



(51) МПК

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

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006123752/13, 04.07.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.07.2006

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2008

(45) Опубликовано: 10.11.2008 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: HUISMAN GW et. al. Sensing starvation:
a homoserine lactone-dependent signaling
pathway in Escherichia coli. Science. 1994,
Jul. 22; 265(5171):537-9. US 5661012,
26.08.1997. SU 1694643 A1, 30.11.1987.

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1, ЗАО
"НИИ Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ),
пат.пов. В.М. Белкову

(72) Автор(ы):

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

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество "Научно-
исследовательский институт Аджиномото-
Генетика" (ЗАО АГРИ) (RU)(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-ТРЕОНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИИ, ПРИНАДЛЕЖАЩЕЙ
К РОДУ *Escherichia*, В КОТОРОЙ ИНАКТИВИРОВАН ОПЕРОН *rspAB*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и
предоставляет собой способ получения L-треонина
с использованием бактерии, принадлежащей к роду
Escherichia, которая модифицирована такимобразом, что в указанной бактерии инактивирован
оперон *rspAB*. Изобретение позволяет получать L-
треонин с высокой степенью эффективности. 2 н. и
1 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)*C12P 13/04* (2006.01)*C12R 1/185* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006123752/13, 04.07.2006**(24) Effective date for property rights: **04.07.2006**(43) Application published: **10.01.2008**(45) Date of publication: **10.11.2008 Bull. 31**

Mail address:

117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, ZAO
"NII Adzhinomoto-Genetika" (ZAO AGRI),
pat.pov. V.M. Belkovu

(72) Inventor(s):

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

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD OF OBTAINING L-THREONINE USING BACTERIUM, BELONGING TO GENUS Escherichia, IN WHICH OPERON *rspAB* IS INACTIVATED**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry, biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and represents method of obtaining L-threonine using bacterium belonging to genus Escherichia,

modified in such way that in said bacterium operon *rspAB* is inactivated.

EFFECT: obtaining L-threonine with high degree of efficiency.

3 cl, 2 dwg, 2 tbl, 11 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

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 *rspAB* в указанной бактерии ослаблена.

Описание предшествующего уровня техники

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

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

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

Когда питательных веществ становится недостаточно, многие бактерии видоизменяются и становятся устойчивыми к внешним стрессам. В клетках *Escherichia coli* в этом процессе участвует σ S-субъединица РНК_полимеразы. Экспрессия σ S-субъединицы индуцировалась гомосеринлактоном, метаболитом, синтезируемым из промежуточных продуктов биосинтеза треонина. Зависимый от гомосеринлактона синтез σ S-субъединицы предотвращался сверхпродукцией белка RspA. Функции производных гомосеринлактона во многих зависящих от плотности клеток процессах и сходство RspA с белком *Streptomyces ambofaciens* позволяют предположить, что синтез гомосеринлактона, возможно, основной сигнал голодания (G.W.Huisman and R.Kolter, Science, 265:537-539

(1994)). *RspB*, вероятно, кодирует катаболический фермент, т.к. продукт гена на 38% идентичен треониндегидрогеназе *E.coli* (G.W.Huisman and R.Kolter, Science, 265:537-539 (1994), B.D.Aronson et.al., J.Biol.Chem., 264:5226-32 (1989)).

5 Гены *rspA* и *rspB* образуют оперон, т.к. при вставке транспозона в *rspA* прекращается экспрессия *rspB* (G.W.Huisman and R.Kolter, Science, 265:537-539 (1994)).

10 Но в настоящее время нет сообщений, описывающих использование инактивации оперона *rspAB* для получения L-аминокислот.

Описание изобретения

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

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

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

35 Целью настоящего изобретения является предоставление бактерии-продуцента L-аминокислоты семейства *Enterobacteriaceae*, модифицированной таким образом, что экспрессия оперона *rspAB* в указанной бактерии ослаблена.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Более детально настоящее изобретение описано ниже.

Подробное описание наилучшего способа осуществления изобретения

1. Бактерия согласно настоящему изобретению

Бактерия согласно настоящему изобретению – это бактерия-продуцент L-аминокислоты семейства *Enterobacteriaceae*, модифицированная таким образом, что экспрессия оперона *rspAB* в указанной бактерии ослаблена.

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

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

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

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

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

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

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

Термин «бактерия модифицирована таким образом, что экспрессия оперона *rspAB* ослаблена» означает, что указанная бактерия была модифицирована таким образом, что в результате модификации такая бактерия содержит пониженное количество белков RspA и RspB по сравнению с немодифицированной бактерией, или указанная бактерия не способна синтезировать белки RspA и RspB.

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

Наличие или отсутствие оперона *rspAB* в хромосоме может быть определено хорошо известными методами, включая ПЦР, блоттинг по Саузерну и т.п.. Кроме того, уровень экспрессии генов можно оценить определением количества транскрибируемой с гена РНК с использованием различных известных методов, включая блоттинг по Нозерну, количественную ОТ-ПЦР, и подобные им. Количество белка, кодируемого данными генами, может быть измерено с помощью известных методов, включающих метод SDS-PAGE с последующим иммуоблоттингом (Western blotting) и подобные им.

Ген *rspA* кодирует белок RspA (синоним – B1581). Ген *rspB* кодирует белок RspB (синоним – B1580). Оба гена *rspA* и *rspB* локализованы в опероне *rspAB*. Оперон *rspAB* из *E. coli* (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,651,951 по 1,653,165 и с 1,650,920 по 1,651,939 для *rspA* и *rspB*, соответственно, в нуклеотидной последовательности с

инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 16129539 и gi:16129538 для *rspA* и *rspB*, соответственно) расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между геном *intQ* и открытой рамкой считывания *ynfA*. Нуклеотидная последовательность гена *rspA* и аминокислотная последовательность RspA, кодируемого геном *rspA*, приведены в Перечне последовательностей под номерами 1 (SEQ ID NO: 1) и 2 (SEQ ID NO: 2), соответственно. Нуклеотидная последовательность гена *rspB* и аминокислотная последовательность RspB, кодируемого геном *rspB*, приведены в Перечне последовательностей под номерами 3 (SEQ ID NO: 3) и 4 (SEQ ID NO: 4), соответственно.

Поскольку у представителей различных родов и штаммов семейства *Enterobacteriaceae* возможны некоторые вариации в нуклеотидных последовательностях, понятие инактивируемого оперона *rspAB* не ограничивается генами, последовательности которых приведены в Перечне последовательностей под номерами 1 (SEQ ID NO: 1) и 3 (SEQ ID No: 3), но также может включать и гомологичные им гены, кодирующие варианты белков RspA и RspB. Термин «вариант белка», как он используется в настоящем изобретении, означает белок с изменениями в последовательности, будь то делеции, вставки, добавления или замены аминокислот. Количество изменений в варианте белка зависит от положения или типа аминокислотного остатка в третичной структуре белка. Возможно от 1 до 30, предпочтительно от 1 до 15, более предпочтительно от 1 до 5 изменений в последовательности, приведенной в Перечне последовательностей под номерами 2 (SEQ ID NO: 2) и 4 (SEQ ID NO: 4). Эти изменения в вариантах белка могут иметь место в областях белка, которые не критичны для функционирования белка. Такие изменения допускаются благодаря тому, что некоторые аминокислоты имеют высокую гомологию друг к другу, поэтому такие изменения не влияют на третичную структуру или активность. Таким образом, варианты белков, кодируемых генами *rspA* и *rspB*, могут быть представлены белками с гомологией не менее 80%, предпочтительно, не менее 90%, и, наиболее предпочтительно, не менее 95%, по отношению к полным аминокислотным последовательностям, приведенным в Перечне последовательностей под номерами 2 (SEQ ID NO. 2) и 4 (SEQ ID NO: 4).

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.

Кроме того, гены *rspA* и *rspB* могут быть представлены вариантами, которые гибридизуются в жестких условиях с нуклеотидными последовательностями, приведенными в Перечне последовательностей под номерами 1 (SEQ ID NO: 1) и 3 (SEQ ID NO: 3), или с зондами, которые могут быть синтезированы на основе указанных

нуклеотидных последовательностей. «Жесткие условия» включают такие условия, при которых специфические гибриды например, гибриды со степенью гомологии не менее 60%, предпочтительно, не менее 70%, более предпочтительно, не менее 80%, еще более предпочтительно, не менее 90%, наиболее предпочтительно, не менее 95%, образуются, а неспецифические гибриды, например, гибриды со степенью гомологии ниже вышеуказанной, – не образуются. Практическим примером жестких условий является однократная отмывка, предпочтительно двух- или трехкратная, при концентрации солей, соответствующей стандартным условиям отмывки при гибридизации по Саузерну, например, $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, предпочтительно $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, при 60°C.

Продолжительность отмывки зависит от типа используемой для блоттинга мембраны и, как правило, такова, как рекомендовано производителем. Например, рекомендуемая продолжительность отмывки для нейлоновой мембраны HybondTM N+ (Amersham) при строгих условиях-15 минут. Предпочтительна двух- трехкратная отмывка. Длина зонда может быть выбрана в зависимости от условий гибридизации, обычно она составляет от 100 п.н. до 1 т.п.н.

Экспрессия оперона *rspAB* может быть ослаблена введением такой мутации в ген на хромосоме, что активность кодируемого геном белка снижена по сравнению с немодифицированным штаммом. Такой мутацией может быть перестановка одного или более оснований с целью получения аминокислотной замены в кодируемом геном белке («миссенс»-мутация), введение стоп-кодона («нонсенс»-мутация), делеция одного или нескольких оснований для сдвига рамки считывания, вставка гена устойчивости к антибиотику или делеция части гена или делеция гена полностью (Qiu, Z. and Goodman, M.F., J. Biol. Chem., 272, 8611-8617 (1997); Kwon, D. H. et al, J. Antimicrob. Chemother., 46, 793-796 (2000)). Экспрессия оперона *gspAB* также может быть ослаблена модификацией регулирующей экспрессию последовательности, такой как промотор, последовательность Шайн-Дальгарно (SD) и т.д. (заявка РСТ WO95/34672, Carrier, T.A. and Keasling, J.D., Biotechnol Prog 15, 58-64 (1999)).

Например, для введения мутации генной рекомбинацией, могут применяться следующие методы. Конструируется мутантный ген, кодирующий мутантный белок со сниженной активностью, бактерия для модификации трансформируется фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме заменяется с использованием гомологичной рекомбинации мутантным геном, отбирается полученный штамм. Такое замещение гена с использованием гомологичной рекомбинации может быть проведено методом с использованием линейной ДНК, известным как “Red-зависимая интеграция” (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12, p 6640-

6645 (2000)), или методами с использованием плазмиды, репликация которой чувствительна к температуре (патент США 6,303,383 или патентная заявка Японии JP 05-007491A). Далее, введение сайт-специфической мутации генной заменой с использованием гомологичной рекомбинации, такой, как описано выше, также может быть проведено с использованием плазмиды, неспособной реплицироваться в клетке хозяина.

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

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

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

Бактерия-продуцент L-аминокислоты

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

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

Бактерия-продуцент L-треонина

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

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

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 0593792В). Штамм В-5318 является прототрофным относительно изолейцина, и чувствительный к температуре С1 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 нескольких следующих генов:

- мутантного гена *thrA*, кодирующего аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I, устойчивую к ингибированию треонином по типу обратной связи;
- гена *thrB*, кодирующего гомосеринкиназу;
- гена *thrC*, кодирующего треонинсинтазу;

- гена *rhtA*, предположительно кодирующего трансмембранный белок;
- гена *asd*, кодирующего аспарат-β-семиальдегиддегидрогеназу, и
- гена *aspC*, кодирующего аспаратаминотрансферазу (аспарататрансаминазу).

5

Нуклеотидная последовательность гена *thrA*, кодирующего аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 337 по 2799 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrA* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между генами *thrL* и *thrB*. Нуклеотидная последовательность гена *thrB*, кодирующего гомосеринкиназу из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 2801 по 3733 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrB* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между генами *thrA* и *thrC*. Нуклеотидная последовательность гена *thrC*, кодирующего треонинсинтазу из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 3734 по 5020 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrC* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между геном *thrB* и открытой рамкой считывания *yaaX*. Все три указанных гена функционируют как один треониновый оперон. Для усиления экспрессии треонинового оперона из оперона удаляется область аттенуатора, влияющего на транскрипцию (WO2005/049808, WO2003/097839).

10

15

20

25

30

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

35

40

45

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

50

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

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

Бактерия-продуцент L-лизина

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

Штамм WC196 может быть использован в качестве бактерии-продуцента L-лизина *Escherichia coli*. Данный бактериальный штамм был получен путем селекции фенотипа устойчивости к АЕС у штамма W3110, производного от штамма *Escherichia coli* K-12. Полученный штамм был назван *Escherichia coli* AJ13069 и был депонирован в Национальном Институте Биологических Наук и Человеческих Технологий, Агентство Промышленной Науки и Технологии (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology), в настоящее время называющийся Национальный Институт Прогрессивной Промышленной Науки и Технологии, Международный Депозитарий Организмов для Целей Патентования, Централ 6, 1-1, Хигаши 1-Чоми, Тсукуба-ши, Ибараки-кен, 305-8566, Япония (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository, Central

6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan), 6 декабря 1994 года и получил инвентарный номер FERM P-14690. Затем было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора 29 сентября 1995 года, и штамм получил инвентарный номер FERM BP-5252 (смотри патент США 5827698).

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин, согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-лизина. Примеры ферментов, вовлеченных в биосинтез L-лизина, включают, но не ограничиваются ими, дигидродипиколинатсинтазу (*dapA*), аспартокиназу (*lysC*), дигидродипиколинатредуктазу (*dapB*), диаминопимелатдекарбоксилазу (*lysA*), диаминопимелатдегидрогеназу (*ddh*) (патент США. 6,040,160), фосфоенолпируваткарбоксилазу (*ppc*), аспартатсемиальдегиддегидрогеназу (*asd*), никотинамидадениндинуклеотидтрансгидрогеназу (*pntAB*) и аспартазу (*aspA*) (европейская заявка EP 1253195 A). Кроме того, родительские штаммы могут иметь повышенный уровень экспрессии гена, вовлеченного в процесс дыхания (*cyo*) (европейская заявка EP 1170376 A), гена, кодирующего никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназу (*pntAB*) (патент США 5,830,716), гена *ubjE* (заявка PCT WO2005/073390), или комбинации этих генов.

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин, согласно настоящему изобретению, также включают штаммы, в которых снижена или отсутствует активность ферментов, которые катализируют реакции образования отличных от L-лизина соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-лизина. Примеры ферментов, которые катализируют реакции образования отличных от L-лизина соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-лизина, включают гомосериндегидрогеназу, лизиндекарбоксилазу (патент США 5,827,698) и малатдегидрогеназу (заявка PCT WO2005/010175).

Бактерия-продуцент L-цистеина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-цистеина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* JM15, трансформированный различными аллелями гена *cysE*, кодирующими устойчивые к ингибированию по типу обратной связи серинацетилтрансферазы (патент США 6218168, патентная заявка РФ 2003121601); штамм *E. coli* W3110, содержащий гены

с повышенной экспрессией, кодирующие белок, способный к секреции соединений, токсичных для клетки (патент США 5972663); штаммы *E. coli*, содержащие цистеиндесульфогидразу со сниженной активностью (патент Японии JP11155571A2);
5 штамм *E. coli* W3110 с повышенной активностью позитивного транскрипционного регулятора цистеинового регулона, кодируемого геном *cysB* (международная заявка РСТ WO0127307A1) и подобные им.

Бактерия-продуцент L-лейцина

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

Бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления
25 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
30 L-лейцином по типу обратной связи (патент США 6403342). Кроме того, бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, кодирующих белки, которые экспортируют L-аминокислоту
35 из бактериальной клетки. Примеры таких генов включают в себя гены b2682 и b2683 (гены *ugaZH*) (Европейская патентная заявка EP 1239041 A2).

Бактерия-продуцент L-гистидина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-гистидина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не
40 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* H-9342 (FERM ВР-6675) и H-9343 (FERM ВР-6676) (патент США 6344347); штамм *E. coli* H-9341 (FERM ВР-6674) (Европейский патент
45 1085087); штамм *E. coli* AI80/pFM201 (патент США 6258554) и подобные им.

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-гистидин, согласно настоящему изобретению, также 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.

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

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

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

себя, но не ограничиваются ими, штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-глутаминовой кислоты. Примеры таких ферментов включают глутаматдегидрогеназу (*gdh*), глутаминсинтетазу (*glnA*), глутаматсинтетазу (*gltAB*), изоцитратдегидрогеназу (*icdA*), аконитатгидратазу (*acnA*, *acnB*), цитратсинтазу (*glcA*), фосфоенолпируваткарбоксилазу (*ppc*), пируватдегидрогеназу (*aceEF*, *lpdA*), пируваткиназу (*pykA*, *pykF*), фосфоенолпируватсинтазу (*ppsA*), енолазу (*eno*), фосфоглицеромутазу (*pgmA*, *pgmI*), фосфоглицераткиназу (*pgk*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*gapA*), триозофосфатизомеразу (*tpiA*), фруктозобифосфатальдозу (*fbp*), фосфофруктокиназу (*pfkA*, *pfkB*) и глюкозофосфатизомеразу (*pgi*).

Примеры штаммов, модифицированных таким образом, что усилена экспрессия гена цитратсинтетазы, гена фосфоенолпируваткарбоксилазы и/или гена глутаматдегидрогеназы, включают описанные в европейских заявках EP1078989A, EP955368A и EP952221A.

Примеры родительских штаммов для получения продуцирующих L-глутаминовую кислоту бактерий, согласно настоящему исследованию, также включают штаммы, в которых снижена или отсутствует активность ферментов, которые катализируют синтез отличных от L-глутаминовой кислоты соединений, ответвляющихся от основного пути биосинтеза L-глутаминовой кислоты. Примеры таких ферментов включают изоцитратлиазу, 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:

E. coli W3110sucA::Km^R

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

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 AJ13199 (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* AJ13138 (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* AJ13356 (патент США 6,331,419), штамм *Pantoea ananatis* AJ13356, депонированный в Национальном Институте Биологических Наук и Человеческих Технологий, Агенство Промышленной Науки и Технологии, Министерство Международной Торговли и Промышленности (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry) (в настоящее время называющийся Национальный Институт Прогрессивной Промышленной Науки и Технологии, Международный Депозитарий Организмов для Целей Патентования, Централ 6, 1-1, Хигаши 1-Чоме, Тсукуба-ши, Ибараки-кен, 305-8566, Япония - National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism 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* AJ13356 не имеет α -KGDH активности в результате разрушения гена α KGDH-E1 субъединицы (*sucA*). Вышеупомянутый штамм при выделении был идентифицирован как *Enterobacter agglomerans* и депонирован как штамм *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Тем не менее, позднее он был классифицирован как *Pantoea ananatis* на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК и других доказательств. Несмотря на то, что штамм AJ13356, был депонирован в указанный выше депозитарий как *Enterobacter agglomerans*, для целей данного описания он будет упоминаться как *Pantoea ananatis*.

Бактерия-продуцент L-фенилаланина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-фенилаланина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* AJ12739 (*tyrA::Tn10, tyrR*) (ВКМП В-8197); штамм *E. coli* HW1089 (ATCC-55371),

содержащий ген *pheA34* (патент США 5354672); мутантный штамм *E. coli* MWEC101-b (KR8903681); штаммы *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 и NRRL B-12147 (патент США 4407952) и подобные им. Также в качестве родительских штаммов могут быть использованы бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, – продуценты L-фенилаланина, такие как штамм *E. coli* K-12[W3110(*tyrA*)/pPHAB] (FERM BP-3566), штамм *E. coli* K-12[W3110(*tyrA*)/pPHAD] (FERM BP-12659), штамм *E. coli* K-12[W3110(*tyrA*)/pPHATerm] (FERM BP-12662) и штамм *E. coli* K-12[W3110(*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAV], названный как AJ12604 (FERM BP-3579) (Европейский патент EP 488424 B1). Кроме того, также могут быть использованы бактерии-продуценты L-фенилаланина, принадлежащие к роду *Escherichia* с повышенной активностью белков, кодируемых геном *yedA* или геном *yddG* (патентные заявки США 2003/0148473 A1 и 2003/0157667 A1).

Бактерия-продуцент L-триптофана

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-триптофана согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются бактериями-продуцентами L-триптофана, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штаммы *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) и JP6015/pMU91 (DSM10123), лишённые активности триптофанил-тРНК синтетазы, кодируемой мутантным геном *trpS* (патент США 5756345); штамм *E. coli* SV164 (pGH5), содержащий аллель гена *serA*, кодирующего фермент, не ингибируемый серином по типу обратной связи (патент США 6180373); штаммы *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) и AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), лишённые активности триптофаназы (патент США 4371614); штамм *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps, в котором усилена способность к синтезу фосфоенолпирувата (международная заявка 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 рGH5 (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 WO2005/103275).

Бактерия-продуцент L-пролина

Примеры бактерий-продуцентов L-пролина, используемых в качестве родительского штамма согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* 702ilvA (ВКПМ В-8012), дефицитного по гену *ilvA* и способного к продукции L-пролина (Европейский патент EP 1172433). Бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, вовлеченных в биосинтез L-пролина. Предпочтительно, примеры таких генов для бактерий-продуцентов L-пролина, включают ген *proB*, кодирующий глутаматкиназу с десенсибилизированной 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.

5

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 А1) и его производные, содержащие мутантную N-ацетилглутаматсинтазу (патентная заявка РФ 2001112869), штамм *E. coli* 382 (ВКПМ В-7926) (Европейская патентная заявка EP1170358A1), штамм-продуцент аргинина, в который введен ген *argA*, кодирующий N-ацетилглутаматсинтазу (Европейская патентная заявка EP1170361A1), и подобные им.

10

15

20

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*).

25

30

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.

35

40

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-валина, согласно настоящему изобретению, также включают в себя мутантные штаммы, имеющие мутацию аминоксил-тРНК-синтазы (патент США 5658766). Например, может использоваться штамм *E. coli* VL1970, который имеет мутацию в гене *ileS*, кодирующем изолейцин-тРНК-синтазу. Штамм *E. coli* VL1970

45

50

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.

5 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 WO96/06926).

Бактерия-продуцент L-изолейцина

10 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 ,
20 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
25 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.

30 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
35 питательной среде, и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости.

40 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.

45 Питательная среда, используемая для выращивания, может быть как синтетической, так и натуральной, при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, минеральные добавки и, если необходимо, соответствующее количество питательных добавок, необходимых для роста микроорганизмов. К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, а также различные
50 органические кислоты. В зависимости от характера ассимиляции используемого

5 микроорганизма, могут использоваться спирты, такие как этанол и глицерин. В качестве источника азота могут использоваться различные неорганические соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, другие соединения азота, такие как амины, природные
10 источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, ферментоллизат микроорганизмов. В качестве минеральных добавок могут использоваться фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные им соединения. В качестве витаминов могут использоваться тиамин и дрожжевой экстракт.

15 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
20 буферными растворами. Обычно, выращивание в течение от 1 до 5 дней приводит к накоплению целевой L-аминокислоты в культуральной жидкости.

25 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.

30 Краткое описание рисунков

На Фиг. 1 изображены относительные положения праймеров P1 и P2 на плазмиде pACYC184, используемой для амплификации гена *cat*.

35 На Фиг. 2 изображено конструирование фрагмента хромосомной ДНК, содержащего инактивированный оперон *rspAB*.

40 Примеры

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

45 Пример 1. Конструирование штамма с инактивированным геном *rspAB*

1. Делеция оперона *rspAB*

50 Штамм, содержащий делецию оперона *rspAB*, был сконструирован с использованием методики, разработанной Datsenko, K.A. и Wanner, B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645), известной как "Red-зависимая интеграция". В

соответствии с этой методикой были синтезированы ПЦР-праймеры P1 (SEQ ID NO: 5) и P2 (SEQ ID NO: 6), гомологичные участку, прилегающему к оперону *rspAB*, и гену, сообщающему устойчивость к антибиотику, на плазмиде, используемой в качестве матрицы для ПЦР. В качестве матрицы для ПЦР была использована плазида pACYC184 (NBL Gene Sciences Ltd., UK) (инвентарный номер X06403 в базе данных GenBank/EMBL). Использовался следующий температурный профиль для ПЦР: денатурация при 95°C в течение 3 мин; два первых цикла: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; и последующие 25 циклов: 30 сек при 95°C, 30 сек при 54°C, 40 сек при 72°C; и заключительная полимеризация: 5 мин при 72°C.

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

Электрокомпетентные клетки были получены следующим образом: ночную культуру штамма *E. coli* MG1655 выращивали при 30°C в среде LB с добавкой ампициллина (100 мг/л), развели 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 продукта ПЦР. После электропорации клетки инкубировали в 1 мл среды SOC (Sambrook et al, "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) при 37°C в течение 2.5 часов, после чего высевали на чашки с L-агаром, содержащим хлорамфеникол (30 мкг/мл) и выращивали при 37°C для отбора Cm^R-рекомбинантов. Затем для удаления плазмиды pKD46 проводили 2 пассажа на L-агаре с Cm при 42°C, и полученные колонии проверяли на чувствительность к ампициллину.

2. Подтверждение делеции оперона *rspAB* с помощью ПЦР.

Мутанты с делетированным опероном *rspAB*, содержащие ген устойчивости к Cm, были проверены с помощью ПЦР. Локус-специфичные праймеры P3 (SEQ ID NO: 7) и P4 (SEQ ID NO: 8) были использованы для проверки делеции с помощью ПЦР.

Использовался следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: денатурация при 94°C в течение 3 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 54°C, 1 мин при 72°C; заключительный шаг: 7 мин при 72°C. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток родительского штамма *rspAB*⁺ MG1655, составляет 2418 п.н. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток мутантного штамма MG1655 Δ *rspAB*::cat, составляет 1252 п.н. (Фиг.2).

Пример 2. Продукция L-треонина штаммом *E. coli* В-3996- Δ *rspAB*.

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию треонина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ *rspAB*::cat перенесли в штамм-продуцент L-треонина *E. coli* В-3996 (ВКПМ В-3996) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма В-3996- Δ *rspAB*. Штамм В-3996 был депонирован 19 ноября 1987 года во Всесоюзном научном центре антибиотиков (РФ, 117105 Москва, Нагатинская ул., 3-А) с инвентарным номером РИА 1867. Указанный штамм также был депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (РФ, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 7 апреля 1987 г. с инвентарным номером В-3996.

Оба штамма *E. coli*, В-3996 и В-3996- Δ *rspAB*, выращивали в течение 18-24 часов при температуре 37°C на чашках с L-агаром. Для получения посевной культуры указанные штаммы выращивали при 32°C в течение 18 часов на роторной качалке (250 об/мин) в пробирках размером 20x200 мм, содержащих 2 мл L-бульона с 4% сахарозой. Затем в ферментационную среду было внесли по 0.21 мл (10%) посевной культуры. Ферментацию проводили в 2 мл минимальной ферментационной среды в пробирках размером 20x200 мм. Клетки выращивали в течение 72 часов при 32°C с перемешиванием (250 об/мин).

После выращивания количество накопленного в среде L-треонина определяли с помощью бумажной хроматографии, с использованием подвижной фазы следующего состава: бутанол : уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 1 (v/v). Для визуализации использовали раствор (2%) нингидрина в ацетоне. Пятно, содержащее L-треонин, вырезали; элюировали L-треонин 0.5% водным раствором CdCl₂, после чего количество L-треонина оценивали

спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Результаты восьми независимых пробирочных ферментаций приведены в Таблице 1. Как видно из Таблицы 1, штамм В-3996- Δ rspAB накапливал большее количество L-треонина по сравнению со штаммом В-3996.

Использовали ферментационную среду следующего состава (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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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-ΔrspAB.

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-лейцина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔrspAB::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-лейцина *E. coli* 57 (ВКПМ В-7386, патент США 6124121) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), в результате чего может быть получен штамм 57-ΔrspAB. 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.

Оба штамма *E. coli*, 57 и 57-ΔrspAB, 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 20x200 мм, содержащих 2 мл L-бульона с 4% сахарозы. Затем в ферментационную среду может быть внесено по 0.21 мл (10%) посевной культуры. Ферментацию можно проводить в 2 мл минимальной ферментационной среды в пробирках размером 20x200 мм. Клетки могут быть выращены в течение 48-72 часов при 32°C с перемешиванием (250 об/мин). Количество L-лейцина может быть измерено с помощью бумажной хроматографии (состав подвижной фазы: бутанол – уксусная кислота - вода = 4:1:1).

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

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

Глюкозу и мел следует стерилизовать отдельно.

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

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-гистидина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔrspAB::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-гистидина *E. coli* 80 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма 80-ΔrspAB. Штамм 80 описан в патенте РФ 2119536 и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-ый Дорожный проезд, 1) с инвентарным номером ВКПМ В-7270, затем 12 июля 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Оба штамма *E. coli*, 80 и 80-ΔrspAB, могут быть выращены в L-бульоне при 29°C в течение 6 часов. Затем 0.1 мл полученных культур может быть внесено в 2 мл ферментационной среды в пробирки размером 20 x 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.

5

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

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

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

25

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

30

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-глутаминовой кислоты ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔrspAB::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), в результате чего может 35 быть получен штамм VL334thrC⁺-ΔrspAB. Штамм VL334thrC⁺ депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-ый Дорожный проезд, 1) 6 декабря 2004 г. с инвентарным номером В-8961, затем 8 40 декабря 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

45

Оба штамма, VL334thrC⁺ и VL334thrC⁺-ΔrspAB, могут быть выращены на чашках с L-агаром при 37°C в течение 18-24 часов. Далее, одна петля клеток может быть 45 перенесена в пробирки, содержащие 2 мл ферментационной среды. Ферментационная среда должна содержать глюкозу - 60 г/л, сульфат аммония - 25 г/л, KH₂PO₄ - 2 г/л, MgSO₄ - 1 г/л, тиамин - 0.1 мг/мл, L-изолейцин - 70 мкг/мл и мел - 25 г/л (рН 7.2). Глюкозу 50 и мел следует стерилизовать отдельно. Выращивание может производиться при 30°C в

течение 3 дней с перемешиванием. После выращивания количество полученной L-глутаминовой кислоты может быть определено с помощью бумажной хроматографии (состав подвижной фазы: бутанол-уксусная кислота-вода = 4:1:1) с последующим окрашиванием нингидрином (1% раствор в ацетоне) и дальнейшим элюированием полученных соединений в 50% этаноле с 0.5% CdCl₂.

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

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-фенилаланина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔrspAB::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-фенилаланина *E. coli* AJ12739 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма AJ12739-ΔrspAB. Штамм AJ12739 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1^{ый} Дорожный проезд, 1) 6 ноября 2001 года с инвентарным номером ВКПМ В-8197, затем 23 августа 2002 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

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

Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	16.0
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ 5H ₂ O	0.01
Тиамин HCl	0.0002

Дрожжевой экстракт	2.0
Тирозин	0.125
CaCO ₃	20.0

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

10 Пример 9. Продукция L-триптофана штаммом *E. coli* SV164 (pGH5)-ΔrspAB.

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-триптофана ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔrspAB::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-триптофана *E. coli* SV164 (pGH5) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма SV164(pGH5)-ΔrspAB Штамм SV164 содержит аллель *trpE*, кодирующий антранилатсинтазу, которая не подвержена ингибированию триптофаном по типу обратной связи. Плаزمида pGH5 содержит мутантный ген *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, которая не подвержена ингибированию серином по типу обратной связи. Штамм SV164 (pGH5) детально описан в патенте США 6,180,373 и в Европейском патенте 0662143.

25 Оба штамма, SV164(pGH5)-ΔrspAB и SV164(pGH5), могут быть выращены с перемешиванием при 37°С в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона с добавлением тетрациклина (маркера плазмиды pGH5, 20 мг/мл). По 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды, содержащей тетрациклин (20 мг/мл), в пробирках размером 20 x 200 мм; и культуры могут быть выращены при 37°С в течение 48 часов на роторной качалке при 250 об/мин. После выращивания количество накопленного в среде триптофана может быть определено с помощью TLC, как описано в Примере 8. Компоненты ферментационной среды представлены в Таблице 2, но группы компонентов А, В, С, D, Е, F и Н следует стерилизовать отдельно, как и показано в Таблице, чтобы избежать нежелательных взаимодействий во время стерилизации.

40 Пример 10. Продукция L-пролина штаммом *E. coli* 702ilvA-ΔrspAB.

Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-пролина ДНК-фрагменты из хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔrspAB::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-пролина *E. coli* 702ilvA с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) для получения штамма 702ilvA-ΔrspAB. Штамм 702ilvA депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ)

(Россия, 117545 Москва, 1^{ый} Дорожный проезд, 1) 18 июля 2000 г. с инвентарным номером ВКПМ В-8012, затем 18 мая 2001 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

5 Оба штамма *E. coli*, 702ilvA и 702ilvA- Δ rspAB, 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
10 Примере 8.

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

15 Для оценки влияния инактивации оперона *rspAB* на продукцию L-аргинина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ rspAB::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-аргинина *E. coli* 382 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)
20 для получения штамма 382- Δ rspAB. Штамм 382 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1^{ый} Дорожный проезд, 1) 10 апреля 2000 года с инвентарным номером ВКПМ В-7926, затем
25 18 мая 2001 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

30 Оба штамма, 382- Δ rspAB и 382, могут быть выращены с перемешиванием при 37°C в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона, содержащего хлорамфеникол (30 мг/мл); по 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды в пробирки размером 20 x 200 мм, и культуры могут быть выращены при 32°C в течение 48 часов на роторной качалке.

35 После выращивания количество накопленного в среде L-аргинина может быть определено с помощью бумажной хроматографии, при этом может быть использован следующий состав подвижной фазы: бутанол : уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 1 (v/v). Раствор нингидрина (2%) в ацетоне может быть использован для визуализации. Пятно,
40 содержащее L-аргинин, может быть вырезано; L-аргинин может быть элюирован 0.5% водным раствором CdCl₂, после чего количество L-аргинина может быть определено спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм.

45 Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	48.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	35.0
KN ₂ PO ₄	2.0
50 MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0

Тиамин HCl	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
L-изолейцин	0.1
CaCO ₃	5.0

5

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

10

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.

15

Каждому из упомянутых выше документов соответствует ссылка, и все цитируемые документы являются частью описания настоящего изобретения.

20

25

30

35

40

45

50

Таблица 1

Штамм	OD ₅₄₀	L-треонин, г/л
B-3996	25.0 ± 1.1	29.0 ± 0.4
B-3996-ΔrspAB	25.9 ± 1.0	29.5 ± 1.1

Таблица 2

Растворы	Компонент	Конечная концентрация, г/л
A	KH ₂ PO ₄	1.5
	RspAB1	0.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5
	L-метионин	0.05
	L-фенилаланин	0.1
	L-тирозин	0.1
	Матено (общий N)	0.07
B	Глюкоза	40.0
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.3
C	CaCl ₂	0.011
D	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.075
	Цитрат натрия	1.0
E	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 7 H ₂ O	0.0003
F	Тиамин HCl	0.005
G	CaCO ₃	30.0
H	Пиридоксин	0.03

pH раствора A довели до значения 7.1 при помощи NH₄OH.

Перечень последовательностей

- 5 <110> Ajinomoto-Genetika Research Institute
- 10 <120> A METHOD FOR PRODUCING AN L-AMINO ACID USING A BACTERIUM OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY HAVING EXPRESSION OF THE *rspAB* OPERON ATTENUATED
- <130> *rspAB*
- 15 <160> 8
- 20 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- 25 <211> 1215
- <212> DNA
- <213> *Escherichia coli*
- 30 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1215)
- 35 <223>
- <400> 1
- 40 atg aag atc gta aag gct gaa gtt ttt gtt acc tgt ccg ggg cgt aat 48
Met Lys Ile Val Lys Ala Glu Val Phe Val Thr Cys Pro Gly Arg Asn
1 5 10 15
- 45 ttc gtc aca tta aaa atc acc act gag gac ggt att acg ggc ctt ggg 96
Phe Val Thr Leu Lys Ile Thr Thr Glu Asp Gly Ile Thr Gly Leu Gly
20 25 30
- gat gcc acc ctc aat gga cgt gag ctt tcc gtg gcc tct tat ttg cag 144
Asp Ala Thr Leu Asn Gly Arg Glu Leu Ser Val Ala Ser Tyr Leu Gln
35 40 45
- 50 gat cac ctt tgt ccg cag ctt att ggt cgc gat gcg cac cgt atc gaa 192
Asp His Leu Cys Pro Gln Leu Ile Gly Arg Asp Ala His Arg Ile Glu
50 55 60

	gat atc tgg cag ttt ttc tat aaa ggt gct tac tgg cgt cgc ggt ccg	240
	Asp Ile Trp Gln Phe Phe Tyr Lys Gly Ala Tyr Trp Arg Arg Gly Pro	
	65 70 75 80	
5	gtt acg atg tcg gcc att tca gcg gtt gat atg gcg ctg tgg gat att	288
	Val Thr Met Ser Ala Ile Ser Ala Val Asp Met Ala Leu Trp Asp Ile	
	85 90 95	
10	aaa gcc aaa gct gcc aac atg ccg ctt tac cag tta ctc ggc ggc gcg	336
	Lys Ala Lys Ala Ala Asn Met Pro Leu Tyr Gln Leu Leu Gly Gly Ala	
	100 105 110	
15	tct cgt gaa ggg gtg atg gtt tat tgc cat acc acc ggt cac agt att	384
	Ser Arg Glu Gly Val Met Val Tyr Cys His Thr Thr Gly His Ser Ile	
	115 120 125	
20	gat gaa gct ctg gat gat tat gcc cgt cat caa gag ctt gga ttc aaa	432
	Asp Glu Ala Leu Asp Asp Tyr Ala Arg His Gln Glu Leu Gly Phe Lys	
	130 135 140	
25	gcc atc cgc gtg cag tgc gga atc cct ggt atg aaa acc acc tac ggc	480
	Ala Ile Arg Val Gln Cys Gly Ile Pro Gly Met Lys Thr Thr Tyr Gly	
	145 150 155 160	
30	atg tcg aaa ggt aaa ggt ctg gct tat gaa ccc gca acc aaa gga cag	528
	Met Ser Lys Gly Lys Gly Leu Ala Tyr Glu Pro Ala Thr Lys Gly Gln	
	165 170 175	
35	tgg ccg gaa gag cag ctg tgg tgc acg gag aaa tac ctc gat ttc atg	576
	Trp Pro Glu Glu Gln Leu Trp Ser Thr Glu Lys Tyr Leu Asp Phe Met	
	180 185 190	
40	ccg aaa ttg ttt gac gcg gta cgt aac aag ttt ggt ttt aat gaa cat	624
	Pro Lys Leu Phe Asp Ala Val Arg Asn Lys Phe Gly Phe Asn Glu His	
	195 200 205	
45	ttg ctg cat gac atg cac cat cgc tta acg cct att gaa gcg gcg cgc	672
	Leu Leu His Asp Met His His Arg Leu Thr Pro Ile Glu Ala Ala Arg	
	210 215 220	
50	ttt ggt aaa agc att gaa gat tat cgc atg ttc tgg atg gaa gac ccg	720
	Phe Gly Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Arg Met Phe Trp Met Glu Asp Pro	
	225 230 235 240	
55	acg cct gcg gaa aac cag gaa tgc ttc cgt ctc att cgc caa cat acc	768
	Thr Pro Ala Glu Asn Gln Glu Cys Phe Arg Leu Ile Arg Gln His Thr	
	245 250 255	
60	gtc aca ccc atc gca gtg ggt gaa gtc ttc aac agc atc tgg gac tgc	816
	Val Thr Pro Ile Ala Val Gly Glu Val Phe Asn Ser Ile Trp Asp Cys	
	260 265 270	
65	aaa caa ctg att gaa gag caa ctc atc gat tat atc cgc acc acg ctg	864
	Lys Gln Leu Ile Glu Glu Gln Leu Ile Asp Tyr Ile Arg Thr Thr Leu	
	275 280 285	
70	acc cat gca ggc gga att acc ggt atg cgc cgg att gcc gat ttt gct	912
	Thr His Ala Gly Gly Ile Thr Gly Met Arg Arg Ile Ala Asp Phe Ala	
	290 295 300	
75	tcg ctg tat cag gta cgt act ggc tca cac ggt cct tcc gat ttg tca	960
	Ser Leu Tyr Gln Val Arg Thr Gly Ser His Gly Pro Ser Asp Leu Ser	
	305 310 315 320	

	cca gtc tgc atg gct gcg gcg ctg cac ttt gat ctg tgg gtc ccc aat	1008
	Pro Val Cys Met Ala Ala Ala Leu His Phe Asp Leu Trp Val Pro Asn	
	325 330 335	
5	ttc ggt gtc cag gaa tac atg ggt tat tcc gaa caa atg ctc gaa gtc	1056
	Phe Gly Val Gln Glu Tyr Met Gly Tyr Ser Glu Gln Met Leu Glu Val	
	340 345 350	
	ttc ccg cac aac tgg act ttc gat aac ggc tat atg cat ccg gga gac	1104
	Phe Pro His Asn Trp Thr Phe Asp Asn Gly Tyr Met His Pro Gly Asp	
10	355 360 365	
	aaa ccg ggt ctt ggt atc gaa ttc gat gaa aag ctg gcg gcg aaa tat	1152
	Lys Pro Gly Leu Gly Ile Glu Phe Asp Glu Lys Leu Ala Ala Lys Tyr	
	370 375 380	
15	ccc tat gaa cct gct tat cta cca gtc gca cgt ctg gaa gat ggc acg	1200
	Pro Tyr Glu Pro Ala Tyr Leu Pro Val Ala Arg Leu Glu Asp Gly Thr	
	385 390 395 400	
	ctg tgg aac tgg taa	1215
	Leu Trp Asn Trp	
20		
	<210> 2	
	<211> 404	
25	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
30	<400> 2	
	Met Lys Ile Val Lys Ala Glu Val Phe Val Thr Cys Pro Gly Arg Asn	
	1 5 10 15	
35	Phe Val Thr Leu Lys Ile Thr Thr Glu Asp Gly Ile Thr Gly Leu Gly	
	20 25 30	
	Asp Ala Thr Leu Asn Gly Arg Glu Leu Ser Val Ala Ser Tyr Leu Gln	
40	35 40 45	
	Asp His Leu Cys Pro Gln Leu Ile Gly Arg Asp Ala His Arg Ile Glu	
	50 55 60	
45	Asp Ile Trp Gln Phe Phe Tyr Lys Gly Ala Tyr Trp Arg Arg Gly Pro	
	65 70 75 80	
	Val Thr Met Ser Ala Ile Ser Ala Val Asp Met Ala Leu Trp Asp Ile	
50	85 90 95	
	Lys Ala Lys Ala Ala Asn Met Pro Leu Tyr Gln Leu Leu Gly Gly Ala	
	100 105 110	

Ser Arg Glu Gly Val Met Val Tyr Cys His Thr Thr Gly His Ser Ile
 115 120 125

5 Asp Glu Ala Leu Asp Asp Tyr Ala Arg His Gln Glu Leu Gly Phe Lys
 130 135 140

Ala Ile Arg Val Gln Cys Gly Ile Pro Gly Met Lys Thr Thr Tyr Gly
 145 150 155 160

10 Met Ser Lys Gly Lys Gly Leu Ala Tyr Glu Pro Ala Thr Lys Gly Gln
 165 170 175

Trp Pro Glu Glu Gln Leu Trp Ser Thr Glu Lys Tyr Leu Asp Phe Met
 180 185 190

Pro Lys Leu Phe Asp Ala Val Arg Asn Lys Phe Gly Phe Asn Glu His
 195 200 205

20 Leu Leu His Asp Met His His Arg Leu Thr Pro Ile Glu Ala Ala Arg
 210 215 220

Phe Gly Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Arg Met Phe Trp Met Glu Asp Pro
 225 230 235 240

25 Thr Pro Ala Glu Asn Gln Glu Cys Phe Arg Leu Ile Arg Gln His Thr
 245 250 255

30 Val Thr Pro Ile Ala Val Gly Glu Val Phe Asn Ser Ile Trp Asp Cys
 260 265 270

Lys Gln Leu Ile Glu Glu Gln Leu Ile Asp Tyr Ile Arg Thr Thr Leu
 275 280 285

35 Thr His Ala Gly Gly Ile Thr Gly Met Arg Arg Ile Ala Asp Phe Ala
 290 295 300

40 Ser Leu Tyr Gln Val Arg Thr Gly Ser His Gly Pro Ser Asp Leu Ser
 305 310 315 320

Pro Val Cys Met Ala Ala Ala Leu His Phe Asp Leu Trp Val Pro Asn
 325 330 335

45 Phe Gly Val Gln Glu Tyr Met Gly Tyr Ser Glu Gln Met Leu Glu Val
 340 345 350

50 Phe Pro His Asn Trp Thr Phe Asp Asn Gly Tyr Met His Pro Gly Asp
 355 360 365

Lys Pro Gly Leu Gly Ile Glu Phe Asp Glu Lys Leu Ala Ala Lys Tyr
 370 375 380

5 Pro Tyr Glu Pro Ala Tyr Leu Pro Val Ala Arg Leu Glu Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Leu Trp Asn Trp

10

<210> 3

<211> 1020

<212> DNA

15

<213> Escherichia coli

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1020)

<223>

25

<400> 3

30

atg aaa agc ata tta att gaa aaa ccg aat caa ctg gcg att gtc gaa 48
 Met Lys Ser Ile Leu Ile Glu Lys Pro Asn Gln Leu Ala Ile Val Glu
 1 5 10 15

cgt gaa ata ccc acc ccg tca gcg ggt gaa gta cga gta aaa gtg aaa 96
 Arg Glu Ile Pro Thr Pro Ser Ala Gly Glu Val Arg Val Lys Val Lys
 20 25 30

35

ctt gcc gga att tgt ggt tca gat agc cat att tat cgt ggg cat aat 144
 Leu Ala Gly Ile Cys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Arg Gly His Asn
 35 40 45

40

cct ttt gcg aaa tat ccg cgc gtc att ggt cat gaa ttc ttt ggc gtc 192
 Pro Phe Ala Lys Tyr Pro Arg Val Ile Gly His Glu Phe Phe Gly Val
 50 55 60

att gat gca gtg ggt gaa ggc gtg gaa agc gcc aga gtc ggt gaa cgt 240
 Ile Asp Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Ser Ala Arg Val Gly Glu Arg
 65 70 75 80

45

gtt gct gtc gat ccg gtg gtc agc tgt ggg cat tgc tat ccg tgc tct 288
 Val Ala Val Asp Pro Val Val Ser Cys Gly His Cys Tyr Pro Cys Ser
 85 90 95

50

ata ggt aaa ccg aac gtt tgt acg aca ctg gct gta tta ggt gtg cac 336
 Ile Gly Lys Pro Asn Val Cys Thr Thr Leu Ala Val Leu Gly Val His
 100 105 110

gct gac ggt ggt ttc agt gaa tat gcc gtg gtt ccg gca aaa aat gcg 384
 Ala Asp Gly Gly Phe Ser Glu Tyr Ala Val Val Pro Ala Lys Asn Ala

	115	120	125	
	tgg aaa att cct gaa gca gtg gcc gat caa tat gcg gta atg atc gaa			432
	Trp Lys Ile Pro Glu Ala Val Ala Asp Gln Tyr Ala Val Met Ile Glu			
	130	135	140	
5	cct ttt acc att gcg gct aac gta acc gga cat ggt caa ccg act gaa			480
	Pro Phe Thr Ile Ala Ala Asn Val Thr Gly His Gly Gln Pro Thr Glu			
	145	150	155	160
10	aat gat acc gtt ctg gtt tat ggt gcc ggt cca atc ggc ctg acg atc			528
	Asn Asp Thr Val Leu Val Tyr Gly Ala Gly Pro Ile Gly Leu Thr Ile			
		165	170	175
15	gtt cag gta tta aaa ggc gtc tat aac gtt aaa aat gtg att gtt gcc			576
	Val Gln Val Leu Lys Gly Val Tyr Asn Val Lys Asn Val Ile Val Ala			
		180	185	190
20	gat cgc att gat gaa cga ctg gaa aaa gcg aaa gag agc ggg gct gac			624
	Asp Arg Ile Asp Glu Arg Leu Glu Lys Ala Lys Glu Ser Gly Ala Asp			
		195	200	205
25	tgg gcg att aat aac agc cag aca ccg ctt ggc gag att ttc act gaa			672
	Trp Ala Ile Asn Asn Ser Gln Thr Pro Leu Gly Glu Ile Phe Thr Glu			
		210	215	220
30	aaa ggc atc aag ccg aca tta att atc gat gcg gct tgt cat cct tct			720
	Lys Gly Ile Lys Pro Thr Leu Ile Ile Asp Ala Ala Cys His Pro Ser			
		225	230	235
35	atc ctg aaa gag gcc gta acg ctg gct tct cca gcg gca cgt att gta			768
	Ile Leu Lys Glu Ala Val Thr Leu Ala Ser Pro Ala Ala Arg Ile Val			
		245	250	255
40	ttg atg ggg ttc tcc agt gaa ccg tct gaa gtg att cag caa gga att			816
	Leu Met Gly Phe Ser Ser Glu Pro Ser Ser Glu Val Ile Gln Gln Gly Ile			
		260	265	270
45	acc gga aaa gaa ctc tct att ttc tct tca cgc tta aat gca aat aaa			864
	Thr Gly Lys Glu Leu Ser Ile Phe Ser Ser Arg Leu Asn Ala Asn Lys			
		275	280	285
50	ttc ccg atc gtt atc gac tgg tta agt aaa ggg tta att aaa cca gaa			912
	Phe Pro Ile Val Ile Asp Trp Leu Ser Lys Gly Leu Ile Lys Pro Glu			
		290	295	300
55	aaa tta att acc cat acg ttt gat ttc cag cat gtt gct gat gcc att			960
	Lys Leu Ile Thr His Thr Phe Asp Phe Gln His Val Ala Asp Ala Ile			
		305	310	315
60	agt tta ttt gaa cag gat caa aaa cat tgc tgc aaa gtc tta ctc act			1008
	Ser Leu Phe Glu Gln Asp Gln Lys His Cys Cys Lys Val Leu Leu Thr			
		325	330	335
65	ttt tct gaa taa			1020
	Phe Ser Glu			
70	<210> 4			
75	<211> 339			

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 4

Met Lys Ser Ile Leu Ile Glu Lys Pro Asn Gln Leu Ala Ile Val Glu
1 5 10 15

10

Arg Glu Ile Pro Thr Pro Ser Ala Gly Glu Val Arg Val Lys Val Lys
20 25 30

15

Leu Ala Gly Ile Cys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Arg Gly His Asn
35 40 45

Pro Phe Ala Lys Tyr Pro Arg Val Ile Gly His Glu Phe Phe Gly Val
50 55 60

20

Ile Asp Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Ser Ala Arg Val Gly Glu Arg
65 70 75 80

25

Val Ala Val Asp Pro Val Val Ser Cys Gly His Cys Tyr Pro Cys Ser
85 90 95

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

30

Ala Asp Gly Gly Phe Ser Glu Tyr Ala Val Val Pro Ala Lys Asn Ala
115 120 125

35

Trp Lys Ile Pro Glu Ala Val Ala Asp Gln Tyr Ala Val Met Ile Glu
130 135 140

Pro Phe Thr Ile Ala Ala Asn Val Thr Gly His Gly Gln Pro Thr Glu
145 150 155 160

40

Asn Asp Thr Val Leu Val Tyr Gly Ala Gly Pro Ile Gly Leu Thr Ile
165 170 175

45

Val Gln Val Leu Lys Gly Val Tyr Asn Val Lys Asn Val Ile Val Ala
180 185 190

Asp Arg Ile Asp Glu Arg Leu Glu Lys Ala Lys Glu Ser Gly Ala Asp
195 200 205

50

Trp Ala Ile Asn Asn Ser Gln Thr Pro Leu Gly Glu Ile Phe Thr Glu
210 215 220

Lys Gly Ile Lys Pro Thr Leu Ile Ile Asp Ala Ala Cys His Pro Ser
 225 230 235 240

5 Ile Leu Lys Glu Ala Val Thr Leu Ala Ser Pro Ala Ala Arg Ile Val
 245 250 255

Leu Met Gly Phe Ser Ser Glu Pro Ser Glu Val Ile Gln Gln Gly Ile
 260 265 270

10 Thr Gly Lys Glu Leu Ser Ile Phe Ser Ser Arg Leu Asn Ala Asn Lys
 275 280 285

15 Phe Pro Ile Val Ile Asp Trp Leu Ser Lys Gly Leu Ile Lys Pro Glu
 290 295 300

Lys Leu Ile Thr His Thr Phe Asp Phe Gln His Val Ala Asp Ala Ile
 305 310 315 320

20 Ser Leu Phe Glu Gln Asp Gln Lys His Cys Cys Lys Val Leu Leu Thr
 325 330 335

Phe Ser Glu

25

<210> 5

<211> 57

30

<212> DNA

<213> Artificial sequence: primer P1

35

<400> 5

ttcatgcatc acgacaagcg atgcaaggaa tcgaacttaa gggcaccaat aactgcc

57

<210> 6

40

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence: primer P2

45

<400> 6

ggtaagatgc gtactactta ctcgccgta ttggtatagt aagccagtat acactcc

57

50

<210> 7

<211> 21

<400> 7
tatggtagta gctcagttgc g 21

5

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

10

<213> Artificial sequence: primer P4

<400> 8
actgctgctt tcaccaaatc c 21

15

Формула изобретения

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

2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанный оперон *gspAB* инактивирован за счет делеции оперона *gspAB* в хромосоме бактерии.

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

25

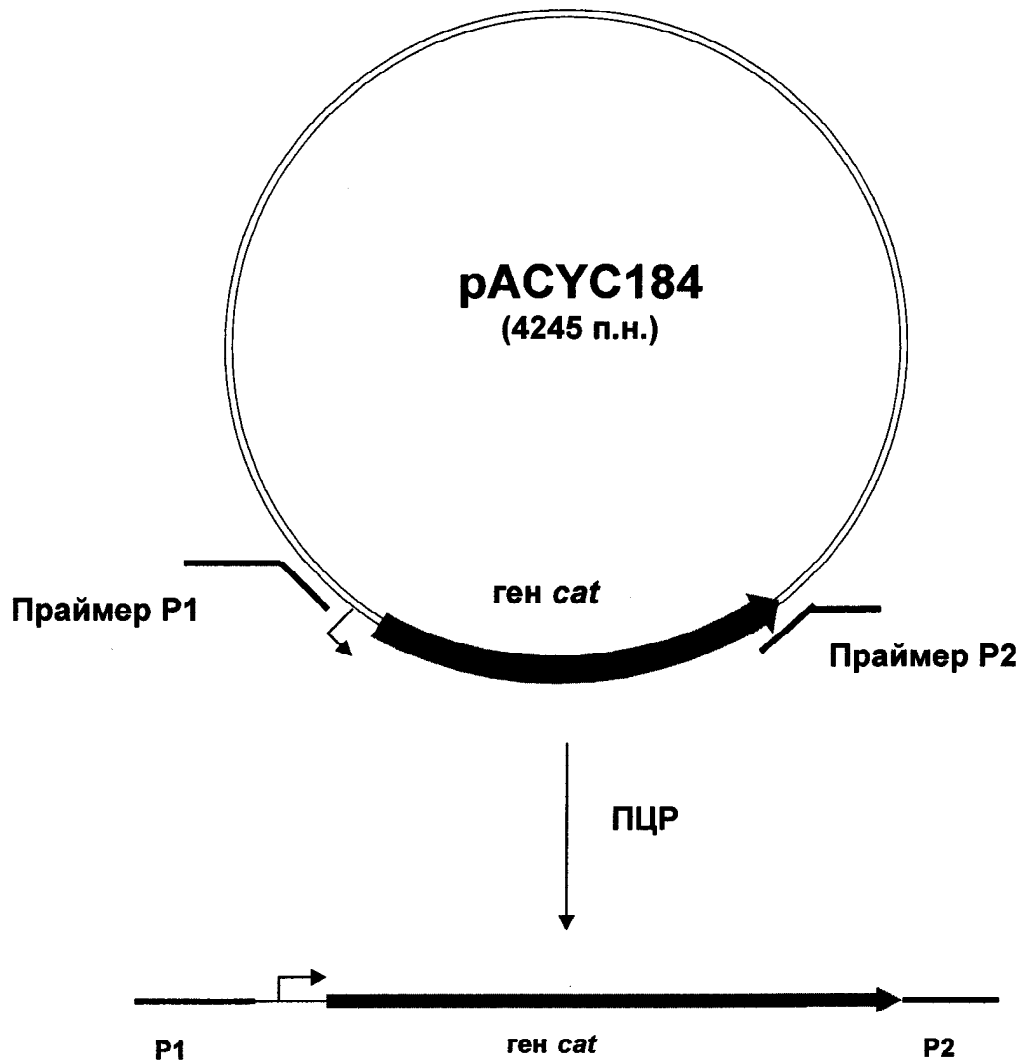
30

35

40

45

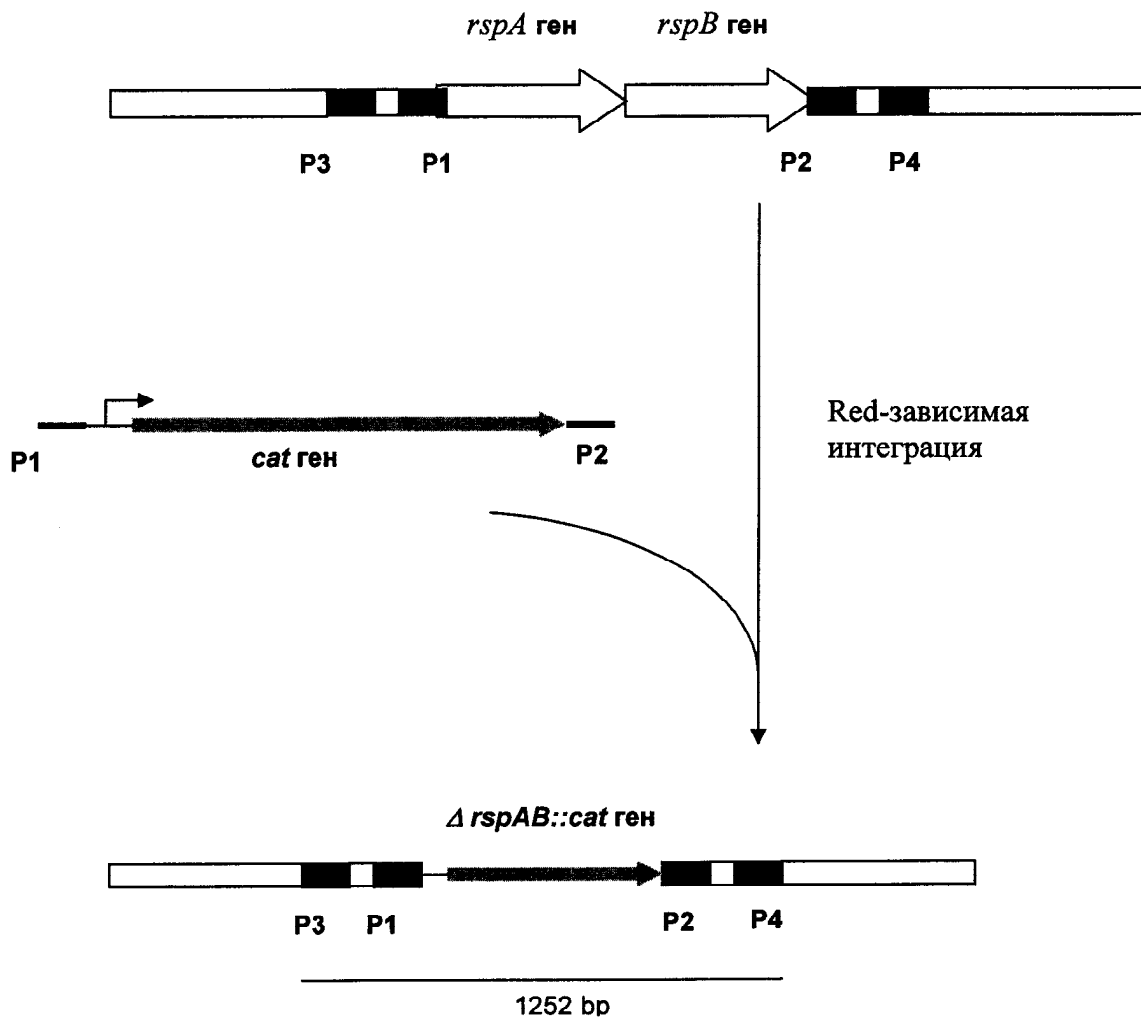
50



Полученный ПЦР-продукт (1152 п.н.)

Расположение праймеров P1 и P2 на плазмиде pACYC184.

Фиг. 1



Конструирование хромосомного фрагмента ДНК, содержащего инактивированный оперон *rspAB*.

Фиг. 2