



(51) МПК
C12N 15/53 (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010130304/10, 21.07.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 21.07.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.07.2010

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2012 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 20.05.2013 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SCHNEIDER BL. et al. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*, J Bacteriol, 08.1998, 180(16), 4278-86, Abstract. КИУРАКИС АК et al. ArgR-independent induction and ArgR-dependent superinduction of the astCADBE operon in *Escherichia coli*, J Bacteriol, 06.2002, 184(11), 2940-50, Abstract. RU 2003126289, (см. прод.)

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1,
 корп.1, ЗАО АГРИ, В.М. Белкову

(72) Автор(ы):

Леонова Татьяна Викторовна (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-АРГИНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИЙ РОДА *Escherichia*, В КОТОРОЙ ИНАКТИВИРОВАН ОПЕРОН astCADBE

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения L-аргинина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, которая модифицирована таким образом, что оперон astCADBE в указанной бактерии

инактивирован. Указанную бактерию выращивают в питательной среде, после чего L-аргинин выделяют из культуральной жидкости. Данный способ позволяет повысить продуктивность бактерий-продуцентов L-аргинина и получить L-аргинин с большим выходом. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 2 табл., 14 пр.

(56) (продолжение):

20.05.2006, формула изобретения. RU 2007104650, 20.08.2008, формула изобретения.

C2
 8
 1
 8
 8
 2
 4
 8
 2
 1
 8
 8
 2

RU
 2
 4
 8
 2
 1
 8
 8
 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/53 (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010130304/10, 21.07.2010**

(24) Effective date for property rights:
21.07.2010

Priority:

(22) Date of filing: **21.07.2010**

(43) Application published: **27.01.2012 Bull. 3**

(45) Date of publication: **20.05.2013 Bull. 14**

Mail address:

**117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, korp.1,
ZAO AGRI, V.M. Belkovu**

(72) Inventor(s):

**Leonova Tat'jana Viktorovna (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 PREPARING L-ARGININE WITH USE OF BACTERIA OF GENUS Escherichia WHEREIN astCADBE OPERON IS INACTIVATED**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention relates to biotechnology, and represents a method for preparing L-arginine with the use of the bacteria of to the genus Escherichia, which is modified in such a way that the astCADBE operon in the mentioned

bacterium is inactivated. The bacterium is grown in a culture medium, after that L-arginine is recovered from a culture fluid.

EFFECT: method enables providing higher productivity of the bacteria producing L-arginine and producing high-yield L-arginine.

4 cl, 2 tbl, 14 ex

RU 2 482 188 C2

RU 2 482 188 C2

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 оперона *astCADBE* 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. Обычно микроорганизмы модифицируют для того, чтобы увеличить продукцию L-аминокислот.

Описано множество методов увеличения продукции L-аминокислот, например, путем трансформации микроорганизма рекомбинантной ДНК (см., например, патент США 4,278,765). Другие методы основаны на повышении активности ферментов, вовлеченных в биосинтез аминокислот, и/или уменьшении чувствительности целевого фермента к ингибированию по типу обратной связи, продуцируемой L-аминокислотой (см., например, патенты США 4,346,170; 5,661,012 и 6,040,160).

Другими методами увеличения продукции L-аминокислот являются 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.

Поиск пути катаболизма аргинина с образованием аммония в *Escherichia coli* привел к открытию аргининсукцинилтрансферазного пути (*AST* - arginine succinyltransferase) с образованием аммония в *E.coli* и оперона *astCADBE*. Гены этого оперона кодируют пять ферментов *AST*-пути. Ген сукцинилорнитинтрансминазы был обнаружен на основании идентичности последовательности белка и выведенного продукта гена. Этот ген был обозначен как *astC*, и он, очевидно, является первым геном оперона. Поиск по гомологии второй, третьей и пятой открытых рамок считывания (*ОРС*) этого оперона привел к предположению, что они кодируют *AST*, сукцинилглутаминполуальдегиддегидрогеназу и сукцинилглутаматдесукцинилазу, первый, четвертый и пятый ферменты *AST*-пути, соответственно. Поиск по гомологии не привел к предположению функции четвертой *ОРС*, но разрушение этой *ОРС* приводило к специфическому исчезновению активности второго фермента пути, сукциниларгининдигидролазы. Тот факт, что каждый ген перекрывается с последующим, подтверждает их организацию в оперон и позволяет предположить, что транскрипция полицистронной мРНК, возможно, осуществляется одной рибосомой. Разрушение первого гена приводит к ослаблению синтеза всех ферментов *AST*-пути, что также согласуется с оперонной структурой. Наконец, эти наблюдения вместе с тем фактом, что в клетках, содержащих плазмиду с этим предполагаемым опероном, повышается уровень всех пяти ферментов, доказывают существование оперона *astCADBE*. Мутанты, дефицитные по ферментам *AST*-пути, не могут утилизировать аргинин, что свидетельствует о том, что *AST*-путь необходим для катаболизма аргинина как единственного источника азота в экспоненциальной фазе роста при аэробном культивировании. *AST*-путь также, очевидно, вносит вклад в деградацию орнитина и аспартата. Ограничение по азоту приводило к индукции этого пути и в *E.coli*, и в *Klebsiella aerogenes*, но механизмы активации явно различались в этих двух организмах. Регуляция *AST*-пути в условиях, отличных от ограничения по

азоту, предполагает дополнительные функции. AST-путь индуцируется при росте на бульоне. AST-путь также, по-видимому, индуцируется при входе в стационарную фазу роста. Функция AST-пути в таких условиях не ясна. В отличие от других организмов, у которых имеется AST-путь, *E.coli* не утилизируют аргинин в качестве источника углерода. Возможно, *E.coli* не могут утилизировать аргинин в качестве источника углерода из-за отсутствия контролируемого соответствующим образом промотора генов *ast* или из-за неадекватного транспорта при росте в условиях ограничения по углероду (Schneider BL et al., J Bacteriol.; 180(16):4278-86(1998)).

В настоящее время нет сообщений, описывающих использование инактивации оперона *astCADBE* для получения L-аминокислот.

Описание изобретения

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

Вышеупомянутые цели были достигнуты благодаря обнаружению того факта, что ослабление экспрессии оперона *astCADBE* может приводить к увеличению продукции L-аминокислот, таких как L-треонин, L-лизин, L-цистеин, L-метионин, L-лейцин, L-изолейцин, L-валин, L-гистидин, глицин, L-серин, L-аланин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-глутамин, L-глутаминовая кислота, L-пролин, L-аргинин, L-цитруллин, L-орнитин, L-фенилаланин, L-тирозин и L-триптофан.

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

Целью настоящего изобретения является предоставление бактерии-продуцента L-аминокислоты, принадлежащей к семейству *Enterobacteriaceae*, модифицированной таким образом, что экспрессия оперона *astCADBE* в указанной бактерии ослаблена.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, отличающейся тем, что оперон *astCADBE* инактивирован.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, отличающейся тем, что указанная бактерия принадлежит к роду *Escherichia*.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, отличающейся тем, что указанная бактерия принадлежит к роду *Pantoea*.

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

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, отличающейся тем, что указанная ароматическая L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, отличающейся тем, что 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-аспарагиновой кислоты, L-глутамина, L-глутаминовой кислоты, L-пролина, L-аргинина, L-цитруллина и L-орнитина.

Также целью настоящего изобретения является предоставление способа

получения L-аминокислоты, включающего:

- выращивание описанной выше бактерии в питательной среде; и
- выделение указанной L-аминокислоты из культуральной жидкости.

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

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, отличающегося тем, что 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, отличающегося тем, что 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-аспарагиновой кислоты, L-глутамина, L-глутаминовой кислоты, L-пролина, L-аргинина, L-цитруллина и L-орнитина.

Более детально настоящее изобретение описано ниже.

Подробное описание наилучшего способа осуществления изобретения

1. Бактерия

Бактерия, согласно настоящему изобретению, - это бактерия-продуцент L-аминокислоты, принадлежащая к семейству Enterobacteriaceae, отличающаяся тем, что оперон astCADBE в указанной бактерии инактивирован.

Фраза "бактерия-продуцент L-аминокислоты" может означать бактерию, обладающую способностью к продукции и секреции L-аминокислоты в питательную среду, когда бактерия выращивается в указанной питательной среде.

Термин «бактерия-продуцент L-аминокислоты» также может означать бактерию, которая способна к продукции и накоплению 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 также может означать, что бактерия способна накапливать в среде целевую L-аминокислоту в количестве не менее чем 0.5 г/л или не менее чем 1.0 г/л в другом примере. Термин "L-аминокислота" включает, например, L-аланин, L-аргинин, L-цитруллин, L-орнитин, 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, например, L-фенилаланин, L-тирозин и L-триптофан. Термин "неароматическая L-аминокислота" включает, например, 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-аспарагиновую кислоту, L-глутамин, L-глутаминовую кислоту, L-пролин, L-аргинин, L-цитруллин и L-орнитин. Конкретными примерами являются 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Taxonomy/wgetorg?mode=Tree&id=1236&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock)). Предпочтительна бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia* или *Pantoea*.

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 оперона *astCADBE* ослаблена» означает, что указанная бактерия модифицирована таким образом, что в результате модификации такая бактерия содержит пониженное количество белков *AstC*, *AstA*, *AstD*, *AstB* и *AstE* по сравнению с немодифицированной бактерией, или это также может означать, что модифицированная бактерия не способна синтезировать белки *AstC*, *AstA*, *AstD*, *AstB* и *AstE*. Термин «бактерия модифицирована таким образом, что экспрессия оперона *astCADBE* ослаблена» также может означать, что указанная бактерия модифицирована таким образом, что модифицированные гены кодируют мутантные белки *AstC*, *AstA*, *AstD*, *AstB* и *AstE* с пониженной активностью.

Наличие или отсутствие оперона *astCADBE* на хромосоме может быть определено хорошо известными методами, включая ПЦР, блоттинг по Саузерну и т.п. Кроме того, уровень экспрессии гена можно оценить определением количества транскрибируемой с гена РНК с использованием различных известных методов, включая блоттинг по Нозерну, количественную ОТ-ПЦР и т.п. Количество и молекулярную массу белков, кодируемых генами, можно определить известными методами, включая электрофорез в SDS-ПААГ с последующим иммуноблоттингом (Вестерн-блоттинг) и т.д.

Фраза «инактивация оперона *astCADBE*» может означать, что модифицированные гены кодируют полностью неактивные белки. Возможно также, что естественная экспрессия модифицированного участка ДНК невозможна из-за делеции части гена, сдвига рамки считывания, введения миссенс/нонсенс мутации(-ий) или модификации примыкающих к гену областей, которые включают последовательности, контролирующие экспрессию гена, такие как промоторы, энхансеры, аттенуаторы и т.д.

Ген *astC* кодирует белок *AstC*, ацетилорнитинтрансаминазу/сукцилорнитинтрансаминазу (синоним - В 1748). Ген *astC* из *E.coli* (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,828,786 по 1,830,006 в последовательности с

инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990) расположен между геном astA и геном xthA, ориентированным в противоположном с геном astC направлении, на хромосоме штамма E. coli K-12. Нуклеотидная последовательность гена astC и аминокислотная последовательность белка AstC, кодируемого геном astC, приведены в Перечне последовательностей под номерами 1 (SEQ ID NO:1) и 2 (SEQ ID NO:2) соответственно.

Ген astA кодирует белок AstA, аргининсукцинилтрансферазу (синоним - B 1747). Ген astA из E.coli (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,827,755 по 1,828,789 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990) расположен между геном astD и геном astC на хромосоме штамма E.coli K-12. Нуклеотидная последовательность гена astA и аминокислотная последовательность белка AstA, кодируемого геном astA, приведены в Перечне последовательностей под номерами 3 (SEQ ID NO:3) и 4 (SEQ ID NO:4) соответственно.

Ген astD кодирует белок AstD, альдегиддегидрогеназу (синоним - B1746). Ген astD из E.coli (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,826,280 по 1,827,758 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990) расположен между геном astB и геном astA на хромосоме штамма E.coli K-12. Нуклеотидная последовательность гена astD и аминокислотная последовательность белка AstD, кодируемого геном astD, приведены в Перечне последовательностей под номерами 5 (SEQ ID NO:5) и 6 (SEQ ID NO:6) соответственно.

Ген astB кодирует белок AstB, сукциниларгининдигидролазу (синоним - B1745). Ген astB из E.coli (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,824,940 по 1,826,283 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990) расположен между геном astE и геном astD на хромосоме штамма E.coli K-12. Нуклеотидная последовательность гена astB и аминокислотная последовательность белка AstB, кодируемого геном astB, приведены в Перечне последовательностей под номерами 7 (SEQ ID NO: 7) и 8 (SEQ ID NO: 8) соответственно.

Ген astE кодирует белок AstE, сукцинилглутаматдесукцинилазу (синоним - B1744). Ген astE из E.coli (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,823,979 по 1,824,947 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990) расположен между геном spy и геном astB на хромосоме штамма E.coli K-12. Нуклеотидная последовательность гена astE и аминокислотная последовательность белка AstE, кодируемого геном astE, приведены в Перечне последовательностей под номерами 9 (SEQ ID NO: 9) и 10 (SEQ ID NO: 10) соответственно.

Поскольку у представителей различных родов и штаммов семейства Enterobacteriaceae возможны некоторые вариации в нуклеотидных последовательностях, понятие инактивируемого оперона astCADBE не ограничивается генами, последовательности которых приведены в Перечне последовательностей под номерами SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9, но также может включать и гены, гомологичные SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9, кодирующие варианты белков AstC, AstA, AstD, AstB и AstE. Термин "вариант белка" может означать белок с изменениями в последовательности, будь то делеции, вставки, добавления или замены аминокислот, в котором у продукта сохраняется функциональная активность белков AstC, AstA, AstD, AstB и AstE. Число изменений в варианте белка зависит от положения или типа аминокислотного остатка в третичной структуре белка. Оно может быть от 1 до 30, или в другом примере от 1 до 15, или в другом примере от 1 до 5 в SEQ ID NO: 2, SEQ

ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10. Данные изменения в вариантах могут иметь место в областях, не критичных для функции белка. Данные изменения возможны потому, что некоторые аминокислоты имеют высокую гомологию друг к другу, поэтому такие изменения не влияют на третичную структуру или активность.

5 Следовательно, вариант белка, кодируемого геном оперона astCADBE, может быть представлен белками с гомологией не менее 80%, или в другом примере не менее 90%, или в другом примере не менее 95%, по отношению к полной аминокислотной последовательности, приведенной в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10, при условии сохранения до инактивации функциональности белков AstC, AstA, AstD, AstB и AstE.

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

15 Кроме того, гены оперона astCADBE могут быть вариантами, которые гибридизуются в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, приведенной в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9, или с зондом, который может быть синтезирован на основе указанной нуклеотидной последовательности, при условии, что до инактивации он кодирует функциональный белок AstC, AstA, AstD, AstB или AstE. «Жесткие условия» включают такие условия, при которых специфические гибриды, например, гибриды с гомологией не менее 60%, или в другом примере не менее 70%, или в другом примере не менее 80%, или в другом примере не менее 90%, или в другом примере не менее 95%, образуются, а неспецифические гибриды, например, гибриды с меньшей гомологией, чем указано выше, - не образуются.

20 Практическим примером жестких условий является однократная отмывка, предпочтительно двух- или трехкратная, при концентрации солей $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, предпочтительно $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, при 60°C. Продолжительность отмывки зависит от типа используемой для блоттинга 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 и обычно составляет около 100-1000 п.н.

30 Экспрессия оперона astCADBE может быть ослаблена путем введения в ген такой мутации, что внутриклеточная активность кодируемого геном белка снижается по сравнению с немодифицированным штаммом. Мутации, результатом которых является ослабление экспрессии гена, включают замену одного или более оснований для аминокислотной замены в кодируемом геном белке («миссенс»-мутация), введение стоп-кодона («нонсенс»-мутация), делецию одного или более оснований для сдвига рамки считывания, вставку гена устойчивости к антибиотику, или делецию гена или его части (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 оперона astCADBE также может быть ослаблена путем модификации экспрессии регуляторных последовательностей, таких как промотор, последовательность Shine-Dalgarno (SD) и т.д. (заявка PCT WO95/34672; Carrier, T.A. and Keasling, J.D., Biotechnol Prog 15, 58-64 (1999)).

50 Например, для введения мутаций путем генной рекомбинации могут применяться

следующие методы. Конструируется мутантный ген, кодирующий мутантный белок со сниженной активностью, и бактерия для ее модификации трансформируется фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме замещается путем гомологичной рекомбинации мутантным геном, отбирается полученный штамм. Замещение гена с использованием гомологичной рекомбинации может быть проведено методом с использованием линейной ДНК, известным как "Red-зависимая интеграция" или "интеграция посредством Red-системы" (Datsenko K.A., Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12, 6640-6645(2000)) или методом с использованием плазмиды, репликация которой чувствительна к температуре (патент США 6,303,383 или патентная заявка Японии JP 05-007491A). Кроме того, введение сайт-специфической мутации путем замещения гена с использованием вышеупомянутой гомологичной рекомбинации может также быть осуществлено с использованием плазмиды с пониженной способностью к репликации в клетке хозяина.

Экспрессия гена также может быть ослаблена вставкой транспозона или IS фактора в кодирующую область гена (патент США 5,175,107), или традиционными методами, такими как мутагенез с использованием УФ излучения или обработка нитрозогуанидином (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин).

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

Методы приготовления плазмидной ДНК, рестрикции и лигирования ДНК, трансформации, выбора нуклеотидов в качестве праймера и т.п. могут быть обычными методами, известными специалисту в этой области. Эти методы описаны, например, в Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Бактерия-продуцент L-аминокислоты

В качестве бактерии в соответствии с настоящим описанием изобретения может быть использована бактерия, модифицированная таким образом, что экспрессия оперона astCADBE в указанной бактерии ослаблена, и способная к продукции ароматической или неароматической L-аминокислоты.

Указанная бактерия в соответствии с настоящим описанием изобретения может быть получена путем ослабления экспрессии оперона astCADBE в бактерии, уже обладающей способностью к продукции L-аминокислоты. С другой стороны, указанная бактерия может быть получена путем придания способности к продукции L-аминокислоты бактерии, в которой экспрессия оперона astCADBE уже ослаблена.

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* PERM ВР-3756 (патент США 5474918), штаммы *E.coli* FERM ВР-3519 и FERM ВР-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 подобными им.

Штамм TDH-6 является дефицитным 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
 5 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
 10 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
 15 апреля 1987 г. с инвентарным номером В-3996.

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, и чувствительный к температуре С1
 20 репрессор фага λ и P_R -промотор замещает регуляторную область в треониновом опероне на плазмиде pVIC40. Штамм ВКПМ В-5318 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (РФ, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 3 мая 1990 г. с инвентарным номером В-5318.

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

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

Нуклеотидная последовательность гена *thrA*, кодирующего аспартокиназу-гомосериндегидрогеназу I из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 337 по 2799 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе
 40 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
 45 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
 50 оперон. Для усиления экспрессии треонинового оперона желательнее удалить из оперона область аттенуатора, который влияет на транскрипцию (заявка РСТ WO2005/049808, заявка РСТ WO2003/097839).

Мутантный ген *thrA*, кодирующий аспартокиназу-гомосериндегидрогеназу I,

устойчивую к ингибированию треонином по типу обратной связи, так же, как и гены *thrB* и *thrC*, может быть получен 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.

5 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
10 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 (тезисы 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, тезисы 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457; Европейская заявка EP 1013765 A).

15 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: 161313 07) 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
20 быть получены сходным образом.

25 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
30 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
35 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
40 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
45 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
50 Национальном Институте Биологических Наук и Человеческих Технологий, Агентство 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
 5 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
 10 Будапештского Договора 29 сентября 1995 года, и штамм получил инвентарный номер FERM BP-5252 (патент США 5827698).

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин, согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых
 15 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),
 20 диаминопимелатдекарбоксилазу (lysA), диаминопимелатдегидрогеназу (ddh) (патент США 6,040,160), фосфоенолпируваткарбоксилазу (ppc), аспартатсемиальдегиддегидрогеназу (asd),
 никотинамидадениндинуклеотидтрансгидрогеназу (pntAB) и аспартазу (aspA) (европейская заявка EP 1253195 A). Кроме того, родительские штаммы могут иметь
 25 повышенный уровень экспрессии гена, вовлеченного в процесс дыхания (cyo) (европейская заявка EP 1170376 A), гена, кодирующего никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназу (pntAB) (патент США 5,830,716), гена ybjE (заявка PCT WO 2005/073390), или комбинации этих генов.

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин, согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых
 30 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
 35 образования отличных от L-лизина соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-лизина, включают гомосериндегидрогеназу, лизиндекарбоксилазу (патент США 5,827,698) и малатдегидрогеназу(заявка PCT WO 2005/010175).

Бактерия-продуцент L-цистеина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-
 40 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,
 45 содержащий сверхэкспрессированные гены, кодирующие белок, способный к секреции соединений, токсичных для клетки (патент США 5972663); штаммы E.coli, содержащие цистеиндисульфогидразу со сниженной активностью (патент Японии JP11155571A2); штамм E.coli W3110 с повышенной активностью позитивного транскрипционного
 50 регулятора цистеинового регулона, кодируемого геном cysB (международная заявка PCT WO 0127307A1) и подобные им.

Бактерия-продуцент L-лейцина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-

5 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, включающих, 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 РСТ 96/06926; *E.coli* штамм Н-9068 (JP8-70879А), и подобные им.

10 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).

15 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 EP 1239041 A2).

Бактерия-продуцент L-гистидина

20 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 подобными им.

30 Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-гистидин, согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-гистидина. Примеры таких генов включают гены, кодирующие АТФ-фосфорибозилтрансферазу (*hisG*), фосфорибозил-АМФ-циклогидролазу (*hisI*), фосфорибозил-АТФ-фосфогидролазу (*hisIE*), фосфорибозилформимино-5-аминоимидазолкарбоксамидриботидизомеразу (*hisA*), амидотрансферазу (*hisH*), гистидинолфосфатаминотрансферазу (*hisC*), гистидинолфосфатазу (*hisB*), гистидинолдегидрогеназу (*hisD*) и т.д.

40 Известно, что гены, кодирующие ферменты биосинтеза L-гистидина (*hisG*, *hisBNAFI*), 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).

45 Специфические примеры штаммов, обладающих способностью к продукции 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 EP1016710А), штамм *E.coli* 80, которому придана устойчивость 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 бактерии-

5 продуцента L-глутаминовой кислоты согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E.coli* VL334 thrC⁺ (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 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), который обладает способностью к продукции L-глутаминовой кислоты.

10 Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-глутаминовой кислоты, согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, штаммы, дефектные по активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, или штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-глутаминовой кислоты.

15 Примеры таких ферментов включают глутаматдегидрогеназу(gdh), глутаминсинтетазу (glnA), глутаматсинтетазу (gltAB), изоцитратдегидрогеназу (icdA), аконитатгидратазу (acnA, acnB), цитратсинтазу (gltA),

20 фосфоенолпируваткарбоксилазу (ppc), пируватдегидрогеназу (aceEF, lpdA), пируваткиназу (pykA, pykF), фосфоенолпируватсинтазу (ppsA), енолазу (eno), фосфоглицеромутазу (pgmA, pgmI), фосфоглицераткиназу (pgk), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (gapA), триозофосфатизомеразу(triA),
25 фруктозобифосфатальдозазу (fbp), фосфофруктокиназу (pfkA, pfkB) и глюкозофосфатизомеразу (pgi).

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

35 Примеры родительских штаммов для получения продуцирующей 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, α -кетоглутаратдегидрогеназу, фосфотрансацетилазу, ацетаткиназу, синтазу ацетогидроксикислот, ацетолактатсинтазу, форматацетилтрансферазу, лактатдегидрогеназу и глутаматдекарбоксилазу. Бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, лишенные активности α -кетоглутаратдегидрогеназы или обладающие сниженной активностью α -кетоглутаратдегидрогеназы, и способы их получения описаны в патентах США 5,378,616 и 5,573,945. Конкретно, примеры таких штаммов включают в себя следующие штаммы:

45 *E.coli* W3110sucA::Km^R
E.coli AJ12624 (FERM BP-3853)
E.coli AJ12628 (FERM BP-3854)
E.coli AJ12949 (FERM BP-4881).

50 *E.coli* W3110sucA::Km^R - это штамм, полученный 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 AJ 13199 (FERM BP-5807) (патент США 5,908,768), или штамм FERM P-12379, дополнительно обладающий низкой активностью по расщеплению L-глутаминовой кислоты (патент США 5,393,671); штамм *E.coli* AJ 13138 (FERM BP-5565) (патент США 6,110,714) 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* AJ 13356 (патент США 6,331,419), штамм *Pantoea ananatis* AJ 13356, депонированный в Национальном Институте Биологических Наук и Человеческих Технологий, Агентство 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 Depository, 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* AJ 13356 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* AJ 13356. Тем не менее позднее он был классифицирован как *Pantoea ananatis* на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК и других доказательств. Несмотря на то, что штамм AJ 13356 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 AJ 12739 (*tyrA::Tn10, tyrR*) (ВКМП В-8197); штамм HW1089 (ATCC-55371), содержащий ген *pheA34* (патент США 5354672); мутантный штамм MWEC101-b (KR8903681); штаммы NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 и NRRL B-12147 (патент США 4407952) и пободные 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, pASMAV], названный как AJ12604 (FERM BP-3579) (Европейский патент EP488424 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 4,371,614). Кроме того, способность к продукции L-триптофана может быть придана путем усиления экспрессии гена (из триптофанового оперона), кодирующего триптофансинтазу (*trpBA*). 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 *proV*, кодирующий глутаматкиназу с десенсбилизированной 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, экскретирующие L-аминокислоту из бактериальной клетки. Примерами таких генов являются гены *b2682* и *b2683* (*ygaZH* гены) (Европейская патентная заявка EP1239041A2).

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) (патентная заявка США 2002/058315 A1) и его производные, содержащие мутантную N-ацетилглутаматсинтазу (патентная заявка РФ 2001112869), штамм *E.coli* 382 (ВКПМ В-7926) (Европейская патентная заявка EP 1170358A1), штамм-продуцент аргинина, в который введен ген *argA*, кодирующий N-ацетилглутаматсинтазу (Европейская патентная заявка EP 1170361A1), 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*), орнитинкарбамоилтрансферазу (*argF*), синтазу аргининсукциниловой кислоты (*argG*), лиазу аргининсукциниловой кислоты (*argH*) и карбамоилфосфатсинтазу (*carAB*).

Бактерия-продуцент цитруллина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента цитруллина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, штаммы, принадлежащие к роду *Escherichia*, такие как мутантные по N-ацетилглутаматсинтазе штаммы *E.coli* 237/pMADS11, 237/pMADS12 и 237/pMADS13 (RU 2215783, EP 1170361 B1, US 6790647B2).

Также бактерию-продуцент цитруллина можно легко получить из любой бактерии-продуцента аргинина, например, из штамма *E.coli* 382 (ВКПМ В-7926), путем инактивации аргининсукцинатсинтазы, кодируемой геном *argG*.

Фраза "инактивация аргининсукцинатсинтазы" означает, что бактерия модифицирована таким образом, что модифицированная бактерия содержит неактивную аргининсукцинатсинтазу или также она может означать, что бактерия не

способна синтезировать аргининсукцинатсинтазу. Инактивация аргининсукцинатсинтазы может быть осуществлена путем инактивации гена argG.

5 Фраза "инактивация гена argG" означает, что модифицированный ген кодирует полностью нефункциональный белок. Также возможно, что область
модифицированной ДНК не способна к естественной экспрессии гена из-за делеции
части гена или всего гена, сдвига рамки считывания гена, введения миссенс/нонсенс
мутации(-ий) или модификации прилегающих к гену областей, включая
последовательности, контролирующие экспрессию гена, такие как промотор,
10 энхансер, аттенюатор, сайт связывания рибосомы и т.д.

Наличие или отсутствие гена argG на хромосоме бактерии может быть определено хорошо известными методами, включая ПЦР, блоттинг по Саузерну и т.п. Кроме того, уровень экспрессии гена можно оценить определением количества
15 транскрибируемой с гена РНК с использованием различных известных методов, включая блоттинг по Нозерну, количественную ОТ-ПЦР и т.п. Количество белка, кодируемого геном argG, можно определить известными методами, включая электрофорез в SDS-ПААГ с последующим иммуоблоттингом (Вестерн-блоттинг) и т.д.

20 Экспрессия гена argG может быть ослаблена введением в ген на хромосоме такой мутации, что внуктриклеточная активность кодируемого геном белка уменьшена по сравнению с таковой в немодифицированном штамме. Такой мутацией гена может быть замена одного или более оснований для аминокислотной замены в кодируемом геном белке («миссенс»-мутация), введение стоп-кодона («нонсенс»-мутация), делеция
25 одного или более оснований для сдвига рамки считывания, вставка гена устойчивости к антибиотику или делеция гена или его части (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 argG также может быть ослаблена путем модификации экспрессии регуляторных последовательностей, таких как промотор, последовательность Shine-Dalgarno (SD) и т.д (заявка РСТ WO 95/34672; Carrier T.A. and Keasling J.D., Biotechnol Prog 15, 58-64 (1999)).

30 Например, следующие методы могут применяться для введения мутаций путем генной рекомбинации. Конструируется мутантный ген, кодирующий мутантный белок со сниженной активностью, и бактерия для ее модификации трансформируется фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме замещается гомологичной рекомбинацией мутантным геном, отбирается полученный
штамм. Такое замещение гена с использованием гомологичной рекомбинации может
40 быть проведено методом с использованием линейной ДНК, известный как "Red-зависимая интеграция" или "интеграция посредством Red-системы" (Datsenko K.A., Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12, 6640-6645(2000), заявка РСТ WO 2005/010175) или методом с использованием плазмиды, репликация которой чувствительна к температуре (патент США 6,303,383 или патентная заявка Японии JP
45 05-007491A). Далее, введение сайт-специфической мутации путем замещения гена с использованием вышеупомянутой гомологичной рекомбинации может также быть осуществлено с использованием плазмиды с пониженной способностью к репликации в клетке хозяина.

50 Экспрессия гена также может быть ослаблена вставкой транспозона или IS фактора в кодирующую область гена (патент США 5,175,107), или традиционными методами, такими как мутагенез с использованием УФ излучения или обработка нитрозогуанидином (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин).

Бактерия-продуцент орнитина

Бактерия-продуцент орнитина может быть легко получена из любой бактерии-продуцента аргинина, например, штамма *E.coli* 382 (ВКПМ В-7926), путем инактивации орнитинкарбамоилтрансферазы, кодируемой генами *argF* и *argI*. Методы для инактивации орнитинкарбамоилтрансферазы описаны выше.

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-синтетазы (патент США 5658766). Например, может использоваться штамм *E.coli* VL1970, который имеет мутацию в гене *ileS*, кодирующем изолейцин-тРНК-синтетазу. Штамм *E.coli* VL1970 депонирован в Российской Национальной Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 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 5-304969А), 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 5-130882А). 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 2-458А, 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 бактерии.

Питательная среда, используемая для выращивания, может быть как синтетической, так и натуральной, при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, минеральные добавки и, если необходимо, соответствующее количество

питательных добавок, необходимых для роста микроорганизмов. В качестве источника углерода используют различные углеводороды, такие как глюкоза и сахароза, а также различные органические кислоты. В зависимости от вида ассимиляции используемого микроорганизма может использоваться спирт, включая 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, ферментолитат 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, дрожжевой экстракт и т.п.

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. pH среды поддерживают в пределах от 5 до 9, предпочтительно от 6.5 до 7.2. pH 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 среде.

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.

Примеры

Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже со ссылкой на следующие не ограничивающие настоящее изобретение примеры.

Пример 1. Конструирование штамма с инактивированным опероном astCADBE.

1. Деления оперона astCADBE

Штамм, содержащий делецию оперона astCADBE, был сконструирован с использованием методики "Red-зависимой интеграции". Фрагмент ДНК, содержащий маркер Cm^R, кодируемый геном cat, был получен в ПЦР с использованием праймеров P1 (SEQ ID NO: 11) и P2 (SEQ ID NO: 12) и плазмиды pMW118-attL-Cm-attR в качестве матрицы. Использовали следующий температурный профиль для ПЦР: денатурация при 94°C в течение 30 сек; последующие 25 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 55°C, 90 сек при 72°C; и заключительная полимеризация: 2 мин при 72°C.

Полученный ПЦР-продукт очищали в агарозном геле и использовали для электропорации в штамм E.coli MG1655, содержащий плазмиду pKD46 с термочувствительным репликоном.

Электрокомпетентные клетки были получены следующим образом: ночную культуру штамма E.coli MG1655/pKD46 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 OD₆₀₀≈0.6, после чего делали клетки электрокомпетентными путем концентрирования в 100 раз и трехкратного отмывания ледяной деионизированной H₂O. Электропорацию проводили с использованием 70 мкл клеток и ≈100 нг ПЦР-продукта. 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 30 мкг/мл хлорамфеникола, и выращивали при 37°C для отбора Cm^R-рекомбинантов. Затем для удаления плазмиды rKD46 проводили два пассажа на L-агаре с Cm при 42°C, и

полученные колонии проверяли на чувствительность к ампициллину.

2. Подтверждение делеции оперона astCADBE с использованием ПЦР.

Мутанты с делегированным опероном astCADBE, содержащие ген устойчивости Cm, были проверены с помощью ПЦР. Лocus-специфичные праймеры P3 (SEQ ID NO: 13) и P4 (SEQ ID NO: 14) были использованы для проверки делеции с помощью ПЦР.

Использовался следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: денатурация при 94°C в течение 30 сек; 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 MG1655, составляет ~6.1 т.п.н. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток мутантного штамма, составляет ~1.7 т.п.н. Мутантный штамм был назван MG1655 Δ astCADBE::cat.

Пример 2. Продукция L-треонина штаммом E.coli B-3996-ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию треонина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-треонина E.coli B-3996 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма B-3996-ΔchaC/ B-3996- ΔastCADBE.

Штамм B-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 (ВКПИМ) (РФ, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 7 апреля 1987 г. с инвентарным номером B-3996.

Оба штамма E.coli, B-3996 и B-3996-ΔastCADBE, 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 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% сахарозой. Затем в ферментационную среду может быть внесено по 0.21 мл (10%) посевной культуры. Ферментация может быть проведена в 2 мл минимальной ферментационной среды в пробирках размером 20×200 мм. Клетки могут быть выращены в течение 65 часов при 32°C с перемешиванием (250 об/мин).

После выращивания количество накопленного в среде L-треонина может быть определено с помощью бумажной хроматографии с использованием подвижной фазы следующего состава: бутанол: уксусная кислота: вода = 4:1:1 (v/v). Для визуализации может быть использован раствор (2%) нингидрина в ацетоне. Пятно, содержащее L-треонин, может быть вырезано; L-треонин может быть элюирован 0.5% водным раствором CdCl₂, после чего количество L-треонина может быть оценено спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм.

Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	80.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	22.0
NaCl	0.8
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.8

FeSO ₄ 7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ 5H ₂ O	0.02
Тиамин гидрохлорид	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
CaCO ₃	30.0

5

Глюкозу и сульфат магния стерилизуют отдельно. CaCO₃ стерилизуют сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. рН доводят до 7.0. Антибиотик добавляют в среду после стерилизации.

10 Пример 3. Продукция L-лизина штаммом E.coli AJ11442-ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию лизина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::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- ΔastCADBE. В составе плазмиды pCABD2 имеются ген *dapA*, кодирующий дигидродипиколинатсинтазу с мутацией, снимающей ингибирование L-лизином по типу обратной связи, ген *lysC*, кодирующий аспартокиназу III с мутацией, снимающей ингибирование L-лизином по типу обратной связи, ген *dapB*, кодирующий дигидродипиколинатредуктазу, и ген *ddh*, кодирующий диаминопимелатдегидрогеназу (US Patent 6,040,160).

Штаммы E.coli AJ11442 и AJ11442-ΔastCADBE 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.

30 Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	24.0
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

35

40

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

45

Пример 4. Продукция L-цистеина штаммом E.coli JM15(ydeD)-ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-цистеина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::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) с целью получения штамма JM15(ydeD)- ΔastCADBE.

50

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).

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

Пример 5. Продукция L-лейцина штаммом E.coli 57-ΔchaC/E.coli 57-ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-лейцина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::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) с целью получения штамма 57-ΔastCADBE. Штамм 57 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (РФ, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 19 мая 1997 г. с инвентарным номером ВКПМ В-7386.

Штаммы E.coli 57 и 57-ΔastCADBE 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% сахарозы. Затем в ферментационную среду может быть внесено по 0.21 мл (10%) посевного материала. 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).

Состав ферментационной среды (pH 7.2) (г/л):

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

Глюкозу и CaCO₃ стерилизуют отдельно.

Пример 6. Продукция L-гистидина штаммом E.coli 80-ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-гистидина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::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) с целью получения штамма 80-ΔastCADBE. 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.

Штаммы E.coli 80 и 80-ΔastCADBE могут быть выращены на L-бульоне при 29°C в течение 6 часов. Затем по 0.1 мл 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):

5

10

15

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

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

20

Пример 7. Продукция L-глутаминовой кислоты штаммом *E.coli* VL334thrC⁻ ΔastCADBE.

25

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-глутаминовой кислоты ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E.coli* MG1655 ΔastCADBE::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-глутаминовой кислоты *E.coli* VL334thrC⁺ (EP 1172433) с помощью P1-трансдукции (Miller J.H. (1972), Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма VL334thrC⁺-ΔastCADBE. Штамм VL334thrC⁺ депонирован во

30

Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 6 декабря 2004 г. с инвентарным номером ВКПМ В-8961, затем 8 декабря 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

35

Штаммы *E.coli* VL334thr C⁺ и VL334thrC⁻ ΔastCADBE 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.

40

Ферментационная среда может 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 мел - 25 г/л (рН 7.2). Глюкозу и мел стерилизуют 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.

45

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

50

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-фенилаланина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E.coli* MG1655 ΔastCADBE::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) с целью получения штамма AJ12739-AastCADBE. 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.

5 Штаммы *E.coli* AJ12739 и AJ12739- Δ astCADBE могут быть выращены при 37°C в течение 18 часов в питательном бульоне, 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 37°C в течение 48 часов на роторной качалке. По
10 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
15 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):

20	Глюкоза	40.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	16.0
	K ₂ HPO ₄	0.1
	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
25	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
30	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 astCADBE.

35 Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-триптофана ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E.coli* MG1655 Δ astCADBE::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) с целью получения штамма SV164(pGH5)-
40 Δ astCADBE. Штамм SV164 содержит аллель trpE, кодирующий антранилатсинтазу, не подверженную ингибированию триптофаном по типу обратной связи. Плазмида pGH5 содержит мутантный ген serA, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, не подверженную ингибированию серином по типу обратной связи. Штамм SV164 (pGH5)
45 подробно описан в патенте США 6180373 или Европейском патенте 0662143.

Штаммы *E.coli* SV164(pGH5) и SV164(pGH5)- Δ astCADBE могут быть выращены с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона с добавлением тетрациклина (маркера плазмиды pGH5, 10 мкг/мл). По 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды, содержащей
50 тетрациклин (10 мкг/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 7.

Компоненты используемой ферментационной среды представлены в Таблице 2; группы компонентов А, В, С, D, Е, F и H стерилизуют отдельно, как и показано в Таблице 2, во избежание нежелательных взаимодействий во время стерилизации.

Пример 10. Продукция L-пролина штаммом E.coli 702ilvA- ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-пролина ДНК-фрагменты из хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::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) с целью получения штамма 702ilvA- ΔastCADBE. Штамм 702ilvA депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) с инвентарным номером ВКПМ В-8012, затем 18 мая 2001 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Штаммы E.coli 702ilvA и 702ilvA-ΔastCADBE 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 6.

Пример 11. Продукция L-аргинина штаммом E.coli 382-ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-аргинина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE:: cat были 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-ΔastCADBE. 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 и 382 ΔastCADBE, выращивали с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона, по 0.3 мл полученных культур вносили в 3 мл ферментационной среды в пробирки размером 20×200 мм, и культуры выращивали при 32°C в течение 48 часов на роторной качалке.

После выращивания количество накопленного в среде L-аргинина определяли с помощью бумажной хроматографии, при этом использовали следующий состав подвижной фазы: бутанол: уксусная кислота: вода = 4:1:1 (v/v). Раствор нингидрина (2%) в ацетоне использовали для визуализации. Пятно, содержащее L-аргинин, вырезали; L-аргинин элюировали 0.5% водным раствором CdCl₂, после чего количество L-аргинина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Результаты десяти независимых пробирочных ферментации представлены в Таблице 1. Как следует из Таблицы 1, штамм 382-ΔastCADBE накапливал большее количество L-аргинина, чем штамм 382.

Была использована ферментационная среда следующего состава (г/л):

Глюкоза	48.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	35.0
KN ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
Тиамин HCl	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
L-изолейцин	0.1

Глюкозу и сульфат магния стерилизовали отдельно. CaCO₃ стерилизовали сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. рН довели до 7.0.

5 Пример 12. Продукция L-цитруллина штаммом E.coli 382ΔargG ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-цитруллина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент цитруллина E.coli 382ΔargG с помощью P1-трандукции (Miller J.H. (1972), Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма 382ΔargG ΔastCADBE. Штамм 382ΔargG может быть получен в результате делеции гена argG на хромосоме штамма 382 (ВКПМ В-7926) с использованием метода, предложенного Datsenko K.A. and Wanner B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645), называемого "Red-зависимая интеграция". В соответствии с этой процедурой могут быть сконструированы ПЦР-праймеры, гомологичные как области, прилегающей к гену argG, так и гену, отвечающему за устойчивость к антибиотику. В качестве матрицы в ПЦР может быть использована плазида pMW118-attL-Cm-attR (WO 05/010175).

20 Оба штамма E.coli, 382ΔargG и 382ΔargG ΔastCADBE, могут быть выращены с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательной среды, и 0.3 мл полученных культур могут быть перенесены в 2 мл ферментационной среды в пробирках 20×200 мм и могут быть культивированы при 32°C в течение 48 часов на роторной качалке.

После выращивания количество полученного цитруллина может быть определено с помощью бумажной хроматографии с использованием подвижной фазы следующего состава: бутанол-уксусная кислота-вода = 4:1:1. Последующее окрашивание может быть выполнено нингидрином (2% раствор в ацетоне). Содержащее цитруллин пятно может быть вырезано, цитруллин может быть элюирован с использованием 0.5% водного раствора CdCl₂, и количество цитруллина может быть определено спектрофотометрически при длине волны 540 нм.

Возможный состав ферментационной среды (г/л):

35	Глюкоза	48.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	35.0
	КН ₂ РО ₄	2.0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
40	Тиамин НС1	0.0002
	Дрожжевой экстракт	1.0
	L-изолейцин	0.1
	L-аргинин	0.1
	CaCO ₃	5.0

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

Пример 13. Продукция орнитина штаммом E.coli 382 ΔargFΔargI ΔastCADBE.

Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию орнитина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент орнитина E.coli 382ΔargFΔargI с помощью P1-трандукции (Miller J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма 382 ΔargFΔargI ΔastCADBE.

Штамм 382ΔargFΔargI может быть получен в результате последовательных делеций генов argF и argI на хромосоме штамма 382 (ВКПМ В-7926) с использованием метода, предложенного Datsenko K.A. and Wanner B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645), называемого "Red-зависимая интеграция". В соответствии с этой

5 процедурой могут быть сконструированы две пары ПЦР-праймеров, гомологичных как областям, прилегающим к генам argF и argI, так и гену, отвечающему за устойчивость к антибиотику. В качестве матрицы в ПЦР может быть использована плаزمиды pMW118-attL-Cm-attR (WO 05/010175).

10 Оба штамма E.coli, 382ΔargFΔargI и 382ΔargFΔargI ΔastCADBE, могут быть выращены с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательной среды, и 0.3 мл полученных культур могут быть перенесены в 2 мл ферментационной среды в пробирках 20×200 мм и могут быть культивированы при 32°C в течение 48 часов на роторной качалке.

15 После выращивания количество полученного орнитина может быть определено с помощью бумажной хроматографии с использованием подвижной фазы следующего состава: бутанол-уксусная кислота-вода = 4:1:1. Последующее окрашивание может быть выполнено нингидрином (2% раствор в ацетоне). Содержащее цитруллин пятно

20 может быть вырезано, цитруллин может быть элюирован с использованием 0.5% водного раствора CdCl₂, и количество цитруллина может быть определено спектрофотометрически при длине волны 540 нм.

Возможный состав ферментационной среды (г/л):

25	Глюкоза	48.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	35.0
	KH ₂ PO ₄	2.0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
	Тиамин HCl	0.0002
30	Дрожжевой экстракт	1.0
	L-изолейцин	0.1
	L-аргинин	0.1
	CaCO ₃	5.0

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

Пример 14. Продукция L-валина штаммом E.coli H-81 ΔastCADBE.

40 Для оценки влияния инактивации оперона astCADBE на продукцию L-валина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма E.coli MG1655 ΔastCADBE::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент валина E.coli H-81 методом P1 трансдукции (Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) с целью получения штамма H-81 ΔastCADBE.

45 Оба штамма E.coli, H-81 и H-81 ΔastCADBE, могут быть выращены при 37°C в течение 18 ч в питательном бульоне и по 0.1 мл каждой из полученных культур могут быть инокулированы в 2 мл среды для ферментации в пробирках 20×200 мм и выращены при 32°C в течение 72 ч на роторной качалке. После культивирования в течение 48 ч и в течение 72 ч количество накопленного L-валина может быть

50 определено с использованием ТСХ. Могут использоваться пластины для ТСХ размером 10×15 см, покрытые 0.11-мм слоем силикагеля Сорбфил без флуоресцентного индикатора (Акционерное Общество Сорбполимер, Краснодар, Россия). Пластины 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	60.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	15.0
KH ₂ PO ₄	1.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
Мамено (TN)	0.4
CaCO ₃	25.0

CaCO₃ стерилизуют сухим жаром при 180°C в течение 2 ч. pH доводят до 7.0.

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.

Штамм	OD540	Количество L-аргинина, г/л
382	15.7±0.5	8.0±0.2
382-ΔastCADBE	15.0±0.5	10.5±0.9

Растворы	Компонент	Конечная концентрация, г/л
А	KH ₂ PO ₄	1.5
	NaCl	0.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5
	L-метионин	0.05
	L-фенилаланин	0.1
	L-тирозин	0.1
	Мамено (общий N)	0.07
В	Глюкоза	40.0
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.03
	CaCl ₂	0.011
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.075
D	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00015
	H ₃ BO ₃	0.0025
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.00007
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.00025
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.0016
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0003
	E	Тиамин HCl
F	CaCO ₃	30.0
G	Пиридоксин	0.03

pH раствора А доводят до значения 7.1 с использованием NH₄OH.

Формула изобретения

1. Бактерия-продуцент L-аргинина, принадлежащая к роду *Escherichia*, модифицированная таким образом, что оперон astCADBE в указанной бактерии инактивирован.

2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия принадлежит к виду *Escherichia coli*.

3. Бактерия по любому из пп.1 и 2, отличающаяся тем, что указанный оперон *astCADBE* инактивирован за счет делеции оперона *astCADBE* в хромосоме бактерии.

4. Способ получения L-аргинина, включающий:
выращивание бактерии по любому из пп.1-3 в питательной среде; и
выделение L-аргинина из культуральной жидкости.

10

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 WITH ATTENUATED EXPRESSION

<130> ast

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1221

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1221)

<400> 1

atg tct cag cca att acg cgt gaa aac ttt gat gaa tgg atg ata cct	48
Met Ser Gln Pro Ile Thr Arg Glu Asn Phe Asp Glu Trp Met Ile Pro	
1 5 10 15	
gtt tac gct ccg gca ccc ttt ata ccg gta cgt ggc gaa ggt tcg cgc	96
Val Tyr Ala Pro Ala Pro Phe Ile Pro Val Arg Gly Glu Gly Ser Arg	
20 25 30	
ttg tgg gat cag cag ggg aaa gag tat atc gac ttc gcg ggt ggc att	144
Leu Trp Asp Gln Gln Gly Lys Glu Tyr Ile Asp Phe Ala Gly Gly Ile	
35 40 45	
gcg gtg aac gcg ctg ggc cat gcg cat ccg gaa ctg cgt gaa gcg ctg	192
Ala Val Asn Ala Leu Gly His Ala His Pro Glu Leu Arg Glu Ala Leu	
50 55 60	
aac gaa cag gcg agt aag ttc tgg cat acc ggc aac ggt tac acc aac	240
Asn Glu Gln Ala Ser Lys Phe Trp His Thr Gly Asn Gly Tyr Thr Asn	
65 70 75 80	
gag ccg gta ctg cga ctg gcg aaa aaa ttg atc gac gcc acg ttt gcc	288
Glu Pro Val Leu Arg Leu Ala Lys Lys Leu Ile Asp Ala Thr Phe Ala	
85 90 95	
gat cgc gtc ttc ttt tgt aac tcc ggt gcg gaa gcc aac gaa gcg gcg	336
Asp Arg Val Phe Phe Cys Asn Ser Gly Ala Glu Ala Asn Glu Ala Ala	
100 105 110	
cta aaa ctg gcg cgt aaa ttc gct cac gac cgc tac ggc agc cat aag	384
Leu Lys Leu Ala Arg Lys Phe Ala His Asp Arg Tyr Gly Ser His Lys	
115 120 125	
agc ggc atc gtg gcg ttc aaa aat gcg ttt cat ggt cgc acg ctg ttt	432
Ser Gly Ile Val Ala Phe Lys Asn Ala Phe His Gly Arg Thr Leu Phe	
130 135 140	
act gtc agt gcg ggt ggg cag cca gcc tat tca cag gat ttt gcg cca	480
Thr Val Ser Ala Gly Lys Gln Pro Ala Tyr Ser Gln Asp Phe Ala Pro	
145 150 155 160	

ctg ccg gcg gat att cgt cat gct gca tat aac gat att aac tct gcc	528
Leu Pro Ala Asp Ile Arg His Ala Ala Tyr Asn Asp Ile Asn Ser Ala	
165 170 175	
agc gcg ctg att gac gac tct acc tgt gcg gtg att gtc gaa ccc atc	576
Ser Ala Leu Ile Asp Asp Ser Thr Cys Ala Val Ile Val Glu Pro Ile	
180 185 190	
cag ggg gaa ggc ggt gtg gtg cca gcc agc aac gcg ttt tta caa ggt	624
Gln Gly Glu Gly Gly Val Val Pro Ala Ser Asn Ala Phe Leu Gln Gly	
195 200 205	
ctg cgt gaa ttg tgt aac cgc cac aat gcg ctg ttg att ttt gat gaa	672
Leu Arg Glu Leu Cys Asn Arg His Asn Ala Leu Leu Ile Phe Asp Glu	
210 215 220	
gta caa acc ggc gtc ggg cgc acc ggg gaa ctg tat gcc tat atg cac	720
Val Gln Thr Gly Val Gly Arg Thr Gly Glu Leu Tyr Ala Tyr Met His	
225 230 235 240	
tac ggc gtg acg cct gat ctg tta act acc gcc aaa gcg ctg ggc ggc	768
Tyr Gly Val Thr Pro Asp Leu Leu Thr Thr Ala Lys Ala Leu Gly Gly	
245 250 255	
ggc ttc ccg gtc ggt gcg ttg ttg gca acc gaa gag tgc gcc cgc gtg	816
Gly Phe Pro Val Gly Ala Leu Leu Ala Thr Glu Glu Cys Ala Arg Val	
260 265 270	
atg acc gtt ggc act cat ggc acc acc tat ggc ggt aat ccg ctg gcc	864
Met Thr Val Gly Thr His Gly Thr Thr Tyr Gly Gly Asn Pro Leu Ala	
275 280 285	
tcg gcg gtg gca ggc aaa gtg ctg gag ctc atc aac aca cca gag atg	912
Ser Ala Val Ala Gly Lys Val Leu Glu Leu Ile Asn Thr Pro Glu Met	
290 295 300	
ctt aat ggc gtt aaa cag cgt cac gac tgg ttt gtt gag cgt ctt aat	960
Leu Asn Gly Val Lys Gln Arg His Asp Trp Phe Val Glu Arg Leu Asn	
305 310 315 320	
act att aat cac cgc tat ggt ttg ttc agt gaa gtt cgc ggc tta ggt	1008
Thr Ile Asn His Arg Tyr Gly Leu Phe Ser Glu Val Arg Gly Leu Gly	
325 330 335	
ttg ctg att ggc tgt gta ctg aat gcc gat tac gcc ggg caa gcg aaa	1056
Leu Leu Ile Gly Cys Val Leu Asn Ala Asp Tyr Ala Gly Gln Ala Lys	
340 345 350	
cag atc tct cag gaa gcg gcg aaa gca ggc gtg atg gta ctg att gcg	1104
Gln Ile Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala Gly Val Met Val Leu Ile Ala	
355 360 365	
ggc ggc aac gtg gtg cgt ttt gcg cct gcg ctc aat gtc agc gaa gaa	1152
Gly Gly Asn Val Val Arg Phe Ala Pro Ala Leu Asn Val Ser Glu Glu	
370 375 380	
gag gtg acg acc gga ctg gat cgc ttt gca gct gct tgc gaa cac ttt	1200
Glu Val Thr Thr Gly Leu Asp Arg Phe Ala Ala Ala Cys Glu His Phe	
385 390 395 400	
ggt agc cga ggt tca tca tga	1221
Val Ser Arg Gly Ser Ser	
405	

<210> 2
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 2

Met Ser Gln Pro Ile Thr Arg Glu Asn Phe Asp Glu Trp Met Ile Pro
 1 5 10 15

Val Tyr Ala Pro Ala Pro Phe Ile Pro Val Arg Gly Glu Gly Ser Arg
 20 25 30

Leu Trp Asp Gln Gln Gly Lys Glu Tyr Ile Asp Phe Ala Gly Gly Ile
 35 40 45

Ala Val Asn Ala Leu Gly His Ala His Pro Glu Leu Arg Glu Ala Leu
 50 55 60

Asn Glu Gln Ala Ser Lys Phe Trp His Thr Gly Asn Gly Tyr Thr Asn
 65 70 75 80

Glu Pro Val Leu Arg Leu Ala Lys Lys Leu Ile Asp Ala Thr Phe Ala
 85 90 95

Asp Arg Val Phe Phe Cys Asn Ser Gly Ala Glu Ala Asn Glu Ala Ala
 100 105 110

Leu Lys Leu Ala Arg Lys Phe Ala His Asp Arg Tyr Gly Ser His Lys
 115 120 125

Ser Gly Ile Val Ala Phe Lys Asn Ala Phe His Gly Arg Thr Leu Phe
 130 135 140

Thr Val Ser Ala Gly Gly Gln Pro Ala Tyr Ser Gln Asp Phe Ala Pro
 145 150 155 160

Leu Pro Ala Asp Ile Arg His Ala Ala Tyr Asn Asp Ile Asn Ser Ala
 165 170 175

Ser Ala Leu Ile Asp Asp Ser Thr Cys Ala Val Ile Val Glu Pro Ile
 180 185 190

Gln Gly Glu Gly Gly Val Val Pro Ala Ser Asn Ala Phe Leu Gln Gly
 195 200 205

Leu Arg Glu Leu Cys Asn Arg His Asn Ala Leu Leu Ile Phe Asp Glu
 210 215 220

Val Gln Thr Gly Val Gly Arg Thr Gly Glu Leu Tyr Ala Tyr Met His
 225 230 235 240

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

Gly Phe Pro Val Gly Ala Leu Leu Ala Thr Glu Glu Cys Ala Arg Val
 260 265 270

Met Thr Val Gly Thr His Gly Thr Thr Tyr Gly Gly Asn Pro Leu Ala
 275 280 285

Ser Ala Val Ala Gly Lys Val Leu Glu Leu Ile Asn Thr Pro Glu Met
 290 295 300

Leu Asn Gly Val Lys Gln Arg His Asp Trp Phe Val Glu Arg Leu Asn
 305 310 315 320

Thr Ile Asn His Arg Tyr Gly Leu Phe Ser Glu Val Arg Gly Leu Gly
 325 330 335

Leu Leu Ile Gly Cys Val Leu Asn Ala Asp Tyr Ala Gly Gln Ala Lys
 340 345 350

Gln Ile Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala Gly Val Met Val Leu Ile Ala
 355 360 365

Gly Gly Asn Val Val Arg Phe Ala Pro Ala Leu Asn Val Ser Glu Glu
 370 375 380

Glu Val Thr Thr Gly Leu Asp Arg Phe Ala Ala Ala Cys Glu His Phe
 385 390 395 400

Val Ser Arg Gly Ser Ser
 405

<210> 3
 <211> 1035
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> . (1)..(1035)

<400> 3
 atg atg gtc atc cgt ccc gtt gag cga tca gat gtc tcg gcg ctg atg 48
 Met Met Val Ile Arg Pro Val Glu Arg Ser Asp Val Ser Ala Leu Met
 1 5 10 15

cag ctt gcc agc aaa acg ggc ggc ggc ctg acg tcg ctt ccc gcc aat 96

Gln	Leu	Ala	Ser	Lys	Thr	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro	Ala	Asn		
			20					25					30				
gaa	gcc	acg	ctt	tcg	gcg	cgt	atc	gaa	agg	gca	atc	aaa	acc	tgg	caa		144
Glu	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Ile	Lys	Thr	Trp	Gln		
		35					40					45					
ggc	gaa	ctg	ccc	aaa	agt	gag	cag	ggc	tat	gtg	ttc	gtg	ctg	gaa	gat		192
Gly	Glu	Leu	Pro	Lys	Ser	Glu	Gln	Gly	Tyr	Val	Phe	Val	Leu	Glu	Asp		
	50					55				60							
agc	gag	aca	ggc	acc	gtg	gcg	ggg	att	tgt	gcc	att	gag	gtg	gcg	gtt		240
Ser	Glu	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Cys	Ala	Ile	Glu	Val	Ala	Val		
65					70					75					80		
ggg	ctg	aac	gat	ccc	tgg	tac	aac	tat	cgc	gtc	ggc	acg	ttg	gtt	cac		288
Gly	Leu	Asn	Asp	Pro	Trp	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Val	Gly	Thr	Leu	Val	His		
			85					90					95				
gcc	tca	aaa	gag	ctg	aat	gtc	tat	aac	gca	ttg	ccg	acg	ctg	ttt	ctc		336
Ala	Ser	Lys	Glu	Leu	Asn	Val	Tyr	Asn	Ala	Leu	Pro	Thr	Leu	Phe	Leu		
			100					105					110				
agt	aac	gat	cac	acc	ggc	agc	agc	gag	ctg	tgc	acg	ctg	ttt	ctc	gac		384
Ser	Asn	Asp	His	Thr	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Leu	Asp		
		115					120					125					
ccg	gac	tgg	cgc	aaa	gag	ggc	aac	ggc	tat	ttg	ctg	tcg	aaa	tcg	cgc		432
Pro	Asp	Trp	Arg	Lys	Glu	Gly	Asn	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Arg		
	130					135					140						
ttt	atg	ttt	atg	gcg	gct	ttt	cgc	gac	aag	ttt	aat	gac	aaa	gtg	gtt		480
Phe	Met	Phe	Met	Ala	Ala	Phe	Arg	Asp	Lys	Phe	Asn	Asp	Lys	Val	Val		
145				150					155					160			
gct	gaa	atg	cgc	ggg	gtg	att	gac	gaa	cac	ggc	tat	tca	ccg	ttc	tgg		528
Ala	Glu	Met	Arg	Gly	Val	Ile	Asp	Glu	His	Gly	Tyr	Ser	Pro	Phe	Trp		
				165					170					175			
caa	agc	ctc	ggt	aaa	cgc	ttc	ttt	tcg	atg	gat	ttt	agc	cgc	gcc	gat		576
Gln	Ser	Leu	Gly	Lys	Arg	Phe	Phe	Ser	Met	Asp	Phe	Ser	Arg	Ala	Asp		
			180					185					190				
ttt	ctc	tgc	ggc	acc	ggg	caa	aag	gca	ttt	att	gca	gaa	ctg	atg	ccg		624
Phe	Leu	Cys	Gly	Thr	Gly	Gln	Lys	Ala	Phe	Ile	Ala	Glu	Leu	Met	Pro		
		195					200					205					
aaa	cat	ccg	atc	tat	acc	cac	ttt	tta	tcc	cag	gaa	gcc	cag	gac	gtc		672
Lys	His	Pro	Ile	Tyr	Thr	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Glu	Ala	Gln	Asp	Val		
		210				215					220						
atc	ggt	cag	gta	cat	ccg	caa	acc	gcg	cct	gcc	cgc	gcg	gtg	ctg	gag		720
Ile	Gly	Gln	Val	His	Pro	Gln	Thr	Ala	Pro	Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Glu		
225					230					235				240			
aaa	gaa	ggt	ttt	cgc	tac	cgt	aac	tat	atc	gac	atc	ttt	gac	ggt	ggg		768
Lys	Glu	Gly	Phe	Arg	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Ile	Asp	Ile	Phe	Asp	Gly	Gly		
			245					250					255				
ccg	acg	ctt	gag	tgt	gac	atc	gac	cgc	gtg	cgc	gcc	atc	cgt	aaa	agt		816
Pro	Thr	Leu	Glu	Cys	Asp	Ile	Asp	Arg	Val	Arg	Ala	Ile	Arg	Lys	Ser		
			260				265						270				
cgg	ctg	gtg	gaa	gtg	gca	gaa	ggg	cag	cct	gcg	cag	ggc	gat	ttc	cca		864

Arg Leu Val Glu Val Ala Glu Gly Gln Pro Ala Gln Gly Asp Phe Pro
 275 280 285

gcc tgc ctg gtc gcc aat gaa aat tat cac cat ttc cgc gtg gtg ctg 912
 Ala Cys Leu Val Ala Asn Glu Asn Tyr His His Phe Arg Val Val Leu
 290 295 300

gtg cgt acc gat ccg gca acc gag cgt ttg att tta acc gcc gca caa 960
 Val Arg Thr Asp Pro Ala Thr Glu Arg Leu Ile Leu Thr Ala Ala Gln
 305 310 315 320

ctg gat gcc ctc aaa tgc cac gcc ggg gat cgc gtt cgt ctg gtg cgc 1008
 Leu Asp Ala Leu Lys Cys His Ala Gly Asp Arg Val Arg Leu Val Arg
 325 330 335

ctg tgc gca gag gag aaa aca gca tga 1035
 Leu Cys Ala Glu Glu Lys Thr Ala
 340

<210> 4
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 4

Met Met Val Ile Arg Pro Val Glu Arg Ser Asp Val Ser Ala Leu Met
 1 5 10 15

Gln Leu Ala Ser Lys Thr Gly Gly Gly Leu Thr Ser Leu Pro Ala Asn
 20 25 30

Glu Ala Thr Leu Ser Ala Arg Ile Glu Arg Ala Ile Lys Thr Trp Gln
 35 40 45

Gly Glu Leu Pro Lys Ser Glu Gln Gly Tyr Val Phe Val Leu Glu Asp
 50 55 60

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

Gly Leu Asn Asp Pro Trp Tyr Asn Tyr Arg Val Gly Thr Leu Val His
 85 90 95

Ala Ser Lys Glu Leu Asn Val Tyr Asn Ala Leu Pro Thr Leu Phe Leu
 100 105 110

Ser Asn Asp His Thr Gly Ser Ser Glu Leu Cys Thr Leu Phe Leu Asp
 115 120 125

Pro Asp Trp Arg Lys Glu Gly Asn Gly Tyr Leu Leu Ser Lys Ser Arg
 130 135 140

Phe Met Phe Met Ala Ala Phe Arg Asp Lys Phe Asn Asp Lys Val Val

1	5	10	15	
cgt gtg aag cgt aat ccg gta tcg ggc gag gtg tta tgg caa ggc aat				96
Arg Val Lys Arg Asn Pro Val Ser Gly Glu Val Leu Trp Gln Gly Asn	20	25	30	
gat gcc gat gcc gct cag gtc gag cag gct tgt cgg gca gcc cgt gcg				144
Asp Ala Asp Ala Ala Gln Val Glu Gln Ala Cys Arg Ala Ala Arg Ala	35	40	45	
gcg ttt ccg cgc tgg gcg cgg ctt tca ttt gct gaa cgt cat gcc gtt				192
Ala Phe Pro Arg Trp Ala Arg Leu Ser Phe Ala Glu Arg His Ala Val	50	55	60	
gtc gaa cgc ttt gcc gca ctg ctg gaa agc aat aaa gcc gaa tta acc				240
Val Glu Arg Phe Ala Ala Leu Leu Glu Ser Asn Lys Ala Glu Leu Thr	65	70	75	80
gcg att att gcc aga gaa acg ggt aag ccg cgc tgg gaa gcg gca acc				288
Ala Ile Ile Ala Arg Glu Thr Gly Lys Pro Arg Trp Glu Ala Ala Thr	85	90	95	
gaa gtg acg gcg atg atc aat aaa atc gcg ata tca att aag gcg tat				336
Glu Val Thr Ala Met Ile Asn Lys Ile Ala Ile Ser Ile Lys Ala Tyr	100	105	110	
cac gtt cgt acc ggc gag cag cgt agt gaa atg ccg gac ggc gcg gcg				384
His Val Arg Thr Gly Glu Gln Arg Ser Glu Met Pro Asp Gly Ala Ala	115	120	125	
agc ctg cga cat cgc ccg cac ggc gtg ctg gcg gtg ttt ggg ccg tat				432
Ser Leu Arg His Arg Pro His Gly Val Leu Ala Val Phe Gly Pro Tyr	130	135	140	
aat ttc cct ggt cat ttg ccg aac gga cat atc gtt ccg gca ttg ctg				480
Asn Phe Pro Gly His Leu Pro Asn Gly His Ile Val Pro Ala Leu Leu	145	150	155	160
gca ggt aac acc att atc ttt aaa ccc agc gaa ctg aca ccg tgg agt				528
Ala Gly Asn Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Glu Leu Thr Pro Trp Ser	165	170	175	
ggc gaa gcg gta atg cgt tta tgg cag cag gct ggc ttg ccg cca ggc				576
Gly Glu Ala Val Met Arg Leu Trp Gln Gln Ala Gly Leu Pro Pro Gly	180	185	190	
gtg ctg aac ctg gtg cag ggc ggg cgt gaa acg ggt cag gcg ctg agt				624
Val Leu Asn Leu Val Gln Gly Gly Arg Glu Thr Gly Gln Ala Leu Ser	195	200	205	
gcg ctg gag gat ctc gac ggt ttg ctg ttt acc ggt agc gcc aat aca				672
Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly Leu Leu Phe Thr Gly Ser Ala Asn Thr	210	215	220	
ggc tac cag ttg cat cgc cag ctc tcc ggt cag ccg gag aaa att ctc				720
Gly Tyr Gln Leu His Arg Gln Leu Ser Gly Gln Pro Glu Lys Ile Leu	225	230	235	240
gcc ctt gag atg ggc ggt aat aat ccg cta att atc gat gag gtg gcg				768
Ala Leu Glu Met Gly Gly Asn Asn Pro Leu Ile Ile Asp Glu Val Ala	245	250	255	
gat atc gac gcg gct gtc cat ctg acc att cag tcg gcg ttt gtc aca				816
Asp Ile Asp Ala Ala Val His Leu Thr Ile Gln Ser Ala Phe Val Thr				

	260		265		270	
	gcc ggt caa cgc tgc acc tgc gcc cgc cgt tta ttg ctg aaa agc ggg		gcc cgc cgt tta ttg ctg aaa agc ggg			864
	Ala Gly Gln Arg Cys Thr Cys Ala Arg Arg Leu Leu Leu Lys Ser Gly		Ala Arg Arg Leu Leu Leu Lys Ser Gly			
	275		280		285	
	gcg cag ggc gat gcg ttt ctt gct cgt ctg gtt gcc gtc agc cag cga		gct cgt ctg gtt gcc gtc agc cag cga			912
	Ala Gln Gly Asp Ala Phe Leu Ala Arg Leu Val Ala Val Ser Gln Arg		Ala Arg Leu Val Ala Val Ser Gln Arg			
	290		295		300	
	tta acg ccg ggc aac tgg gat gac gaa ccg cag ccg ttt att ggc ggg		gac gaa ccg cag ccg ttt att ggc ggg			960
	Leu Thr Pro Gly Asn Trp Asp Asp Glu Pro Gln Pro Phe Ile Gly Gly		Asp Glu Pro Gln Pro Phe Ile Gly Gly			
	305		310		315	320
	ctg att tct gaa cag gcc gca cag cag gtg gtt act gca tgg cag caa		gca cag cag gtg gtt act gca tgg cag caa			1008
	Leu Ile Ser Glu Gln Ala Ala Gln Gln Val Val Thr Ala Trp Gln Gln		Gln Gln Val Val Thr Ala Trp Gln Gln			
			325		330	335
	ctg gaa gcg atg ggc gga cga ccc ctg ctt gcg ccg cgc tta tta caa		gga cga ccc ctg ctt gcg ccg cgc tta tta caa			1056
	Leu Glu Ala Met Gly Gly Arg Pro Leu Leu Ala Pro Arg Leu Leu Gln		Gly Gly Arg Pro Leu Leu Ala Pro Arg Leu Leu Gln			
			340		345	350
	gca ggg aca tcg ttg ctg acg ccg ggg atc att gaa atg aca ggc gtt		gca ggg aca tcg ttg ctg acg ccg ggg atc att gaa atg aca ggc gtt			1104
	Ala Gly Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Ile Ile Glu Met Thr Gly Val		Thr Pro Gly Ile Ile Glu Met Thr Gly Val			
			355		360	365
	gct ggc gta cca gat gaa gag gtg ttc gga ccg tta ttg cgc gtc tgg		gag gtg ttc gga ccg tta ttg cgc gtc tgg			1152
	Ala Gly Val Pro Asp Glu Glu Val Phe Gly Pro Leu Leu Arg Val Trp		Glu Glu Val Phe Gly Pro Leu Leu Arg Val Trp			
			370		375	380
	cgt tat gat act ttc gat gaa gcg att cga atg gcg aat aac act cgc		gat gaa gcg att cga atg gcg aat aac act cgc			1200
	Arg Tyr Asp Thr Phe Asp Glu Ala Ile Arg Met Ala Asn Asn Thr Arg		Glu Ala Ile Arg Met Ala Asn Asn Thr Arg			
			385		390	395
	ttc gga ctc tct tgc ggt ctg gtt tcc ccc gag cgg gaa aag ttc gat		ggt ctg gtt tcc ccc gag cgg gaa aag ttc gat			1248
	Phe Gly Leu Ser Cys Gly Leu Val Ser Pro Glu Arg Glu Lys Phe Asp		Gly Leu Val Ser Pro Glu Arg Glu Lys Phe Asp			
			405		410	415
	caa ctg ttg ctg gag gcg cgg gcg ggg att gtt aac tgg aac aaa ccg		gag gcg cgg gcg ggg att gtt aac tgg aac aaa ccg			1296
	Gln Leu Leu Leu Glu Ala Arg Ala Gly Ile Val Asn Trp Asn Lys Pro		Glu Ala Arg Ala Gly Ile Val Asn Trp Asn Lys Pro			
			420		425	430
	ctt acc ggt gct gcc agt acc gcg cca ttc ggc ggc att ggt gct tcc		gct gcc agt acc gcg cca ttc ggc ggc att ggt gct tcc			1344
	Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Ala Pro Phe Gly Gly Ile Gly Ala Ser		Gly Ala Pro Phe Gly Gly Ile Gly Ala Ser			
			435		440	445
	ggt aac cat cgc ccc agc gcc tgg tat gcc gca gat tac tgc gca tgg		gca gat tac tgc gca tgg			1392
	Gly Asn His Arg Pro Ser Ala Trp Tyr Ala Ala Asp Tyr Cys Ala Trp		Ala Ala Asp Tyr Cys Ala Trp			
			450		455	460
	ccg atg gcg agc ctg gag tcg gac tcg tta aca ttg ccc gcc acg ctt		gag tcg gac tcg tta aca ttg ccc gcc acg ctt			1440
	Pro Met Ala Ser Leu Glu Ser Asp Ser Leu Thr Leu Pro Ala Thr Leu		Glu Ser Asp Ser Leu Thr Leu Pro Ala Thr Leu			
			465		470	475
	aac ccc ggg ctg gat ttt tcc gat gag gtg gtg cga tga		gat gag gtg gtg cga tga			1479
	Asn Pro Gly Leu Asp Phe Ser Asp Glu Val Val Arg		Asp Glu Val Val Arg			
			485		490	

<210> 6
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 6

Met Thr Leu Trp Ile Asn Gly Asp Trp Ile Thr Gly Gln Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Arg Val Lys Arg Asn Pro Val Ser Gly Glu Val Leu Trp Gln Gly Asn
 20 25 30

Asp Ala Asp Ala Ala Gln Val Glu Gln Ala Cys Arg Ala Ala Arg Ala
 35 40 45

Ala Phe Pro Arg Trp Ala Arg Leu Ser Phe Ala Glu Arg His Ala Val
 50 55 60

Val Glu Arg Phe Ala Ala Leu Leu Glu Ser Asn Lys Ala Glu Leu Thr
 65 70 75 80

Ala Ile Ile Ala Arg Glu Thr Gly Lys Pro Arg Trp Glu Ala Ala Thr
 85 90 95

Glu Val Thr Ala Met Ile Asn Lys Ile Ala Ile Ser Ile Lys Ala Tyr
 100 105 110

His Val Arg Thr Gly Glu Gln Arg Ser Glu Met Pro Asp Gly Ala Ala
 115 120 125

Ser Leu Arg His Arg Pro His Gly Val Leu Ala Val Phe Gly Pro Tyr
 130 135 140

Asn Phe Pro Gly His Leu Pro Asn Gly His Ile Val Pro Ala Leu Leu
 145 150 155 160

Ala Gly Asn Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Glu Leu Thr Pro Trp Ser
 165 170 175

Gly Glu Ala Val Met Arg Leu Trp Gln Gln Ala Gly Leu Pro Pro Gly
 180 185 190

Val Leu Asn Leu Val Gln Gly Gly Arg Glu Thr Gly Gln Ala Leu Ser
 195 200 205

Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly Leu Leu Phe Thr Gly Ser Ala Asn Thr
 210 215 220

Gly Tyr Gln Leu His Arg Gln Leu Ser Gly Gln Pro Glu Lys Ile Leu
 225 230 235 240

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

Asp Ile Asp Ala Ala Val His Leu Thr Ile Gln Ser Ala Phe Val Thr
 260 265 270

Ala Gly Gln Arg Cys Thr Cys Ala Arg Arg Leu Leu Leu Lys Ser Gly
 275 280 285

Ala Gln Gly Asp Ala Phe Leu Ala Arg Leu Val Ala Val Ser Gln Arg
 290 295 300

Leu Thr Pro Gly Asn Trp Asp Asp Glu Pro Gln Pro Phe Ile Gly Gly
 305 310 315 320

Leu Ile Ser Glu Gln Ala Ala Gln Gln Val Val Thr Ala Trp Gln Gln
 325 330 335

Leu Glu Ala Met Gly Gly Arg Pro Leu Leu Ala Pro Arg Leu Leu Gln
 340 345 350

Ala Gly Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Ile Ile Glu Met Thr Gly Val
 355 360 365

Ala Gly Val Pro Asp Glu Glu Val Phe Gly Pro Leu Leu Arg Val Trp
 370 375 380

Arg Tyr Asp Thr Phe Asp Glu Ala Ile Arg Met Ala Asn Asn Thr Arg
 385 390 395 400

Phe Gly Leu Ser Cys Gly Leu Val Ser Pro Glu Arg Glu Lys Phe Asp
 405 410 415

Gln Leu Leu Leu Glu Ala Arg Ala Gly Ile Val Asn Trp Asn Lys Pro
 420 425 430

Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Ala Pro Phe Gly Gly Ile Gly Ala Ser
 435 440 445

Gly Asn His Arg Pro Ser Ala Trp Tyr Ala Ala Asp Tyr Cys Ala Trp
 450 455 460

Pro Met Ala Ser Leu Glu Ser Asp Ser Leu Thr Leu Pro Ala Thr Leu
 465 470 475 480

Asn Pro Gly Leu Asp Phe Ser Asp Glu Val Val Arg
 485 490

<210> 7
 <211> 1344

<212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1344)

<400> 7
 atg aac gcc tgg gaa gtc aat ttc gac ggg ctg gta ggg ctg acg cat 48
 Met Asn Ala Trp Glu Val Asn Phe Asp Gly Leu Val Gly Leu Thr His
 1 5 10 15

cat tac gcg ggc ctg tcg ttt ggt aat gaa gcc tct acc cgt cac cgt 96
 His Tyr Ala Gly Leu Ser Phe Gly Asn Glu Ala Ser Thr Arg His Arg
 20 25 30

ttt cag gtg tct aac ccg cga ctg gcg gcg aag cag ggc tta ctg aaa 144
 Phe Gln Val Ser Asn Pro Arg Leu Ala Ala Lys Gln Gly Leu Leu Lys
 35 40 45

atg aaa gcc ctt gcc gat gcg gga ttc ccc cag gcc gtg atc ccg ccg 192
 Met Lys Ala Leu Ala Asp Ala Gly Phe Pro Gln Ala Val Ile Pro Pro
 50 55 60

cac gag cgt ccg ttt att ccg gtg ctg cgt cag ttg gga ttc agt ggt 240
 His Glu Arg Pro Phe Ile Pro Val Leu Arg Gln Leu Gly Phe Ser Gly
 65 70 75 80

agc gat gag cag gta ctg gaa aaa gtt gca cgc cag gca ccg cac tgg 288
 Ser Asp Glu Gln Val Leu Glu Lys Val Ala Arg Gln Ala Pro His Trp
 85 90 95

ctt tcc agc gtc agt tcc gct tcg cca atg tgg gta gcc aat gcg gca 336
 Leu Ser Ser Val Ser Ser Ala Ser Pro Met Trp Val Ala Asn Ala Ala
 100 105 110

acg atc gcg cca tct gcc gat acg ctg gat ggc aaa gtg cat ctc acc 384
 Thr Ile Ala Pro Ser Ala Asp Thr Leu Asp Gly Lys Val His Leu Thr
 115 120 125

gtt gcc aac ctg aac aat aaa ttt cac cgt tcg ctg gaa gcg ccc gtc 432
 Val Ala Asn Leu Asn Asn Lys Phe His Arg Ser Leu Glu Ala Pro Val
 130 135 140

act gaa tcg ctg tta aaa gcg att ttt aac gac gaa gag aaa ttt agc 480
 Thr Glu Ser Leu Leu Lys Ala Ile Phe Asn Asp Glu Glu Lys Phe Ser
 145 150 155 160

gtc cat tcg gcg ttg cca cag gta gcg ttg ctc ggt gat gag ggg gcg 528
 Val His Ser Ala Leu Pro Gln Val Ala Leu Leu Gly Asp Glu Gly Ala
 165 170 175

gca aac cac aat cgt ctc ggc ggt cat tac ggt gaa ccg ggt atg caa 576
 Ala Asn His Asn Arg Leu Gly Gly His Tyr Gly Glu Pro Gly Met Gln
 180 185 190

ctt ttt gtc tac ggg cga gaa gaa ggc aat gat acc cgg cct tcc cgt 624
 Leu Phe Val Tyr Gly Arg Glu Glu Gly Asn Asp Thr Arg Pro Ser Arg
 195 200 205

tat ccg gcg cga cag act cgc gaa gcc agc gag gcg gtg gca agg ctg 672
 Tyr Pro Ala Arg Gln Thr Arg Glu Ala Ser Glu Ala Val Ala Arg Leu
 210 215 220

aat cag gtg aat ccc caa cag gtg att ttc gcc cag caa aac ccg gac 720
 Asn Gln Val Asn Pro Gln Gln Val Ile Phe Ala Gln Gln Asn Pro Asp
 225 230 235 240

 gtt atc gac cag ggc gtt ttt cat aat gac gtg att gcc gtg agt aac 768
 Val Ile Asp Gln Gly Val Phe His Asn Asp Val Ile Ala Val Ser Asn
 245 250 255

 cgc cag gtg ctg ttt tgc cac caa cag gcg ttc gct cgc cag tca cag 816
 Arg Gln Val Leu Phe Cys His Gln Gln Ala Phe Ala Arg Gln Ser Gln
 260 265 270

 tta ctg gca aac ctg cgt gcg cgg gtc aat ggt ttt atg gcg ata gaa 864
 Leu Leu Ala Asn Leu Arg Ala Arg Val Asn Gly Phe Met Ala Ile Glu
 275 280 285

 gtt ccg gca act cag gtt tcc gtg tct gat acg gtg tct acc tat ctg 912
 Val Pro Ala Thr Gln Val Ser Val Ser Asp Thr Val Ser Thr Tyr Leu
 290 295 300

 ttt aac agc caa ctg ctg agc cgc gat gat ggt tcc atg atg ttg gtg 960
 Phe Asn Ser Gln Leu Leu Ser Arg Asp Asp Gly Ser Met Met Leu Val
 305 310 315 320

 ctg cct cag gag tgt cgg gaa cac gcc gga gta tgg ggt tat ctc aat 1008
 Leu Pro Gln Glu Cys Arg Glu His Ala Gly Val Trp Gly Tyr Leu Asn
 325 330 335

 gaa ctc ctt gcc gct gac aac ccg att agc gaa cta aaa gtc ttt gat 1056
 Glu Leu Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Ser Glu Leu Lys Val Phe Asp
 340 345 350

 tta cgt gaa agc atg gcg aat ggc ggc ggc ccg gcg tgc ctg cgg ttg 1104
 Leu Arg Glu Ser Met Ala Asn Gly Gly Gly Pro Ala Cys Leu Arg Leu
 355 360 365

 cgg gtg gta ttg aca gaa gaa gaa cgc cgg gcg gtg aat ccg gcg gtg 1152
 Arg Val Val Leu Thr Glu Glu Glu Arg Arg Ala Val Asn Pro Ala Val
 370 375 380

 atg atg aac gat acg ctg ttt aat gcg ctc aat gac tgg gtg gat cgt 1200
 Met Met Asn Asp Thr Leu Phe Asn Ala Leu Asn Asp Trp Val Asp Arg
 385 390 395 400

 tac tac cgc gat cgc ctt act gct gcc gat ctg gcc gac ccg caa ttg 1248
 Tyr Tyr Arg Asp Arg Leu Thr Ala Ala Asp Leu Ala Asp Pro Gln Leu
 405 410 415

 ctg cgc gaa ggg cgg gaa gca ctg gat gta ttg agc caa tta ctg aat 1296
 Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ala Leu Asp Val Leu Ser Gln Leu Leu Asn
 420 425 430

 ctc ggt tcg gtt tat ccg ttc cag cgc gag gga ggg ggc aat gga taa 1344
 Leu Gly Ser Val Tyr Pro Phe Gln Arg Glu Gly Gly Gly Asn Gly
 435 440 445

<210> 8
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 8

Met Asn Ala Trp Glu Val Asn Phe Asp Gly Leu Val Gly Leu Thr His
 1 5 10 15

His Tyr Ala Gly Leu Ser Phe Gly Asn Glu Ala Ser Thr Arg His Arg
 20 25 30

Phe Gln Val Ser Asn Pro Arg Leu Ala Ala Lys Gln Gly Leu Leu Lys
 35 40 45

Met Lys Ala Leu Ala Asp Ala Gly Phe Pro Gln Ala Val Ile Pro Pro
 50 55 60

His Glu Arg Pro Phe Ile Pro Val Leu Arg Gln Leu Gly Phe Ser Gly
 65 70 75 80

Ser Asp Glu Gln Val Leu Glu Lys Val Ala Arg Gln Ala Pro His Trp
 85 90 95

Leu Ser Ser Val Ser Ser Ala Ser Pro Met Trp Val Ala Asn Ala Ala
 100 105 110

Thr Ile Ala Pro Ser Ala Asp Thr Leu Asp Gly Lys Val His Leu Thr
 115 120 125

Val Ala Asn Leu Asn Asn Lys Phe His Arg Ser Leu Glu Ala Pro Val
 130 135 140

Thr Glu Ser Leu Leu Lys Ala Ile Phe Asn Asp Glu Glu Lys Phe Ser
 145 150 155 160

Val His Ser Ala Leu Pro Gln Val Ala Leu Leu Gly Asp Glu Gly Ala
 165 170 175

Ala Asn His Asn Arg Leu Gly Gly His Tyr Gly Glu Pro Gly Met Gln
 180 185 190

Leu Phe Val Tyr Gly Arg Glu Glu Gly Asn Asp Thr Arg Pro Ser Arg
 195 200 205

Tyr Pro Ala Arg Gln Thr Arg Glu Ala Ser Glu Ala Val Ala Arg Leu
 210 215 220

Asn Gln Val Asn Pro Gln Gln Val Ile Phe Ala Gln Gln Asn Pro Asp
 225 230 235 240

Val Ile Asp Gln Gly Val Phe His Asn Asp Val Ile Ala Val Ser Asn
 245 250 255

Arg Gln Val Leu Phe Cys His Gln Gln Ala Phe Ala Arg Gln Ser Gln
 260 265 270

Leu Leu Ala Asn Leu Arg Ala Arg Val Asn Gly Phe Met Ala Ile Glu
 275 280 285

Val Pro Ala Thr Gln Val Ser Val Ser Asp Thr Val Ser Thr Tyr Leu
 290 295 300

Phe Asn Ser Gln Leu Leu Ser Arg Asp Asp Gly Ser Met Met Leu Val
 305 310 315 320

Leu Pro Gln Glu Cys Arg Glu His Ala Gly Val Trp Gly Tyr Leu Asn
 325 330 335

Glu Leu Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Ser Glu Leu Lys Val Phe Asp
 340 345 350

Leu Arg Glu Ser Met Ala Asn Gly Gly Gly Pro Ala Cys Leu Arg Leu
 355 360 365

Arg Val Val Leu Thr Glu Glu Glu Arg Arg Ala Val Asn Pro Ala Val
 370 375 380

Met Met Asn Asp Thr Leu Phe Asn Ala Leu Asn Asp Trp Val Asp Arg
 385 390 395 400

Tyr Tyr Arg Asp Arg Leu Thr Ala Ala Asp Leu Ala Asp Pro Gln Leu
 405 410 415

Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ala Leu Asp Val Leu Ser Gln Leu Leu Asn
 420 425 430

Leu Gly Ser Val Tyr Pro Phe Gln Arg Glu Gly Gly Gly Asn Gly
 435 440 445

<210> 9
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(969)

<400> 9

atg gat aat ttt ctt gct ctg acc tta acg ggt aaa aaa ccg gtt atc
 Met Asp Asn Phe Leu Ala Leu Thr Leu Thr Gly Lys Lys Pro Val Ile
 1 5 10 15

acc gag cga gaa atc aac ggc gtt cgc tgg cgc tgg ctg ggc gat ggt	96
Thr Glu Arg Glu Ile Asn Gly Val Arg Trp Arg Trp Leu Gly Asp Gly	
20 25 30	
gtg ctg gaa ctg acg cca tta acg cca ccg caa ggc gca ctg gtg att	144
Val Leu Glu Leu Thr Pro Leu Thr Pro Pro Gln Gly Ala Leu Val Ile	
35 40 45	
tca gcg gga ata cac ggt aat gag acg gca cct gtg gag atg ctg gac	192
Ser Ala Gly Ile His Gly Asn Glu Thr Ala Pro Val Glu Met Leu Asp	
50 55 60	
gcg ttg ctt ggc gcg ata tct cac ggc gag atc ccg tta cgt tgg cgg	240
Ala Leu Leu Gly Ala Ile Ser His Gly Glu Ile Pro Leu Arg Trp Arg	
65 70 75 80	
ttg ctg gtg atc ctc ggg aat cct cct gcg ctg aag caa ggg aaa cgt	288
Leu Leu Val Ile Leu Gly Asn Pro Pro Ala Leu Lys Gln Gly Lys Arg	
85 90 95	
tat tgc cat agc gat atg aat cga atg ttt ggc ggt cgt tgg cag cta	336
Tyr Cys His Ser Asp Met Asn Arg Met Phe Gly Gly Arg Trp Gln Leu	
100 105 110	
ttt gct gaa agc gga gaa acc tgt cgg gcg cgc gaa ctg gaa cag tgc	384
Phe Ala Glu Ser Gly Glu Thr Cys Arg Ala Arg Glu Leu Glu Gln Cys	
115 120 125	
ctg gaa gat ttt tat gac cag ggc aaa gaa tct gtg cgc tgg cac ctt	432
Leu Glu Asp Phe Tyr Asp Gln Gly Lys Glu Ser Val Arg Trp His Leu	
130 135 140	
gat cta cat acc gca att cgt ggc tcc ttg cat ccg cag ttc ggt gta	480
Asp Leu His Thr Ala Ile Arg Gly Ser Leu His Pro Gln Phe Gly Val	
145 150 155 160	
tta ccg caa cgc gac att ccc tgg gac gag aaa ttt ctg acg tgg ctg	528
Leu Pro Gln Arg Asp Ile Pro Trp Asp Glu Lys Phe Leu Thr Trp Leu	
165 170 175	
ggt gcg gcg ggg ctg gag gcg ctg gtg ttc cat cag gaa cct ggt ggt	576
Gly Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu Val Phe His Gln Glu Pro Gly Gly	
180 185 190	
acg ttt acc cat ttc agc gcc aga cat ttt ggc gcg ctg gcc tgt acg	624
Thr Phe Thr His Phe Ser Ala Arg His Phe Gly Ala Leu Ala Cys Thr	
195 200 205	
ctg gaa ctt ggc aaa gcg ttg ccc ttt ggg caa aac gat ctt cgc cag	672
Leu Glu Leu Gly Lys Ala Leu Pro Phe Gly Gln Asn Asp Leu Arg Gln	
210 215 220	
ttt gca gta act gcc agc gca att gct gcg ctg cta tct ggt gag agt	720
Phe Ala Val Thr Ala Ser Ala Ile Ala Ala Leu Leu Ser Gly Glu Ser	
225 230 235 240	
gtc ggt atc gtg aga aca ccg ccg ctc cgt tat cgg gtg gtt tcg caa	768
Val Gly Ile Val Arg Thr Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Val Val Ser Gln	
245 250 255	
att act cgc cac tcg ccg tcc ttc gaa atg cat atg gca agt gac acg	816
Ile Thr Arg His Ser Pro Ser Phe Glu Met His Met Ala Ser Asp Thr	
260 265 270	

ctg aat ttt atg ccg ttt gag aaa gga aca ttg ctg gcg cag gac gga 864
 Leu Asn Phe Met Pro Phe Glu Lys Gly Thr Leu Leu Ala Gln Asp Gly
 275 280 285

gag gaa cgt ttt acc gta acc cat gat gta gag tat gtg tta ttc cct 912
 Glu Glu Arg Phe Thr Val Thr His Asp Val Glu Tyr Val Leu Phe Pro
 290 295 300

aat ccg ttg gta gcg ttg gga tta cgc gcg gga tta atg ctc gaa aaa 960
 Asn Pro Leu Val Ala Leu Gly Leu Arg Ala Gly Leu Met Leu Glu Lys
 305 310 315 320

ata agc taa 969
 Ile Ser

<210> 10
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 10

Met Asp Asn Phe Leu Ala Leu Thr Leu Thr Gly Lys Lys Pro Val Ile
 1 5 10 15

Thr Glu Arg Glu Ile Asn Gly Val Arg Trp Arg Trp Leu Gly Asp Gly
 20 25 30

Val Leu Glu Leu Thr Pro Leu Thr Pro Pro Gln Gly Ala Leu Val Ile
 35 40 45

Ser Ala Gly Ile His Gly Asn Glu Thr Ala Pro Val Glu Met Leu Asp
 50 55 60

Ala Leu Leu Gly Ala Ile Ser His Gly Glu Ile Pro Leu Arg Trp Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Val Ile Leu Gly Asn Pro Pro Ala Leu Lys Gln Gly Lys Arg
 85 90 95

Tyr Cys His Ser Asp Met Asn Arg Met Phe Gly Gly Arg Trp Gln Leu
 100 105 110

Phe Ala Glu Ser Gly Glu Thr Cys Arg Ala Arg Glu Leu Glu Gln Cys
 115 120 125

Leu Glu Asp Phe Tyr Asp Gln Gly Lys Glu Ser Val Arg Trp His Leu
 130 135 140

Asp Leu His Thr Ala Ile Arg Gly Ser Leu His Pro Gln Phe Gly Val
 145 150 155 160

Leu Pro Gln Arg Asp Ile Pro Trp Asp Glu Lys Phe Leu Thr Trp Leu
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu Val Phe His Gln Glu Pro Gly Gly
 180 185 190

Thr Phe Thr His Phe Ser Ala Arg His Phe Gly Ala Leu Ala Cys Thr
 195 200 205

Leu Glu Leu Gly Lys Ala Leu Pro Phe Gly Gln Asn Asp Leu Arg Gln
 210 215 220

Phe Ala Val Thr Ala Ser Ala Ile Ala Ala Leu Leu Ser Gly Glu Ser
 225 230 235 240

Val Gly Ile Val Arg Thr Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Val Val Ser Gln
 245 250 255

Ile Thr Arg His Ser Pro Ser Phe Glu Met His Met Ala Ser Asp Thr
 260 265 270

Leu Asn Phe Met Pro Phe Glu Lys Gly Thr Leu Leu Ala Gln Asp Gly
 275 280 285

Glu Glu Arg Phe Thr Val Thr His Asp Val Glu Tyr Val Leu Phe Pro
 290 295 300

Asn Pro Leu Val Ala Leu Gly Leu Arg Ala Gly Leu Met Leu Glu Lys
 305 310 315 320

Ile Ser

<210> 11
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer P1

<400> 11
 atgtctcagc caattacgcg tgaaaacttt gatgaatgaa gcttgctttt ttatactaag 60

<210> 12
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer P2

<400> 12
 ttagcttatt ttttcgagca ttaatccgc gcgtaacgct caagttagta taaaaaagct 60

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer P3

<400> 13
 ctgcaatcta catttacag 19

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer P4

<400> 14
 taccgcaga atgatttctg c 21