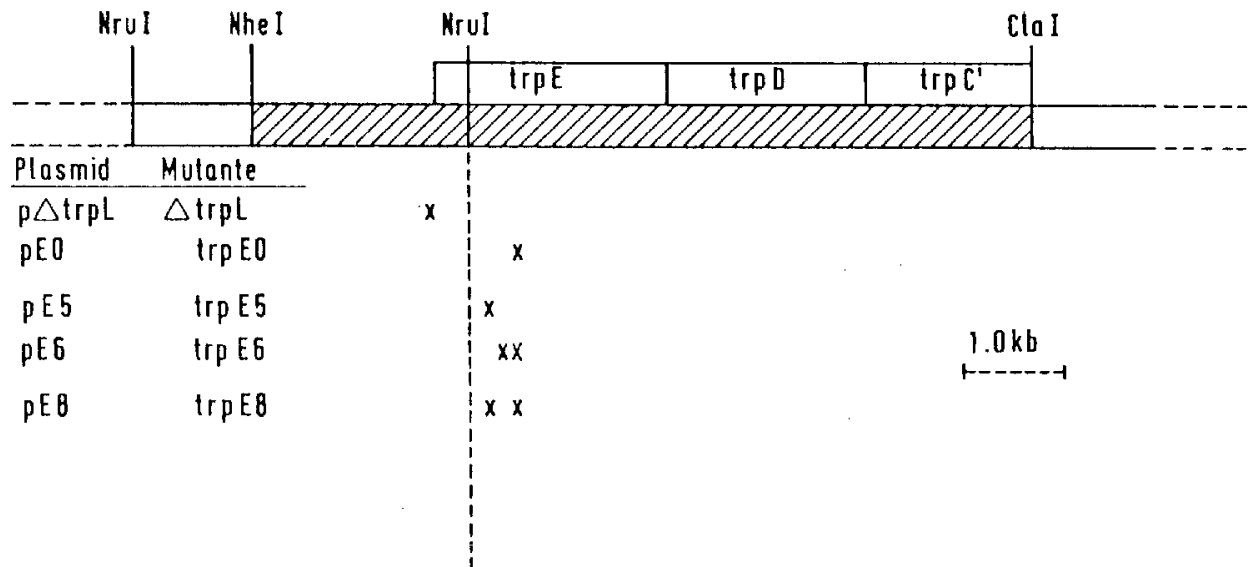
Фиг.4

RU 2111247 C1

RU 2111247 C1



Фиг.5



Фиг.6

RU 2111247 C1

RU 2111247 C1

| | | |
|--|-----|-----|
| 10 | 30 | 50 |
| ATGGCAAAGGTATCGCTGGAGAAAGACAAGATTAAGTTTCTGCTGGTAGAAGGCGTGCAC | | |
| MetAlaLysValSerLeuGluLysAspLysIleLysPheLeuLeuValGluGlyValHis | | |
| 70 | 90 | 110 |
| CAAAGGCGCTGGAAAGCCTTCGTGCAGCTGGTTACACCAACATCGAATTCACAAAGGC | | |
| GlnLysAlaLeuGluSerLeuArgAlaAlaGlyTyrThrAsnIleGluPheHisLysGly | | |
| 130 | 150 | 170 |
| GCGCTGGATGATGAACAATTAAGAATCCATCCGCGATGCCCACTTCATCGGCCTGCGA | | |
| AlaLeuAspAspGluGlnLeuLysGluSerIleArgAspAlaHisPheIleGlyLeuArg | | |
| 190 | 210 | 230 |
| TCCCGTACCCATCTGACTGAAGACGTGATCAACGCCGAGAAAACTGGTCGCTATTGGC | | |
| SerArgThrHisLeuThrGluAspValIleAsnAlaAlaGluLysLeuValAlaIleGly | | |
| 250 | 270 | 290 |
| TGTTTCTGTATCGGAACAAACCAGGTTGATCTGGATGCGGCGGCAAAGCGCGGGATCCCG | | |
| CysPheCysIleGlyThrAsnGlnValAspLeuAspAlaAlaAlaLysArgGlyIlePro | | |
| 310 | 330 | 350 |
| GTATTTAACGCACCGTTCTCAAATACGCGCTCTGTTGCGGAGCTGGTGATTGGCGAACTG | | |
| ValPheAsnAlaProPheSerAsnThrArgSerValAlaGluLeuValIleGlyGluLeu | | |
| 370 | 390 | 410 |
| CTGCTGCIATTGCGCGCGCTGCCGGAAGCCAATGCTAAAGCGCACCGTGCGGTGTGGAAC | | |
| LeuLeuLeuLeuArgGlyValProGluAlaAsnAlaLysAlaHisArgGlyValTrpAsn | | |

Фиг.7

RU 2111247 C1

RU 2111247 C1

430 450 470
AAACTGGCGGCGGGTTCTTTGAAGCGCGCGCAAAAAGCTGGGTATCATCGGCTACGGT
LysLeuAlaAlaGlySerPheGluAlaArgGlyLysLysLeuGlyIleIleGlyTyrGly

490 510 530
CATATTGGTACGCAATTGGGCATTCTGGCTGAATCGCTGGGAATGTATGTTACTTTTAT
HisIleGlyThrGlnLeuGlyIleLeuAlaGluSerLeuGlyMetTyrValTyrPheTyr

550 570 590
GATATTGAAAATAAACTGCCGCTGGGCAACGCCACTCAGGTACAGCATCTTTCTGACCTG
AspIleGluAsnLysLeuProLeuGlyAsnAlaThrGlnValGlnHisLeuSerAspLeu

610 630 650
CTGAATATGAGCGATGTGGTGAGTCTGCATGTACCAGAGAATCCGTCCACCAAAAATATG
LeuAsnMetSerAspValValSerLeuHisValProGluAsnProSerThrLysAsnMet

670 690 710
ATGGGCGCGAAAGAAATTTCACTAATGAAGCCCGGCTCGCTGCTGATTAATGCTTCGCGC
MetGlyAlaLysGluIleSerLeuMetLysProGlySerLeuLeuIleAsnAlaSerArg

730 750 770
GGTACTGTGGTGGATATTCGGCGCTGTGTGATGCGCTGGCGAGCAAACATCTGGCGGGG
GlyThrValValAspIleProAlaLeuCysAspAlaLeuAlaSerLysHisLeuAlaGly

790 810 830
GCGGCAATCGACGTATTCGGGACGGAACCGGCGACCAATAGCGATCCATTTACCTCTCCG
AlaAlaIleAspValPheProThrGluProAlaThrAsnSerAspProPheThrSerPro

Фиг.8

RU 2111247 C1

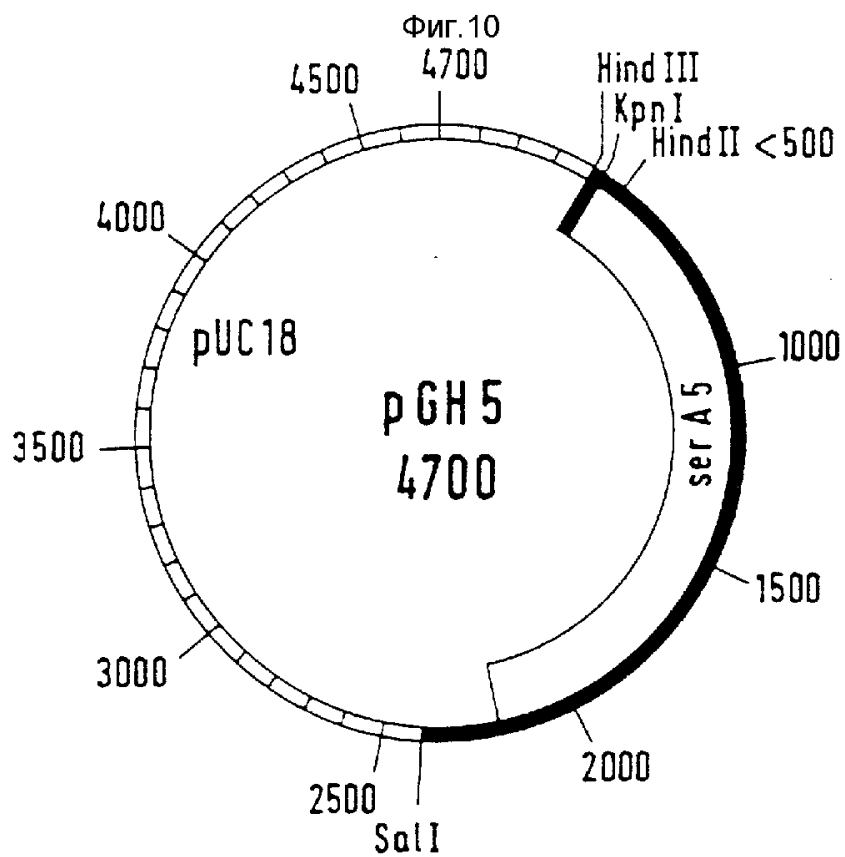
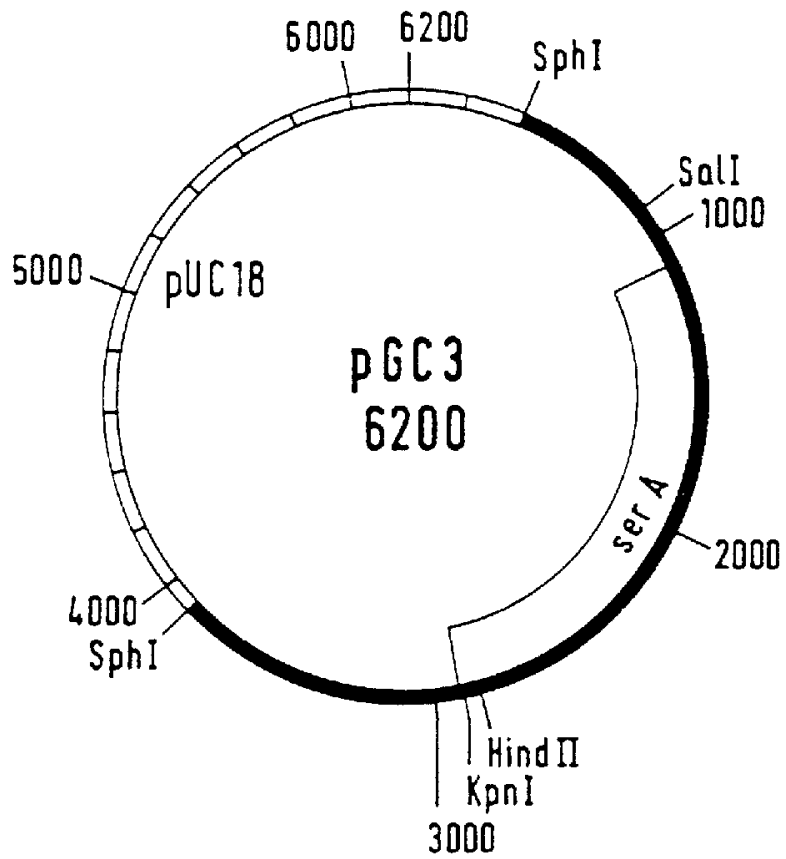
RU 2111247 C1

| | | |
|---|------|------|
| 850 | 870 | 890 |
| CTGTGTGAATTCGACAACGTCCTTCTGACGCCACACATTGGCGGTTCGACTCAGGAAGCG | | |
| LeuCysGluPheAspAsnValLeuLeuThrProHisIleGlyGlySerThrGlnGluAla | | |
| 910 | 930 | 950 |
| CAGGAGAATATCGGCCTGGAAAGTTGCGGGTAAATTGATCAAGTATTCTGACAATGGCTCA | | |
| GlnGluAsnIleGlyLeuGluValAlaGlyLysLeuIleLysTyrSerAspAsnGlySer | | |
| 970 | 990 | 1010 |
| ACGCTCTCTGCGGTGAACTTCCCGGAAGTCTCGCTGCCACTGCACGGTGGGCGTCGTCTG | | |
| ThrLeuSerAlaValAsnPheProGluValSerLeuProLeuHisGlyGlyArgArgLeu | | |
| 1030 | 1050 | 1070 |
| ATGCACATCCACGAAAACCGTCCGGGCGTGCTAACTGCGCTGAACAAAATCTTCGCCGAG | | |
| MetHisIleHisGluAsnArgProGlyValLeuThrAlaLeuAsnLysIlePheAlaGlu | | |
| 1090 | 1110 | 1130 |
| CAGGGCGTCAACATCGCCGCGCAATATCTGCAAACCTCCGCCAGATGGGTTATGTGGTT | | |
| GlnGlyValAsnIleAlaAlaGlnTyrLeuGlnThrSerAlaGlnMetGlyTyrValVal | | |
| 1150 | 1170 | 1190 |
| ATTGATATTGAAGCCGACGAAGACGTTGCCGAAAAGCGCTGCAGGCAATGAAAGCTATT | | |
| IleAspIleGluAlaAspGluAspValAlaGluLysAlaLeuGlnAlaMetLysAlaIle | | |
| 1210 | 1230 | |
| CCGGGTACCATTCGCGCCCGTCTGCTGTACTAA | | |
| ProGlyThrIleArgAlaArgLeuLeuTyrEnd | | |

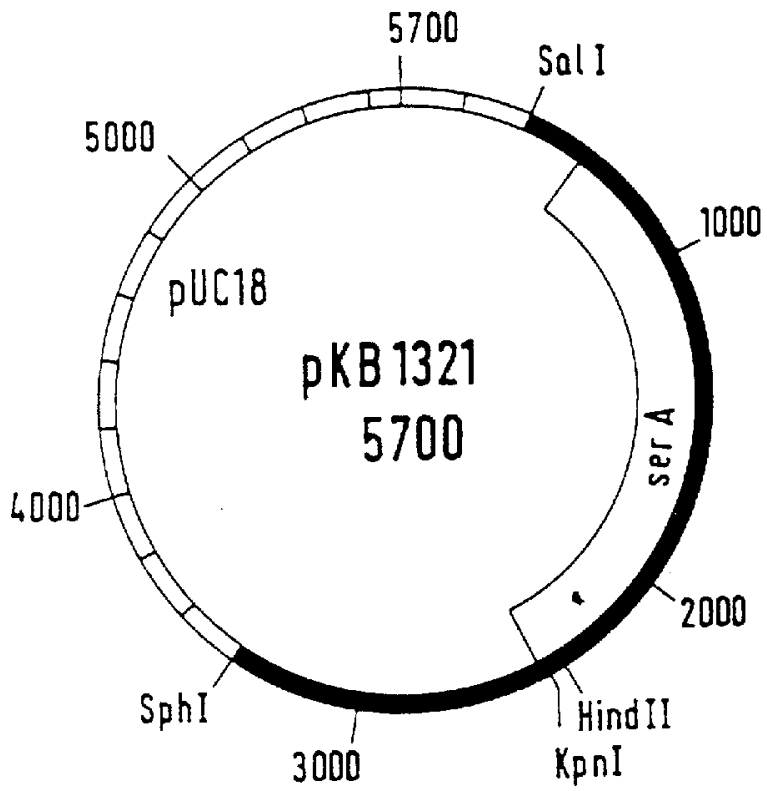
Фиг.9

RU 2 1 1 1 2 4 7 C 1

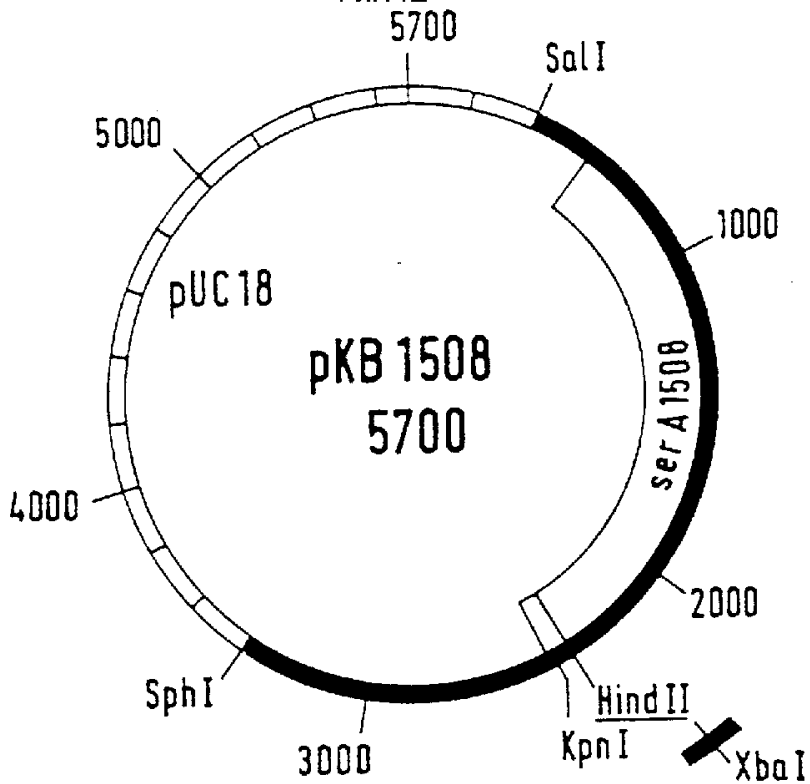
RU 2 1 1 1 2 4 7 C 1



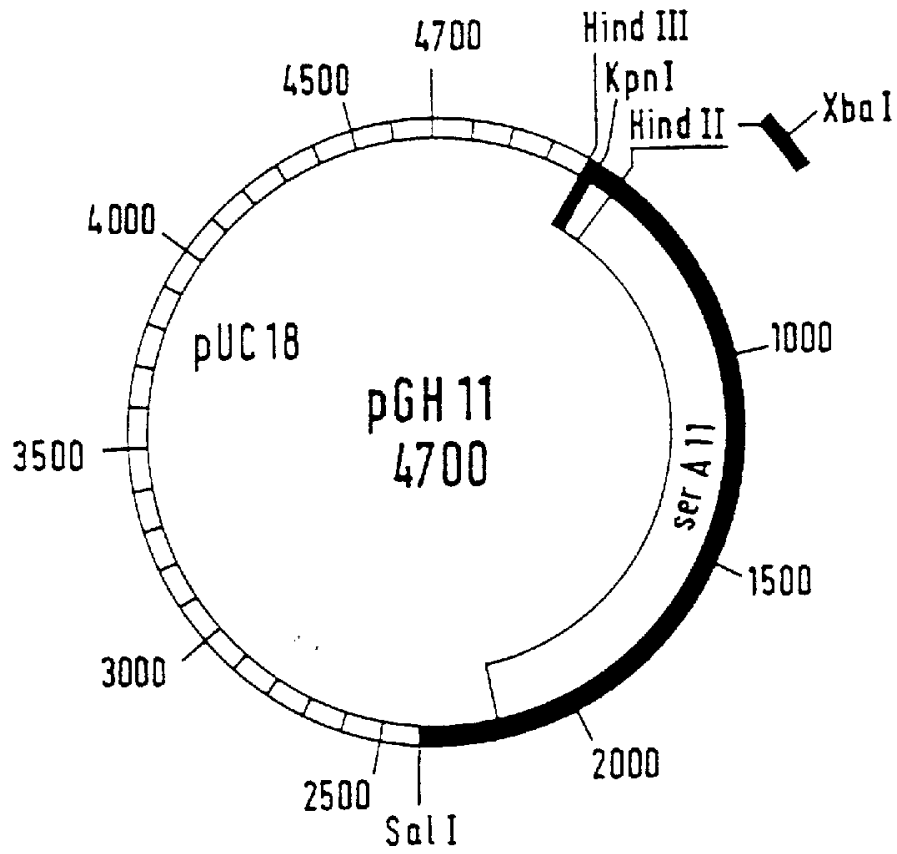
Фиг.11



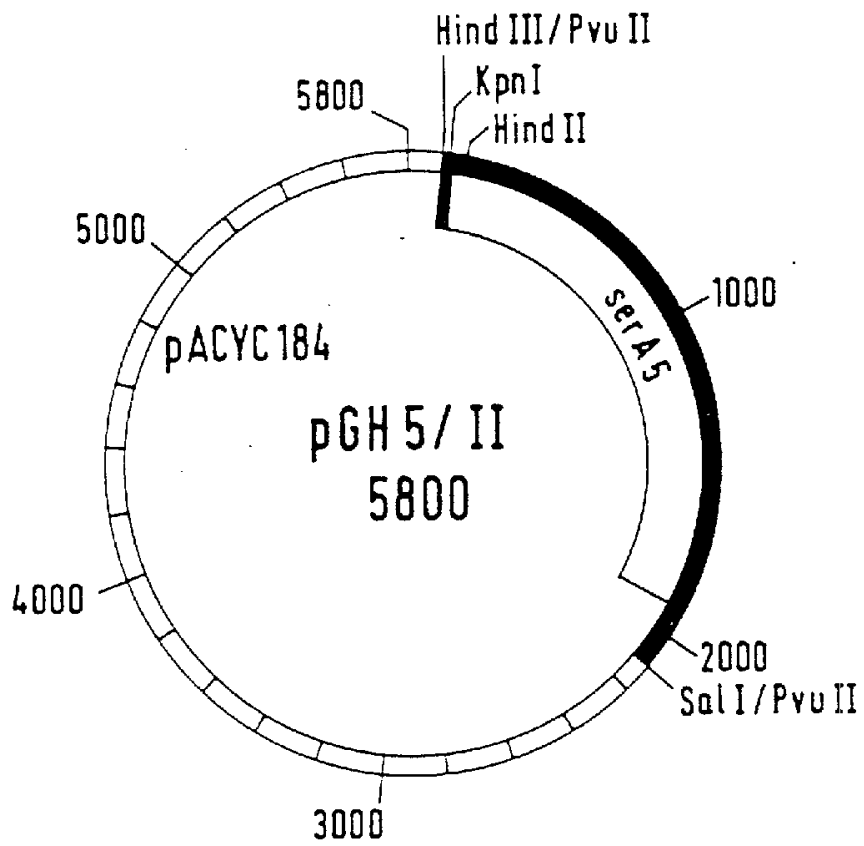
Фиг.12



Фиг.13



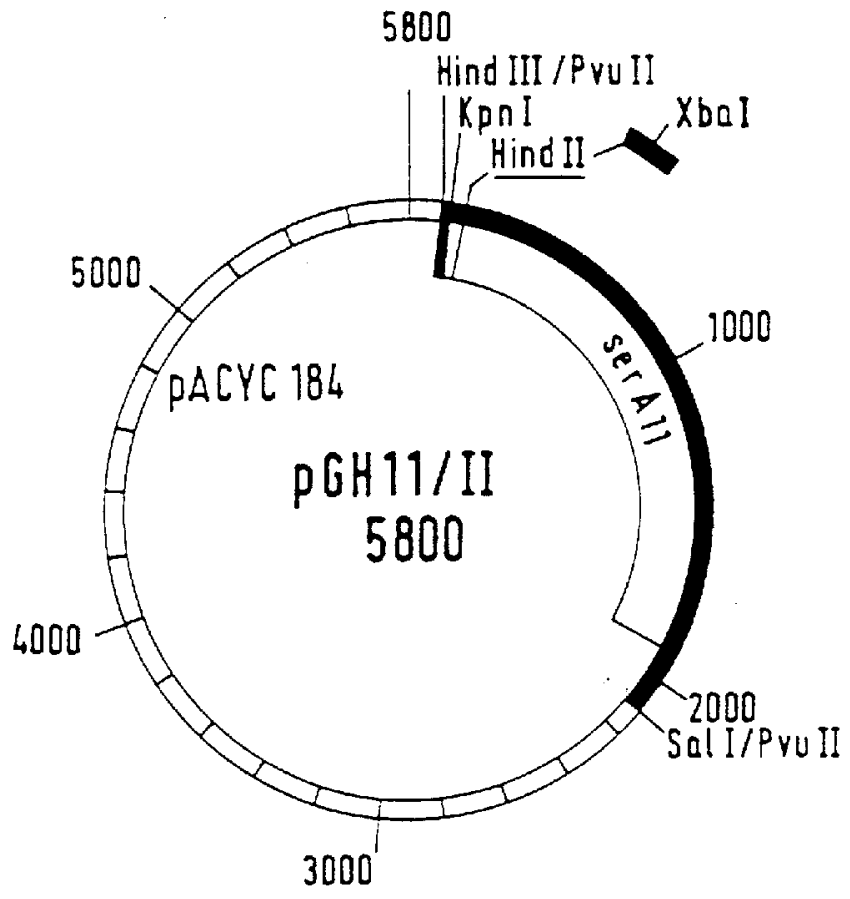
Фиг. 14



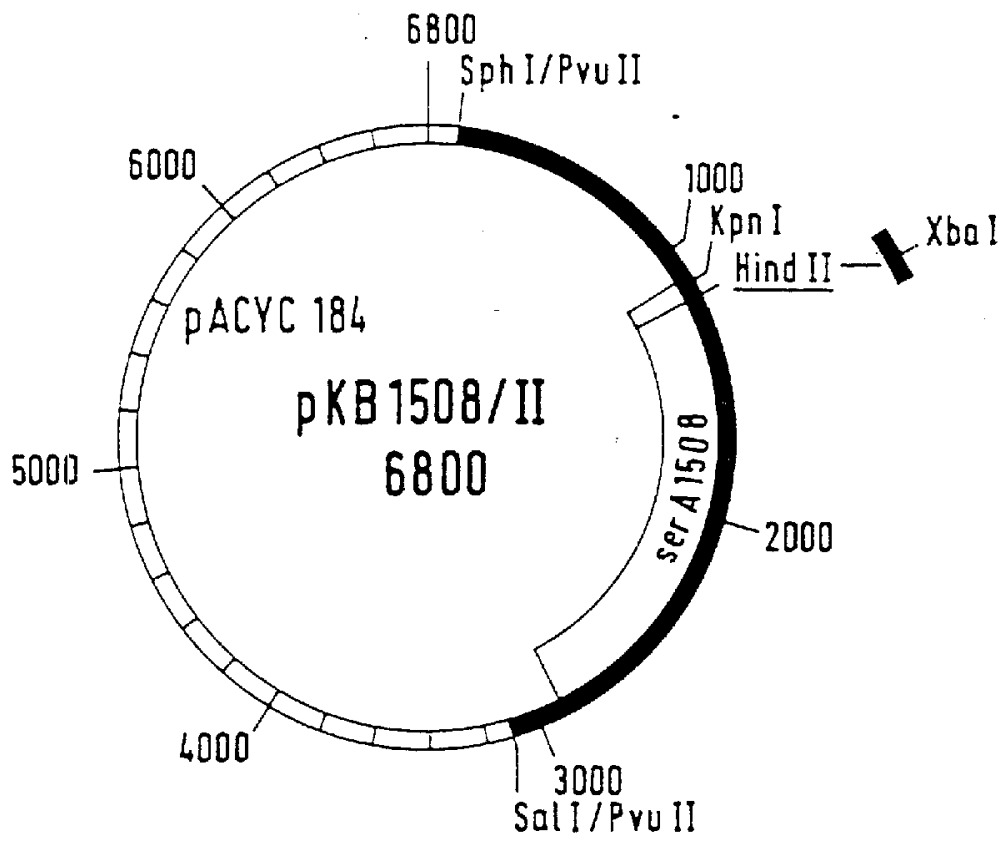
Фиг. 15

RU 2111247 C1

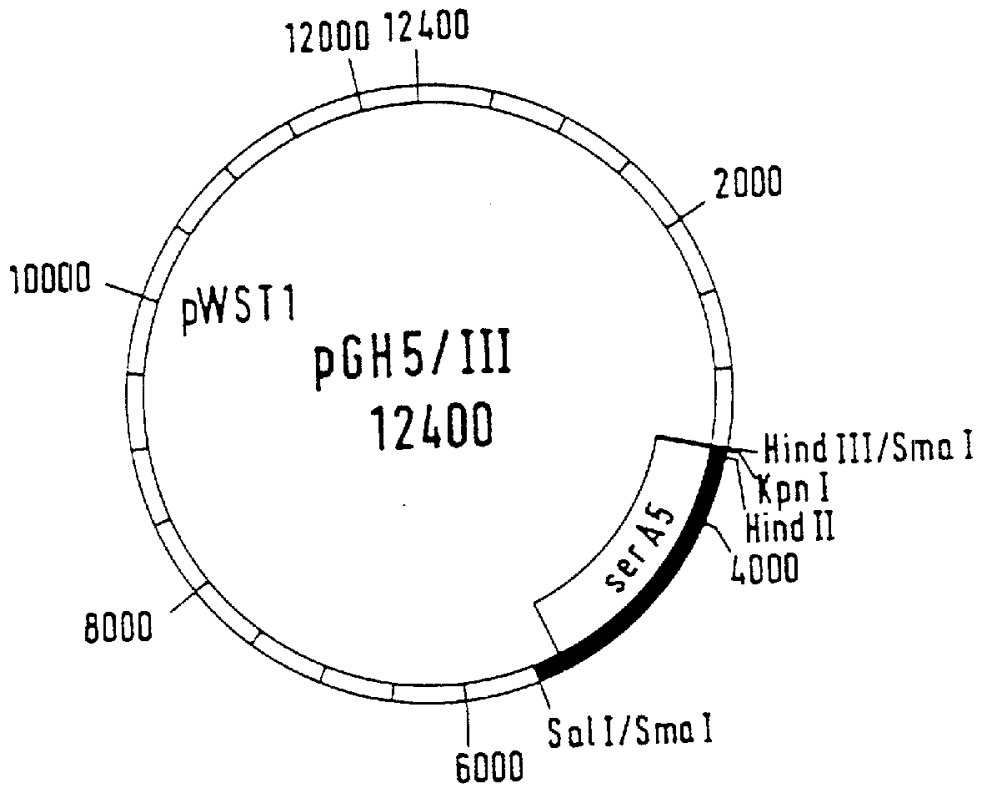
RU 2111247 C1



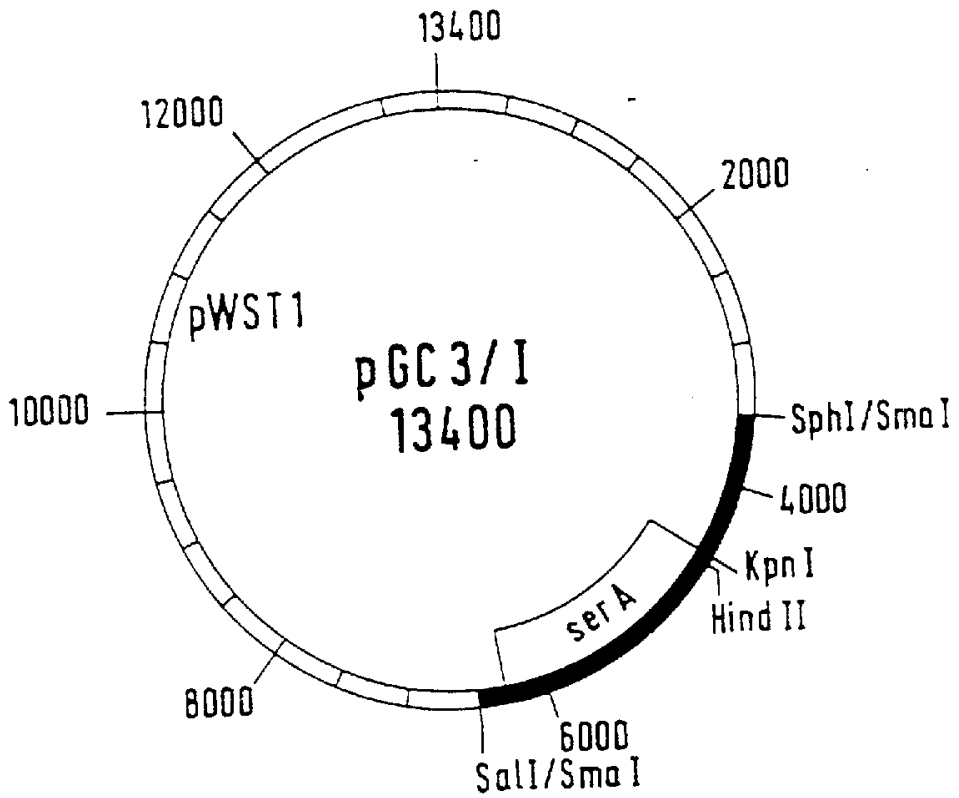
Фиг.16



Фиг.17



Фиг.18



Фиг.19