



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 392 322** (13) **C2**

(51) МПК  
*C12N 15/00* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007131007/13, 14.08.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.08.2007

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2009

(45) Опубликовано: 20.06.2010 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ZAKATAEVA N.P., et. al. Export of metabolites by the proteins of the DMT and RhtB families and its possible role in intercellular communication, Mikrobiologiya. 2006 Jul-Aug; 75(4):509-20. EP 1016710 A2, 05.07.2000. SU 1694643 A1, 30.11.1991.**

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1, к.1,  
ЗАО АГРИ, пат.пов. В.М.Белкову

(72) Автор(ы):

**Альтман Ирина Борисовна (RU),  
Птицын Леонид Романович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

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

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

(57) Реферат:

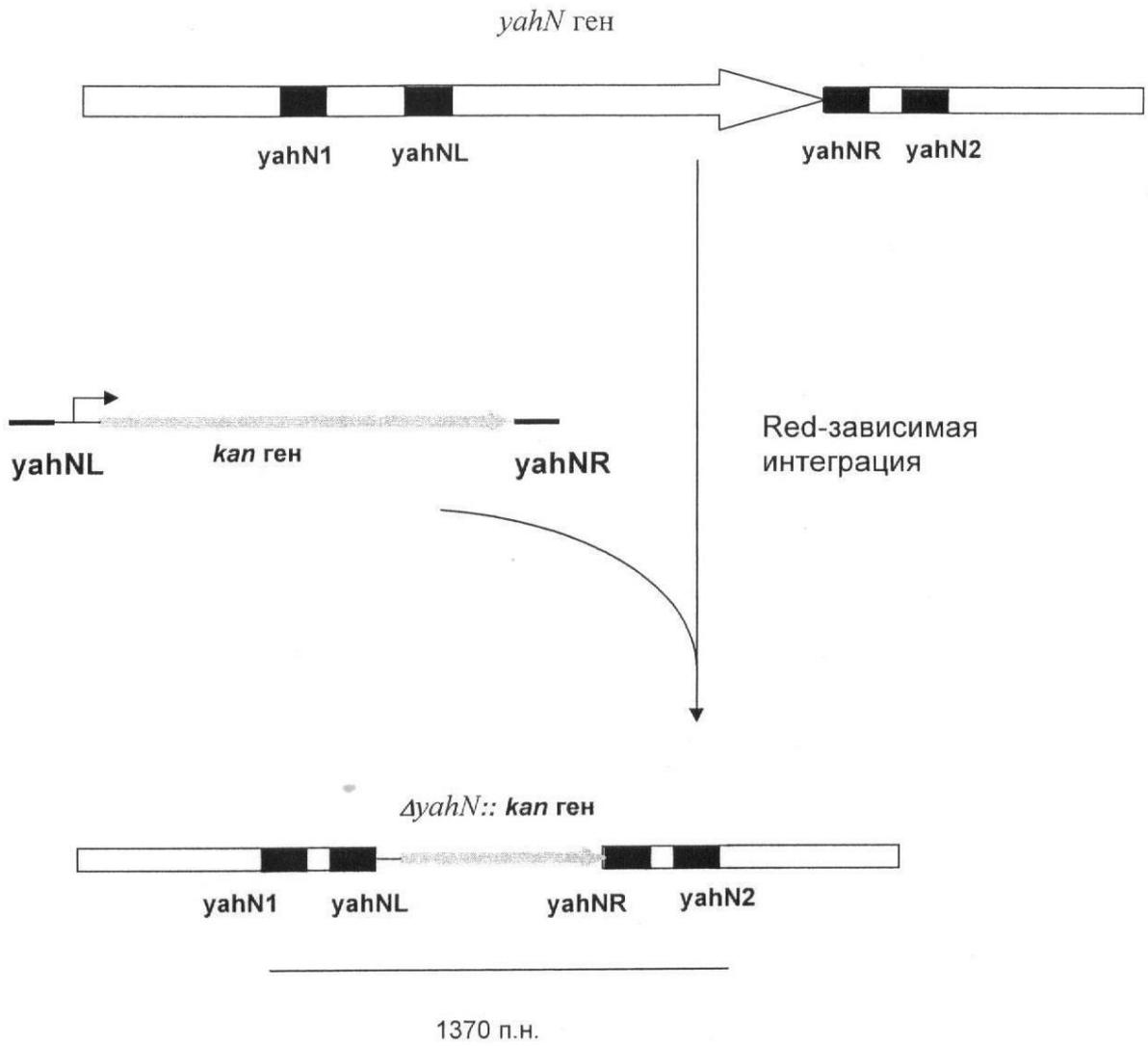
Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, которая

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

RU 2 3 9 2 3 2 2 C 2

RU 2 3 9 2 3 2 2 C 2

Конструирование фрагмента хромосомной ДНК, содержащего инактивированный ген *yahN*.



Фиг.2

RU 2392322 C2

RU 2392322 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007131007/13, 14.08.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**14.08.2007**

(43) Application published: **20.02.2009**

(45) Date of publication: **20.06.2010 Bull. 17**

Mail address:  
**117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, k.1, ZAO  
AGRI, pat.pov. V.M.Belkovu**

(72) Inventor(s):

**Al'tman Irina Borisovna (RU),  
Ptitsyn Leonid Romanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

**(54) METHOD OF L-THREONINE MANUFACTURE USING BACTERIA OF Escherichia GENUS WITH INACTIVATED GENE yahN**

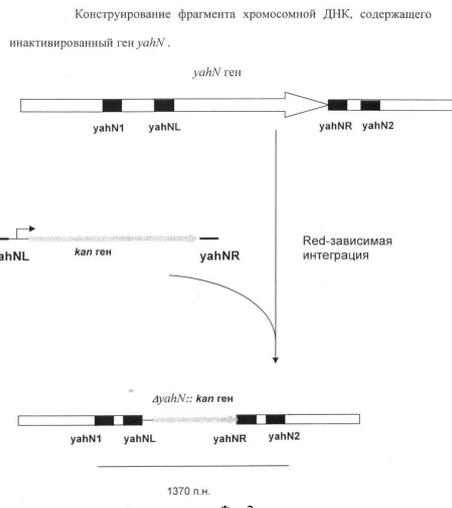
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is method of L-threonine manufacturing, using bacteria of Escherichia genus, which is modified in the way to inactivate gene yahN.

EFFECT: invention allows highly effective manufacture of L-threonine.

3 cl, 2 dwg, 1 tbl, 5 ex



RU 2 3 9 2 3 2 2 C 2

RU 2 3 9 2 3 2 2 C 2

Область техники

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

Было описано несколько белков E.coli, которые в случае их сверхэкспрессии придают клеткам устойчивость к треонину и гомосерину (Livshits V.A., et al., Res Microbiol., 154(2), 123-35 (2003); Zakataeva N.P., et al., FEBS Lett., 452, 228-232 (1999)).

Было показано, что данные гены кодируют белки, вовлеченные в секрецию аминокислот. При секвенировании генома of E.coli и других прокариот обнаружено, что белки RhtB и RhtC принадлежат к новому RhtB семейству мембранных белков (Aleshin V.V., et al., Trends Biochem Sci., 24(4), 133-5(1999)). Данное семейство также включает белки E.coli, кодируемые генами ufiK, yahN, yeaS и yggA.

Аmplификация фрагмента ДНК yahN приводила к увеличению накапливаемых пролина и глутаминовой кислоты и к устойчивости клеток к L-аминокислотам семейства глутаминовой кислоты (EP 1016710 A2).

В настоящее время нет сообщений, описывающих ослабление экспрессии гена yahN для получения L-аминокислот семейства аспарагиновой кислоты.

Описание изобретения

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

Настоящее изобретение предоставляет бактерию семейства Enterobacteriaceae, обладающую способностью к повышенной продукции аминокислот, таких как L-аспарагиновая кислота, L-треонин, L-лизин, L-метионин, L-аланин и гомосерин.

Целью настоящего изобретения является предоставление бактерии семейства Enterobacteriaceae-продуцента L-аминокислоты семейства аспарагиновой кислоты, модифицированной таким образом, что экспрессия гена yahN в указанной бактерии ослаблена.

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

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 семейства аспарагиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из L-аспарагиновой кислоты, L-треонина, L-лизина, L-метионина, L-аланина и гомосерина.

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

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

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, при этом указанная L-аминокислота семейства аспарагиновой кислоты  
5 выбрана из группы, состоящей из L-аспарагиновой кислоты, L-треонина, L-лизина, L-метионина, L-аланина и гомосерина.

Более детально настоящее изобретение описано ниже.

Наилучший способ осуществления настоящего изобретения

1. Бактерия согласно настоящему изобретению

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

Согласно настоящему изобретению «бактерия-продуцент L-аминокислоты»  
15 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  
20 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  
25 предпочтительно - не менее чем 1.0 г/л. Термин "L-аминокислота семейства аспарагиновой кислоты" включает L-аспарагиновую кислоту, L-треонин, L-лизин, L-метионин, L-аланин и гомосерин.

Семейство *Enterobacteriaceae* включает в себя бактерии, принадлежащие к  
30 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>). Предпочтительна бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia* или *Pantoea*.

Термин "бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*", означает, что бактерия  
40 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  
45 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  
50 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)).

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

10 Термин «инактивация гена *yahN*» означает, что модифицированный ген кодирует полностью неактивный белок. Возможно также, что естественная экспрессия модифицированного участка ДНК невозможна из-за делеции генов оперона, сдвига рамки считывания, введения миссенс/нонсенс мутации(-ий) или модификации примыкающих к гену областей, которые включают последовательности,  
15 контролирующие экспрессию гена, такие как промоторы, энхансеры, аттенуаторы, сайты связывания рибосомы и т.д.

Наличие или отсутствие гена *yahN* на хромосоме может быть определено хорошо известными методами, включая ПЦР, блоттинг по Саузерну и т.п. Кроме того,  
20 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 белка, кодируемого геном *yahN*, можно определить известными методами, включая электрофорез в SDS-ПААГ с последующим иммуноблоттингом (Вестерн-блоттинг) и т.д.

25 Ген *yahN* (синоним *b0328*) кодирует белок *YahN* (синонимы: предполагаемая цитохромная субъединица дегидрогеназы, *B0328*, *YahN*). Ген *yahN* (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 344,890 по 345,561 в последовательности с инвентарным номером NC\_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен  
30 между генами *yahM* и *yahO* на хромосоме штамма *E. coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *yahN* и аминокислотная последовательность *YahN*, кодируемого геном *yahN*, приведены в Перечне последовательностей под номерами 1 (SEQ ID NO: 1) и 2 (SEQ ID NO: 2) соответственно.

Поскольку у представителей различных родов и штаммов  
35 семейства *Enterobacteriaceae* возможны некоторые вариации в нуклеотидных последовательностях, понятие инактивируемого гена *yahN* не ограничивается геном, последовательность которого приведена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1, но также может включать и гены, гомологичные SEQ ID NO: 1,  
40 кодирующие вариант белка(-ов) *YahN*. Термин "вариант белка", используемый в настоящем изобретении, означает белок с изменениями в последовательности, будь то делеции, вставки, добавления или замены аминокислот, в котором сохраняется активность белка *YahN*. Число изменений в варианте белка зависит от положения или типа аминокислотного остатка в третичной структуре белка. Оно может быть от 1  
45 до 30, предпочтительно от 1 до 15, более предпочтительно от 1 до 5 в SEQ ID NO: 2. 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 другу, поэтому такие изменения не влияют на третичную структуру или активность. Следовательно, вариант белка, кодируемого  
50 геном *yahN*, может быть представлен белками с гомологией не менее 80%, предпочтительно не менее 90%, и, наиболее предпочтительно, не менее 95%, по отношению к полной аминокислотной последовательности, приведенной в Перечне

последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, при условии, что до инактивации сохраняется активность белка YahN.

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, ген yahN может быть вариантом, который гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, приведенной в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1, или с зондом, который может быть синтезирован на основе указанной нуклеотидной последовательности, при условии, что до инактивации он кодирует функциональный белок YahN. «Жесткие условия» включают такие условия, при которых специфические гибриды, например гибриды с гомологией не менее 60%, предпочтительно не менее 70%, более предпочтительно не менее 80%, еще более предпочтительно не менее 90% и наиболее предпочтительно не менее 95%, образуются, а неспецифические гибриды, например гибриды с меньшей гомологией, чем указано выше, не образуются. Практическим примером жестких условий является однократная отмывка, предпочтительно двух- или трехкратная, при концентрации солей 1×SSC, 0.1% SDS, предпочтительно 0.1×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.

Экспрессия гена yahN может быть ослаблена введением мутаций в гены. 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 одного или более оснований для сдвига рамки считывания, вставка гена устойчивости к антибиотику, или делеция гена или его части (J. Biol. Chem., 1997, 272 (13): 8611-8617, J. Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 46: 793-79). Экспрессия гена yahN также может быть ослаблена модификацией экспрессии регуляторных последовательностей, таких как промотор, последовательность Shine-Dalgarno (SD) и т.д. (заявка PCT WO 95/34672; Carrier, T.A. and Keasling, J.D., Biotechnol. Prog. 15, 58-64 (1999)).

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. Такое 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), заявка PCT WO 2005/010175) или методом с использованием плазмиды, репликация которой чувствительна к температуре (патент США 6303383 или патентная заявка Японии JP 05-007491 A). 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.

Экспрессия гена также может быть ослаблена вставкой транспозона или IS фактора в кодирующую область гена (патент США 5175107), 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".

Активность белка YahN может быть определена, например, по увеличению продукции пролина, накопления глутаминовой кислоты и по устойчивости клеток к L-аминокислотам семейства глутаминовой кислоты при сверхэкспрессии гена yahN в бактерии (EP 1016710A2). Поэтому уменьшение или отсутствие активности белка YahN в бактерии настоящего изобретения может быть определено при сравнении и родительской немодифицированной бактерией.

Методы приготовления плазмидной ДНК, рестрикции и лидирования 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 согласно настоящему изобретению, модифицированной таким образом, что экспрессия гена yahN ослаблена, может быть использована бактерия, способная к продукции ароматической или неароматической L-аминокислоты.

Бактерия согласно настоящему изобретению может быть получена путем ослабления экспрессии гена yahN в бактерии, уже обладающей способностью к продукции L-аминокислот. С другой стороны, бактерия согласно настоящему изобретению может быть получена путем придания бактерии, в которой экспрессия гена yahN 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 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 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) 7 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 0593792В). Штамм В-5318 является прототрофным относительно изолейцина, и чувствительный к температуре С1 репрессор фага  $\lambda$  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 аспартат- $\beta$ -семиальдегиддегидрогеназу, и
- гена *aspC*, кодирующего аспаратаминотрансферазу (аспартаттрансаминазу).

Нуклеотидная последовательность гена *thrA*, кодирующего аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 337 по 2799 в последовательности с инвентарным номером NC\_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrA* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между генами *thrL* и *thrB*. Нуклеотидная последовательность гена *thrB*, кодирующего гомосеринкиназу из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 2801 по 3733 в последовательности с инвентарным номером NC\_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrB* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между генами *thrA* и *thrC*. Нуклеотидная последовательность гена *thrC*, кодирующего треонинсинтазу из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 3734 по 5020 в последовательности с инвентарным номером NC\_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrC* расположен на хромосоме штамма *E. coli* K-12 между геном *thrB* и открытой рамкой считывания *uaaX*. Все три указанных гена функционируют как один треониновый оперон.

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

Ген *rhtA* расположен на 18 минуте хромосомы *E. coli* около оперона *glnHPQ*, который кодирует компоненты транспортной системы глутамина, ген *rhtA* идентичен ORF1 (ген *ubiF*, номера нуклеотидов с 764 по 1651 в последовательности с инвентарным номером AAA218541 в базе данных GenBank, gi:440181), расположен между генами *rexB* и *otrX*. 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 17<sup>th</sup> 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).

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),  $\gamma$ -метиллизном,  $\alpha$ -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* AJ1442 (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, Министерство Международной Торговли и Промышленности (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry), в настоящее время называющийся Национальный Институт Прогрессивной Промышленной Науки и Технологии, Международный Депозитарий Организмов для Целей Патентования, Централ 6, 1-1, Хигаши 1-Чоме, Тсукуба-ши, Ибараки-кен, 305-8566, Япония (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan), 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 ВР-5252 (патент США 5827698).

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-лизин, согласно настоящему изобретению также включают штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L-лизина. Примеры ферментов, вовлеченных в биосинтез L-лизина, включают, но не ограничиваются ими, дигидродипиколинатсинтазу (dapA), аспартокиназу (lysC), дигидродипиколинатредуктазу (dapB), диаминопимелатдекарбоксилазу (lysA), диаминопимелатдегидрогеназу (ddh) (патент США 6040160), фосфоенолпируваткарбоксилазу (ppc), аспартатсемиальдегиддегидрогеназу (asd), никотинамидадениндинуклеотидтрансгидрогеназу (pntAB) и аспартазу (aspA) (европейская заявка EP 1253195 A). Кроме того, родительские штаммы могут иметь повышенный уровень экспрессии гена, вовлеченного в процесс дыхания (cyo) (европейская заявка EP 1170376 A), гена, кодирующего никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназу (pntAB) (патент США 5830716), гена *ubjE* (заявка PCT W02005/073390), 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 5827698) и малатдегидрогеназу (заявка PCT WO 2005/010175).

Бактерия-продуцент L-гомосерина

Примеры бактерий-продуцентов L-гомосерина, принадлежащих к роду *Escherichia*, включают штамм NZ10 (thrB). Этот штамм был получен из известного штамма C600 (thrB, leuB) (Appleyard R.K., Genetics, 39, 440-452 (1954)) как *Leu*<sup>+</sup> ревертант. Предпочтительно использование штамма NZ10, трансформированного плазмидой, содержащей ген *thrA*, кодирующий аспартокиназу-гомосериндегидрогеназу I.

За счет дополнительной копии гена *rhtB* бактерия становится более устойчивой к L-гомосерину и продуцирует больше L-гомосерина, L-треонина, L-аланина, L-валина и L-изолейцина (Европейская патентная заявка EP 994190 A2). За счет дополнительной копии гена *rhtC* бактерия становится более устойчивой к L-гомосерину и к L-треонину и продуцирует больше L-гомосерина, L-треонина и L-лейцина (Европейская патентная заявка EP 1013765 A1).

В качестве альтернативы может использоваться штамм *E. coli* 44, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ(ВКРМ)) с инвентарным номером В-2175.

Бактерия-продуцент L-метионина

Примеры бактерий-продуцентов L-метионина, принадлежащих к роду *Escherichia*, включают такие бактерии, как AJ1539 (NRRL В-12399), AJ1540 (NRRL В-12400), AJ 1541 (NRRL В-12401), AJ 11 542 (NRRL В-12402) (GB2075055), также используются штамм 218 (ВКРМ В-8125) (EP1239041) или подобные ему.

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. К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, а также различные органические кислоты. В зависимости от характера ассимиляции используемого микроорганизма могут использоваться спирты, такие как этанол и глицерин. В качестве источника азота могут использоваться различные неорганические соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, другие соединения азота, такие как амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, 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.

Краткое описание рисунков

На Фиг.1 изображены относительные положения праймеров yahNL и yahNR на плазмиде pACYC177, используемой для ПЦР-амплификации гена kan.

На Фиг.2 изображено конструирование фрагмента хромосомной ДНК, содержащего инактивированный ген yahN.

Примеры

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

Пример 1. Конструирование штамма с инактивированным геном yahN

1. Делеция гена yahN

Штамм, содержащий делецию гена yahN, 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 процедурой были сконструированы праймеры yahNL (SEQ ID NO: 3) и yahNR, гомологичные областям, прилегающим к гену yahN, и к гену в составе плазмиды-матрицы, придающему устойчивость к антибиотику. В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиду pACYC177 (GenBank/EMBL, инвентарный номер X06402). Использовали 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; последующие 25 циклов: 30 сек при 95°C, 30 сек при 54°C, 40 сек при 72°C; заключительная полимеризация: 5 мин при 72°C.

5 Полученный ПЦР-продукт длиной 1 т.п.н. (Фиг.1), очищенный в агарозном геле, был 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):6640-6645) содержит ДНК-фрагмент фага  $\lambda$  длиной 2154 п.н. (позиции с 31088 по 33241 нуклеотидной последовательности с инвентарным номером J02459 в базе данных GenBank), а также содержит гены  $\lambda$  Red-гомологичной системы рекомбинации (гены  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ о) под контролем промотора  $P_{\text{araB}}$ , индуцируемого арабинозой. Плазида pKD46 необходима для интеграции продукта ПЦР в хромосому штамма MG1655. Штамм *E. coli* BW25113, содержащий рекомбинантную плазмиду pKD46, может быть получен в *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, USA, инвентарный номер-CGSC7630.

Полученный фрагмент ДНК использовали для электропорации и Red-зависимой интеграции в бактериальную хромосому *E. coli* MG1655/pKD46.

20 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), 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 25 растили с перемешиванием при 30°C до достижения  $OD_{600} \approx 0.6$ , после чего делали клетки электрокомпетентными, путем концентрирования в 100 раз и трехкратного отмывания ледяной деионизированной  $H_2O$ . Электропорацию проводили с использованием 70 мкл клеток и  $\approx 100$  нг ПЦР-продукта. После электропорации 30 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 20 мкг/мл канамицина, и выращивали при 37°C для отбора  $Km^R$ -рекомбинантов. Колонии, выросшие за 24 ч, 35 тестировали на присутствие маркера  $Km^R$  вместо нативного гена *yahN*. Один из удовлетворяющих этому условию штаммов был излечен от термочувствительной плазмиды pKD46 культивированием при 37°C, и полученный штамм был назван *E. coli* MG1655 $\Delta$ yahN.

## 2. Подтверждение делеции гена *yahN*с помощью ПЦР.

40 Мутанты с делегированным геном *yahN*, содержащие ген устойчивости *Km*, были проверены с помощью ПЦР. Локус-специфичные праймеры *yahN* 1 (SEQ ID NO: 5) и *yahN* 2 (SEQ ID NO: 6) были использованы для проверки делеции с помощью ПЦР. Для этого свежесыведенные колонии суспендировали в 20 мкл воды и затем 1 мкл 45 полученной суспензии использовали для 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: 5 мин при 72°C. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток родительского 50 штамма *yahN*<sup>+</sup> MG1655, составляет 1060 п.н. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток мутантного штамма MG1655  $\Delta$ yahN::kan, составляет 1370 п.н. (Фиг.2).

Пример 2. Продукция L-треонина штаммом *E. coli* MG1655 $\Delta$ tdh::rhtA. $\Delta$ yahN

(pVIC40).

Для оценки влияния инактивации гена *yahN* на продукцию треонина был сконструирован штамм *E. coli* MG1655Δ*tdh::rhtA*, Δ*yahN* (pVIC40), конструирование осуществили следующим образом:

Во-первых, сконструировали штамм *E. coli* MG1655 Δ*tdh::rhtA*\* (pVIC40).

Штамм-продуцент L-треонина *E. coli* MG1655 Δ*tdh*, *rhtA*\* (pVIC40) был сконструирован путем инактивации нативного гена *tdh* в *E. coli* MG1655 с использованием гена *cat* с последующим введением мутации *rhtA23*, которая придает устойчивость к высоким концентрациям треонина (>40 мг/мл) и гомосерина (>5 мг/мл). Затем полученный штамм был трансформирован плазмидой pVIC40 из *E. coli* VKPM В-3996. Плазида pVIC40 детально описана в патенте США 5705371.

Для замены нативного гена *tdh* фрагмент ДНК, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу ( $Cm^R$ ), кодируемый геном *cat*, был интегрирован в хромосому *E. coli* MG1655 (ATCC 700926) вместо нативного гена методом, описанным Datsenko K.A. and Wanner B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645), называемым также "Red-зависимая интеграция", как описано в Примере 1.

Фрагмент ДНК, содержащий маркер  $Cm^R$  кодируемый геном *cat*, был получен методом ПЦР с использованием коммерчески доступной плазмиды pACYC184 (GenBank/EMBL, инвентарный номер X06403, "Fermentas", Lithuania) в качестве матрицы и праймеров *tdhL* (SEQ ID NO: 7) и *tdhR* (SEQ ID NO: 8). Праймер *tdhL* содержит 35 нуклеотидов, гомологичных 5'-области гена *tdh*, введенных в праймер для последующей интеграции в бактериальную хромосому. Праймер *tdhR* содержит 32 нуклеотида, гомологичных 3'-области гена *tdh*, введенных в праймер для последующей интеграции в бактериальную хромосому.

ПЦР проводили с использованием амплификатора "Gene Amp PCR System 2700" (Applied Biosystems). Реакционная смесь (общий объем - 50 мкл) состояла из 5 мкл 10× ПЦР-буфера с 25 mM  $MgCl_2$  ("Fermentas", Lithuania), по 200 мкМ каждого dNTP, 25 пкМ каждого используемого праймера и 1 Ед Taq-полимеразы ("Fermentas", Lithuania). В реакционную смесь добавляли приблизительно 5 нг плазмидной ДНК в качестве матрицы для амплификации ПЦР. Использовался следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; профиль для 25 циклов: 30 сек при 95°C, отжиг - 30 сек при 54°C, элонгация 40 сек при 72°C; заключительная элонгация: 5 мин при 72°C. Затем амплифицированный фрагмент ДНК очищали с использованием электрофореза в агарозном геле, экстрагировали с использованием "GenElute Spin Columns" (Sigma, USA) и осаждали этанолом.

Полученный фрагмент ДНК использовали для электропорации и Red-зависимой интеграции в бактериальную хромосому *E. coli* MG1655/pKD46.

MG1655/pKD46 выращивали в течение ночи при 30°C в жидкой LB-среде с добавлением ампициллина (100 мкг/мл), затем разводили 1:100 средой SOB (Дрожжевой экстракт, 5 г/л; NaCl, 0.5 г/л; Триптон, 20 г/л; KCl, 2.5 мМ;  $MgCl_2$ , 10 мМ) с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и L-арабинозы (10 мМ) (арабиноза используется для индукции плазмиды, содержащей гены Red системы) и выращивали при 30°C до достижения оптической плотности бактериальной культуры  $OD_{600}=0.4-0.7$ . Выросшие клетки из 10 мл бактериальной культуры трижды отмывали ледяной деионизованной водой, после чего суспендировали в 100 мкл воды. 10 мкл раствора фрагмента ДНК (100 нг) в деионизованной воде добавляли к суспензии клеток.

Электропорацию проводили с использованием электропоратора "Bio-Rad" (USA) (No. 165-2098, version 2-89) согласно инструкции производителя. После электропорации

клетки добавляли к 1 мл среды SOC (Sambrook et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), инкубировали 2 часа при 37°C и затем высевали на L-агар, содержащий 25 мкг/мл хлорамфеникола.

5 Выросшие в течение 24 ч колонии тестировали на присутствие маркера Cm<sup>R</sup> вместо нативного гена *tdh* методом ПЦР с использованием праймеров *tdh1* (SEQ ID NO: 9) и *tdh2* (SEQ ID NO: 10). С этой целью свежeweделенные колонии суспендировали в 20 мкл воды, затем 1 мкл полученной суспензии использовали для ПЦР. Использовался следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: начальная денатурация 10 при 95°C в течение 5 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 95°C, отжиг - 30 сек при 55°C, элонгация 30 сек при 72°C; заключительная элонгация: 5 мин при 72°C.

Несколько проверенных Cm<sup>R</sup> клонов содержали нужный фрагмент ДНК длиной 1104 п.н., подтверждая присутствие ДНК маркера Cm<sup>R</sup> вместо фрагмента длиной 1242 п.н., 15 содержащего ген *tdh*. Один из полученных штаммов был излечен от термочувствительной плазмиды pKD46 культивированием при 37°C, и полученный штамм был назван *E. coli* MG1655Δ*tdh*.

Затем в полученный штамм MG1655 Δ*tdh* была введена мутация *rhtA23* из штамма VL614*rhtA23* (Livshits V.A. et al., 2003, Res. Microbiol., 154:123-135), в результате 20 получили штамм MG1655 Δ*tdh*, *rhtA*\*. Мутация *rhtA23* придает устойчивость к высоким концентрациям треонина (>40 мг/мл) и гомосерина (>5 мг/мл). С этой целью штамм MG1655 Δ*tdh* инфицировали фагом P1<sub>vir</sub>, выросшим на донорном штамме VL614*rhtA23*. Трансдуктанты отбирали на минимальной среде M9, 25 содержащей 8 мг/мл гомосерина и 0.4% глюкозы в качестве единственного источника углерода.

Фрагменты ДНК хромосомы вышеописанного штамма *E. coli* MG1655Δ*yahN*::*kan* переносили в штамм-продуцент треонина *E. coli* MG1655Δ*tdh*::*rhtA* методом P1 трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. 30 Press, Plainview, NY). В результате был получен штамм MG1655Δ*tdh*::*rhtA*,Δ*yahN*.

Штамм MG1655Δ*tdh*::*rhtA*, Δ*yahN* и родительский штамм MG1655Δ*tdh*::*rhtA* трансформировали плазмидой pVIC40 и культивировали при 37°C в течение 18 ч в питательном бульоне, по 0.3 мл полученных культур инокулировали в 3 мл среды для 35 ферментации указанного ниже состава в пробирках 20×200 мм и культивировали при 37°C в течение 24 ч на роторной качалке.

Состав среды для ферментации, г/л:

40	Глюкоза	40
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SCO <sub>4</sub>	16
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0
	MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
45	Тиамингидрохлорид	0.002
	Дрожжевой экстракт	2.0
	L-изолейцин	0.01
	CaCO <sub>3</sub>	33

50 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и CaCO<sub>3</sub> стерилизовали по отдельности.

После выращивания количество накопленного в среде L-треонина определяли с помощью бумажной хроматографии с использованием подвижной фазы следующего состава: бутанол: уксусная кислота: вода = 4:1:1 (v/v). Для визуализации использовали

раствор (2%) нингидрина в ацетоне. Пятно, содержащее L-треонин, вырезали; L-треонин элюировали 0.5% водным раствором CdCl<sub>2</sub>, после чего оценивали количество L-треонина спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Результаты 20 независимых пробирочных ферментации приведены в Таблице 1. Как следует из Таблицы 1, штамм MG1655Δtdh::rhtA,ΔyahN (pVIC40) накапливал большее количество L-треонина по сравнению со штаммом MG1655Δtdh::rhtA (pVIC40).

Пример 3. Продукция L-лизина штаммом *E. coli* WC196(pCABD2) ΔyahN.

Для оценки влияния инактивации гена yahN на продукцию лизина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔyahN::kan могут быть перенесены в штамм-продуцент L-лизина *E. coli* WC196 (pCABD2) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). 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 6040160).

Оба штамма *E. coli*, WC 196(pCABD2) и WC 196(pCABD2) ΔyahN:kan, 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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01
Дрожжевой экстракт	2.0

pH доводят до 7.0 с помощью KOH, и среду автоклавируют при 115°C в течение 10 мин. Глюкозу и MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O стерилизуют отдельно. Также добавляют CaCO<sub>3</sub> до концентрации 30 г/л, предварительно простерилизованного сухим жаром при 180°C в течение 2 часов.

Пример 4. Продукция L-метионина штаммом *E. coli* 218-ΔyahN.

Для оценки влияния инактивации гена yahN на продукцию L-метионина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔyahN::kan могут быть перенесены в штамм-продуцент L-метионина *E. coli* 218 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).

Оба штамма *E. coli*, 218 и 218-ΔyahN, могут быть выращены со встряхиванием при 32°C в течение 18 ч в 3 мл питательного бульона, и по 0.3 мл полученных культур

может быть инокулировано в 2 мл среды для ферментации в пробирках 20×200-мм с дальнейшим культивированием при 32°C в течение 72 ч на роторной качалке.

Количество накопленного в среде метионина может быть определено с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). Состав жидкой фазы для TLC следующий:

5 изопропанол - 80 мл, этилацетат - 80 мл, NH<sub>4</sub>OH (30%) - 15 мл, H<sub>2</sub>O - 45 мл.

Состав среды для ферментации, г/л:

Глюкоза	40.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0
Тиамин	0.1
L-треонин	0.5
CaCO <sub>3</sub>	20.0

15 Глюкоза и CaCO<sub>3</sub> стерилизуются отдельно.

Пример 5. Продукция гомосерина штаммом *E. coli* 44-ΔyahN.

Для оценки влияния инактивации гена yahN на продукцию гомосерина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔyahN::kan могут быть перенесены в штамм-продуцент гомосерина *E. coli* 44 с помощью P1-трандукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).

25 Оба штамма *E. coli*, 44 и 44-ΔyahN, могут быть выращены и количество накопленного в среде гомосерина может быть определено, как описано в Примере 2.

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.

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

Штамм	OD <sub>540</sub>	Количество L-треонина, г/л
35 MG1655Δtdh::rhtA(pVIC40)	30.4±0.6	7.0±0.4
MG 1655Δtdh::rhtA,ΔyahN(pVIC40)	29.4±0.9	7.9±0.5

### Формула изобретения

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

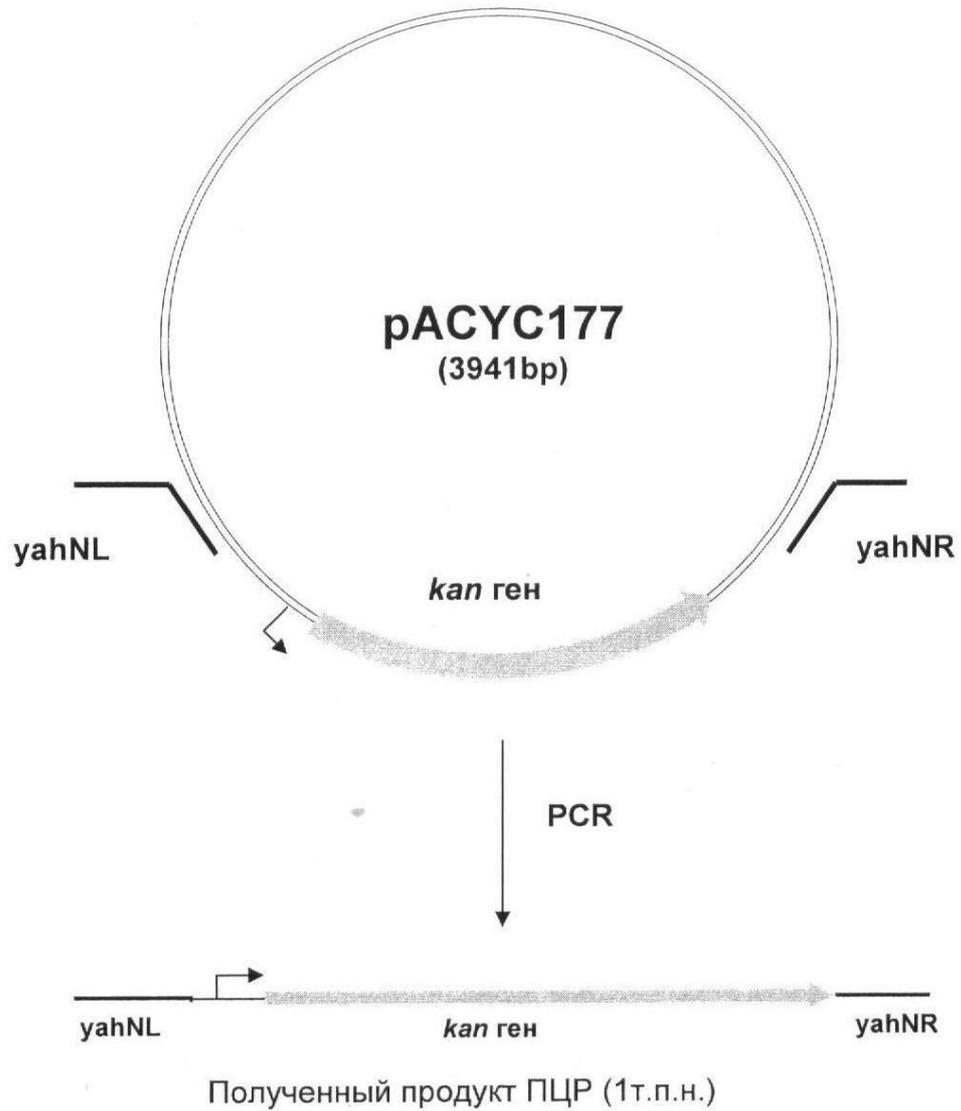
2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанный ген yahN инактивирован за счет делеции гена yahN в хромосоме бактерии.

3. Способ получения L-треонина, включающий:

45 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.

50

Относительные положения праймеров yahNL и yahNR на плазмиде pACYC177



Фиг.1