



(51) МПК  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 13/04* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01)

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

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: **2007128314/13, 24.07.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**24.07.2007**

(43) Дата публикации заявки: **27.01.2009**

(45) Опубликовано: **10.08.2010** Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: **US 6040160, 21.03.2000. RU 2229513 C2,  
 27.05.2004. SU 1694643 A1, 30.11.1991.**

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

**Самсонов Валерий Васильевич (RU),  
 Горбачёва Любовь Юрьевна (RU),  
 Ахвердян Валерий Завенович (RU),  
 Ворошилова Эльвира Борисовна (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 *uncD***

(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 *uncD* в указанной бактерии инактивирован. Изобретение позволяет получать L-треонин с высокой степенью эффективности. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 13/04* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007128314/13, 24.07.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**24.07.2007**

(43) Application published: **27.01.2009**

(45) Date of publication: **10.08.2010 Bull. 22**

Mail address:  
**117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, k.1, ZAO  
"NII Adzhinomoto-Genetika" (ZAO AGRI), V.M.  
Belkovu**

(72) Inventor(s):

**Samsonov Valerij Vasil'evich (RU),  
Gorbacheva Ljubov' Jur'evna (RU),  
Akhverdjan Valerij Zavenovich (RU),  
Voroshilova Ehl'vira Borisovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR OBTAINING L-THREONINE USING Escherichia GENUS BACTERIA IN WHICH yncD GENE IS INACTIVATED**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and is a method of obtaining L-threonine using Escherichia genus bacteria, modified in such a way

that the yncD gene in the said bacteria is inactive.

EFFECT: invention enables highly efficient production of L-threonine.

3 cl, 2 dwg, 2 tbl, 11 ex

R U 2 3 9 6 3 3 7 C 2

R U 2 3 9 6 3 3 7 C 2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

### Описание изобретения

#### Область техники

5

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

10

#### Описание предшествующего уровня техники

15

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.

20

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).

25

30

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.

35

40

Белок *UncD* не охарактеризован. По сходству последовательностей можно предположить, что это рецептор внешней мембраны, член семейства рецепторов внешней мембраны (Outer Membrane Receptor (OMR)), вовлеченный в транспорт железа (Zhai Y. and Saier M.H./Protein Sci;11(9);2196-207 (2002)).

45

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

50

Описание изобретения

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

10 Вышеупомянутые цели были достигнуты путем установления того факта, что ослабление экспрессии гена *uncD* 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.

15 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.

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

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

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

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

40 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.

45 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.

50 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.

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

- выращивание описанной выше бактерии в питательной среде, и
- 10 - 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.

### Наилучший способ осуществления настоящего изобретения

#### 1. Бактерия согласно настоящему изобретению

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

40 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.

45 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* К-12, и, предпочтительно означает, что указанный микроорганизм способен

накапливать в среде целевую L-аминокислоту в количестве не менее, чем 0.5 г/л, более предпочтительно, не менее, чем 1.0 г/л. Термин «L-аминокислота» включает в себя L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновую кислоту, L-цистеин, L-глутаминовую кислоту, L-глутамин, L-глицин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин.

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

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

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

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

Термин «бактерия, принадлежащая к роду *Pantoea*» означает, что бактерия относится к роду *Pantoea* в соответствии с классификацией, известной специалисту в

области микробиологии. Недавно несколько видов *Enterobacter agglomerans* были классифицированы как *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* или подобные им, на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рПНК и т.д. (Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993)).

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

Термин «инактивация гена *uncD*» 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, контролирующие экспрессию гена, такие как промоторы, энхансеры, аттенуаторы, и т.д.

Ген *uncD* (синонимы: *ECK1445*, *b1451*) кодирует белок YncD (синоним B1451). Ген *uncD* (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 1,518,987 по 1,521,089 в последовательности с инвентарным номером NC\_000913.2 в базе данных GenBank; gi: 49175990) расположен между открытой рамкой считывания *uncC* и открытой рамкой считывания *uncE* на хромосоме штамма *E. coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *uncD* и аминокислотная последовательность YncD, кодируемого геном *uncD*, 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 семейства *Enterobacteriaceae* возможны некоторые вариации в нуклеотидных последовательностях, понятие инактивируемого гена *uncD* 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. Следовательно, вариант белка, кодируемого геном *uncD*, может иметь гомологию не менее 80 %, предпочтительно не менее 90%, более 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 YncD.

Следовательно, ген *uncD* 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 YncD. «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  $1 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS, предпочтительно  $0.1 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS, при 60°C. Продолжительность отмывки зависит от типа используемой для блоттинга мембраны и, как правило, такова, как рекомендовано производителем. Например, рекомендуемая продолжительность отмывки для нейлоновой мембраны Hybond™ N+ (Amersham) при строгих условиях – 15 минут. Предпочтительна двух- трехкратная отмывка. Длина зонда может быть выбрана в зависимости от условий гибридизации, в данном конкретном случае она может быть около 100-1000 п.н.

Гомология между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием известных методов, например, компьютерной программы BLAST 2.0.

Экспрессия гена *uncD* может быть ослаблена введением мутаций в ген на хромосоме, в результате чего внутриклеточное количество кодируемого геном белка YncD снижено по сравнению с немодифицированным штаммом. Такой мутацией гена может быть вставка гена устойчивости к антибиотику, или делеция гена или его части (Qiu, Z. and Goodman, M.F., J. Biol. Chem., 272, 8611-8617 (1997); Kwon, D. H. et al, J. Antimicrob. Chemother., 46, 793-796 (2000)). Экспрессия гена *uncD* также может быть ослаблена модификацией экспрессии регуляторных последовательностей, таких как промотор, последовательность Shine-Dalgarno (SD) и т.д. (заявка PCT WO95/34672; Carrier, T.A. and Keasling, J.D., Biotechnol Prog 15, 58-64 (1999)).

Например, следующие методы могут применяться для введения мутаций путем генной рекомбинации. Конструируется мутантный ген, кодирующий мутантный белок со сниженной активностью, и бактерия для ее модификации трансформируется фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме



замещается гомологичной рекомбинацией мутантным геном, отбирается полученный штамм. Такое замещение гена с использованием гомологичной рекомбинации может быть проведено методом с использованием линейной ДНК, известный как “Red-зависимая интеграция” или “интеграция посредством Red-системы” (Datsenko, K.A., Wanner, B.L., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 97, 12, 6640-6645(2000), заявка PCT WO 2005/010175) или методом 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 путем замещения гена с использованием вышеупомянутой гомологичной рекомбинации может также быть осуществлено с использованием плазмиды с пониженной способностью к репликации в клетке хозяина.

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

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

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

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

Бактерия-продуцент L-аминокислоты

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

Бактерия согласно настоящему изобретению может быть получена путем ослабления экспрессии гена *uncD* 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 *uncD* 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<sub>R</sub>-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 аспартатаминотрансферазу (аспартаттрансаминазу).

Нуклеотидная последовательность гена *thrA*, кодирующего аспартокиназа-гомосериндегидрогеназу I из *Escherichia coli*, известна (номера нуклеотидов с 337 по 2799 в последовательности с инвентарным номером NC\_000913.2 в базе данных GenBank, gi: 49175990). Ген *thrA* расположен на хромосоме штамма *E. coli* К-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* К-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* К-12 между геном *thrB* и открытой рамкой считывания *yaaX*. Все три указанных гена функционируют как один треониновый оперон. Для усиления экспрессии треонинового оперона желательно удалить из оперона область аттенюатора, который влияет на транскрипцию (заявка РСТ WO2005/049808, заявка РСТ WO2003/097839).

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

Ген *rhtA* расположен на 18 минуте хромосомы *E. coli* около оперона *glnHPQ*, который кодирует компоненты транспортной системы глутамина, ген *rhtA* идентичен ORF1 (ген *ybiF*, номера нуклеотидов с 764 по 1651 в последовательности с инвентарным номером AAA218541 в базе данных GenBank, gi:440181), расположен между генами *pexB* и *ompX*. Участок ДНК, экспрессирующийся с образованием белка, кодируемого рамкой считывания ORF1, был назван геном *rhtA* (*rht*: resistance to homoserine and threonine). Также было показано, что мутация *rhtA23* представляет собой замену А-на-Г в положении -1 по отношению к старт кодону ATG (тезисы 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* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; смотри патент США 4346170) и штамм *Escherichia coli* VL611. В этих микроорганизмах аспартокиназа устойчива к ингибированию L-лизинном 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 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 (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 *ybjE* (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 сверхэкспрессированные гены, кодирующие белок, способный к секреции соединений, токсичных для клетки (патент США 5972663); штаммы *E. coli*, содержащие цистеиндесульфогидразу со сниженной активностью (патент Японии JP11155571A2); штамм *E. coli* W3110 с повышенной активностью позитивного транскрипционного регулятора цистеинового регулона, кодируемого геном *cysB* (международная заявка PCT 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 ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штаммы *E. coli*, устойчивые к аналогам лейцина, включающих, например,  $\beta$ -2-тиенилаланин, 3-гидроксилейцин, 4-азалейцин и 5,5,5-трифлуоролейцин (выложенные патентные заявки

Японии 62-34397 и 8-70879), штаммы *E. coli*, полученные с помощью генно-инженерных методов, описанных в заявке РСТ 96/06926; *E. coli* штамм Н-9068 (JP8-70879А), и подобные им.

5  
10  
15  
20  
Бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, вовлеченных в биосинтез L-лейцина. Примеры таких генов включают в себя гены оперона *leuABCD*, и предпочтительно представлены мутантным геном *leuA*, кодирующим изопропилмалатсинтазу со снятым ингибированием L-лейцином по типу обратной связи (патент США 6403342). Кроме того, бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, кодирующих белки, которые экспортируют L-аминокислоту из бактериальной клетки. Примеры таких генов включают в себя гены b2682 и b2683 (гены *ugaZH*) (европейская заявка EP 1239041 A2).

#### Бактерия-продуцент L-гистидина

25  
30  
35  
Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-гистидина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются бактериями-продуцентами L-гистидина, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* 24 (ВКПМ В-5945, патент РФ 2003677); штамм *E. coli* 80 (ВКПМ В-7270, патент РФ 2119536); штаммы *E. coli* NRRL В-12116 – В12121 (патент США 4388405); штаммы *E. coli* Н-9342 (FERM ВР-6675) и Н-9343 (FERM ВР-6676) (патент США 6344347); штамм *E. coli* Н-9341 (FERM ВР-6674) (Европейский патент 1085087); штамм *E. coli* А180/pFM201 (патент США 6258554) и подобными им.

40  
45  
50  
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).

5 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-  
10 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  
15 РФ. 2119536), и т.д.

#### Бактерия-продуцент L-глутаминовой кислоты

20 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* VL334 *thrC*<sup>+</sup> (Европейский патент EP 1172433). Штамм *E. coli* VL334  
25 (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  
30 получен штамм, ауксотроф по L-изолейцину, VL334*thrC*<sup>+</sup> (ВКПМ В-8961), который обладает способностью к продукции L-глутаминовой кислоты.

35 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.  
40 Примеры таких ферментов включают глутаматдегидрогеназу (*gdh*), глутаминсинтетазу (*glnA*), глутаматсинтетазу (*gltAB*), изоцитратдегидрогеназу (*icdA*), аконитатгидратазу (*acnA*, *acnB*), цитратсинтазу (*gltA*), фосфоенолпируваткарбоксилазу (*ppc*),  
45 пируватдегидрогеназу (*aceEF*, *lpdA*), пируваткиназу (*pykA*, *pykF*), фосфоенолпируватсинтазу (*ppsA*), енолазу (*eno*), фосфоглицеромутазу (*pgmA*, *pgmI*), фосфоглицераткиназу (*pgk*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*gapA*),  
50 триозофосфатизомеразу (*tpiA*), фруктозобифосфатальдолазу (*fbp*), фосфофруктокиназу (*pfkA*, *pfkB*) и глюкозофосфатизомеразу (*pgi*).



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

Примеры штаммов, модифицированных таким образом, что экспрессия генов цитратсинтетазы и/или гена фосфоенолпируваткарбоксилазы ослаблена(-ы), и/или дефицитные по активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, 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,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназу, фосфотрансацетилазу, ацетаткиназу, синтазу ацетогидроксикислот, ацетолактатсинтазу, форматацетилтрансферазу, лактатдегидрогеназу и глутаматдекарбоксилазу. Бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, лишенные активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы или обладающие сниженной активностью  $\alpha$ -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<sup>R</sup>

*E. coli* AJ12624 (FERM BP-3853)

*E. coli* AJ12628 (FERM BP-3854)

*E. coli* AJ12949 (FERM BP-4881)

*E. coli* W3110sucA::Km<sup>R</sup> – это штамм, полученный в результате разрушения гена  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы (далее называемого “ген *sucA*”) в штамме *E. coli* W3110. У этого штамма активность  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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.

5 Примеры бактерии-продуцента L-глутаминовой кислоты включают в себя мутантные штаммы, принадлежащие к роду *Pantoea*, которые лишены активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы или имеют сниженную активность  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, и могут быть получены описанным выше способом.

10 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, Агентство Промышленной

15 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

20 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

25 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

30 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  $\alpha$ -KGDH активности в результате разрушения гена  $\alpha$ KGDH-E1 субъединицы (*sucA*). Вышеупомянутый штамм

35 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

40 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*.

#### 45 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

50 AJ12739 (*tyrA::Tn10*, *tyrR*) (ВКМП В-8197); штамм HW1089 (ATCC-55371),

содержащий ген *pheA34* (патент США 5354672); мутантный штамм MWEC101-b (KR8903681); штаммы NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 и NRRL B-12147 (патент США 4407952) и пободные им. Также в качестве родительских штаммов могут  
5 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, pASMAВ], названный как AJ12604 (FERM BP-3579) (Европейский патент EP488424B1). Кроме того, также могут быть использованы бактерии-продуценты L-  
10 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  
25 ограничиваются бактериями-продуцентами L-триптофана, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штаммы *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) и JP6015/pMU91 (DSM10123), лишенные активности триптофанил-ТФНК синтетазы, кодируемой мутантным геном *trpS* (патент США 5756345); штамм *E. coli* SV164 (pGH5),  
30 содержащий аллель *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, не ингибируемую серином по типу обратной связи и аллель *trpE*, кодирующий антранилатсинтазу, не ингибируемую триптофаном по типу обратной связи (патент США 6180373); штаммы  
35 *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) и AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), в которых отсутствует активность триптофаназы (патент США 4371614); штамм *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, в котором усилена способность к синтезу  
40 фосфоенолпирувата (заявка PCT WO9708333, 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  
45 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  
50 штаммы, в которых увеличена активность одного или нескольких ферментов, выбранных из группы, состоящей из антранилатсинтазы, фосфоглицератдегидрогеназы,

и триптофансинтазы. И антранилатсинтаза, и фосфоглицератдегидрогеназа подвержены ингибированию L-триптофаном и L-серином по типу обратной связи, так что в эти ферменты могут быть введены мутации, снижающие чувствительность к ингибированию по типу обратной связи. Специфические примеры штаммов с такой мутацией включают *E. coli* SV164, антранилатсинтаза которой не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи, и штамм-трансформант, полученный введением в *E. coli* SV164 плазмиды pGH5 (заявка РСТ WO 94/08031), которая содержит мутантный ген *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, которая не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-производителя 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  $\alpha$  и  $\beta$ , 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-производитель L-пролина

Примеры бактерий-производителей 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-производителей L-пролина, включают ген *proB*, кодирующий глутаматкиназу с десенсibilizированной регуляцией L-пролином по типу обратной связи (патент Германии 3127361). Кроме того, бактерия согласно настоящему изобретению может быть улучшена путем усиления экспрессии одного или нескольких генов, кодирующих белки, секретирующие L-аминокислоту из бактериальной клетки.

Примерами таких генов являются гены b2682 и b2683 (*ygaZH* гены) (Европейская патентная заявка EP1239041A2).

5 Примеры бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и обладающих способностью к продукции L-пролина, включают следующие штаммы *E. coli*: NRRL B-12403 и NRRL B-12404 (патент Великобритании GB 2075056), ВКПМ В-8012 (патентная заявка РФ 2000124295), плазмидные мутанты, описанные в патенте 10 Германии DE 3127361, плазмидные мутанты, описанные у Bloom F.R. et al (The 15<sup>th</sup> Miami winter symposium, 1983, p.34), и подобные им.

#### 15 Бактерия-производитель L-аргинина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-производителя 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, 20 содержащие мутантную N-ацетилглутаматсинтазу (патентная заявка РФ 2001112869), штамм *E. coli* 382 (ВКПМ В-7926) (Европейская патентная заявка EP1170358A1), штамм-производитель аргинина, в который введен ген *argA*, кодирующий N-ацетилглутаматсинтазу (Европейская патентная заявка EP1170361A1), и подобные им.

30 Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-производителя 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. 35 включают N-ацетилглутамилфосфатредуктазу (*argC*), орнитинацетилтрансферазу (*argJ*), N-ацетилглутаматкиназу (*argB*), ацетилорнитинтрансминазу (*argD*), орнитинкарбамоилтрансферазу (*argF*), синтазу аргининсукциниловой кислоты (*argG*), 40 лиазу аргининсукциниловой кислоты (*argH*), и карбамоилфосфатсинтазу(*carAB*).

#### 45 Бактерия-производитель L-валина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-производителя L-валина, согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, штаммы, модифицированные с целью сверхэкспрессии оперона 50 *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.

5           Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактериипродуцента L-валина, согласно настоящему изобретению, также включают в себя мутантные штаммы, имеющие мутацию аминокил-тРНК-синтетазы ( патент США 10 5658766). Например, может использоваться штамм *E.coli* VL1970, который имеет мутацию в гене *ileS*, кодирующем изолейцин-тРНК-синтетазу. Штамм *E.coli* VL1970 депонирован в Российской Национальной Коллекции Промышленных 15 Микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 24 июня 1988 г. с инвентарным номером ВКПМ В-4411.

Далее, в качестве родительских штаммов также могут использоваться мутантные штаммы, для роста которых требуется липоевая кислота, и/или с недостаточным 20 количеством  $H^+$ -АТФазы ( заявка РСТ WO96/06926).

#### Бактерия-продуцент L-изолейцина

25           Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактериипродуцента 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, 30 такому как тиаизолейцин и гидроксамат изолейцина, и мутантные штаммы , дополнительно имеющие устойчивость к DL-этионину и/или гидроксамату аргинина (заявка Японии 5-130882А). Кроме того, в качестве родительских штаммов также могут 35 использоваться рекомбинантные штаммы, трансформированные генами, кодирующими белки, вовлеченные в биосинтез L-изолейцина, такие как треониндеаминаза и ацетогидроксатсинтаза ( заявка Японии 2-458А, патент Франции 0356739 и патент 40 США 5998178).

#### 2. Способ согласно настоящему изобретению.

45           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. 50

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  
5 продуцируется с использованием бактерии.

Питательная среда, используемая для выращивания, может быть как синтетической, так и натуральной, при условии, что указанная среда содержит  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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  
30 перемешивание культуральной жидкости на качалке, взбалтывание с аэрацией, при температуре в пределах от 20 до 40 °С, предпочтительно в пределах от 30 до 38 °С. рН среды поддерживают в пределах от 5 до 9, предпочтительно от 6.5 до 7.2. рН среды может регулироваться аммиаком, карбонатом кальция, различными кислотами,  
35 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  
40 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 P1 и P2 на  
50 плазмиде pMW118-attL-Cm-attR, используемой для ПЦР-амплификации гена *cat*.

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

5

### Примеры

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

10

#### Пример 1. Конструирование штамма с инактивированным геном *uncD*

##### 1. Делеция гена *uncD*

15

Штамм, содержащий делецию гена *uncD*, 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”. Фрагмент ДНК, содержащий маркер  $Cm^R$ , кодируемый геном *cat*, был получен методом ПЦР с использованием праймеров P1 (SEQ ID NO: 3) и P2 (SEQ ID NO: 4) и плазмиды pMW118-attL-Cm-attR в качестве матрицы (WO 05/010175). Праймер P1 содержит область, комплементарную 5'-области гена *uncD* и область, комплементарную области attR. Праймер P2 содержит область, комплементарную 3'-области гена *uncD* и область, комплементарную области attL. 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; и заключительная полимеризация: 5 мин при 72 °C.

20

25

30

35

40

45

Полученный ПЦР-продукт длиной 1699 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  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) под контролем промотора  $P_{araB}$ , индуцируемого арабинозой. Плазида pKD46 необходима для интеграции продукта ПЦР в хромосому штамма MG1655.

50

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 растили с перемешиванием при 30 °С до достижения  $OD_{600} \approx 0.6$ , после чего делали  
5 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 клетки  
10 инкубировали в 1 мл среды SOC (Sambrook et al, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) при 37 °С в течение 2.5 часов, после чего высевали на чашки с L-агаром, содержащим 30 мкг/мл  
15 хлорамфеникола и выращивали при 37 °С для отбора  $Sm^R$ -рекомбинантов. Затем для удаления плазмиды pKD46 проводили 2 пассажа на L-агаре с  $Sm$  при 42 °С, и полученные колонии проверяли на чувствительность к ампициллину.

## 20 2. Подтверждение делеции гена *uncD* с помощью ПЦР.

Мутанты с делетированным геном *uncD*, содержащие ген устойчивости  $Sm$ , были проверены с помощью ПЦР. Локус-специфичные праймеры P3 (SEQ ID NO: 5) и P4 (SEQ ID NO: 6) были использованы для проверки делеции с помощью ПЦР.  
25 Использовался следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: денатурация при 94 °С в течение 3 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 94 °С, 30 сек при 54 °С, 1 мин при 72 °С; заключительный шаг: 7 мин при 72 °С. Длина продукта ПЦР,  
30 полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток родительского штамма  $uncD^+$  MG1655, составляет  $\sim 2.5$  т.п.н. Длина продукта ПЦР, полученного в результате реакции с использованием в качестве матрицы клеток  
35 мутантного штамма, составляет  $\sim 2.1$  т.п.н.. Мутантный штамм был назван MG1655  $\Delta uncD::cat$ .

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

Для оценки влияния инактивации гена *uncD* на продукцию треонина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655  $\Delta uncD::cat$  перенесли в штамм-продуцент L-треонина *E. coli* В-3996 (ВКПМ В-3996) с помощью P1-  
45 трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма В-3996- $\Delta uncD$ . Штамм В-3996 был депонирован 19 ноября 1987 года во Всесоюзном научном центре антибиотиков  
50 (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-ΔuncD, выращивали в течение 18-24 часов при температуре 37 °С на чашках с L-агаром. Для получения посевной культуры указанные штаммы выращивали при 32 °С 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 вносили по 0.21 мл (10%) посевной культуры. Ферментацию проводили в 2 мл минимальной ферментационной среды в пробирках размером 20x200 мм. Клетки выращивали в течение 65 часов при 32°С с перемешиванием (250 об/мин).

После выращивания определяли 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 пяти независимых пробирочных ферментаций приведены в Таблице 1. Как следует из Таблицы 1, штамм В-3996-ΔuncD накапливал большее количество L-треонина по сравнению со штаммом В-3996.

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

Глюкоза	80.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22.0
NaCl	0.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.8
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.02
MnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.02
Тиамин гидрохлорид	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
CaCO <sub>3</sub>	30.0

Глюкозу и сульфат магния стерилизовали отдельно. CaCO<sub>3</sub> стерилизовали сухим жаром при 180 °С в течение 2 часов. pH доводили до 7.0. Антибиотик добавляли в среду после стерилизации.

Пример 3. Продукция L-лизина штаммом *E. coli* AJ11442- $\Delta$ uncD.

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

Оба штамма *E. coli*, AJ11442 и AJ11442- $\Delta$ uncD , могут быть выращены в L-среде, содержащей 20 мг/л стрептомицина, при 37 °С; 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 °С 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 °С 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 °С в течение 2 часов.

Пример 4. Продукция L-цистеина штаммом *E. coli* JM15(ydeD)- $\Delta$ uncD.

Для оценки влияния инактивации гена *uncD* на продукцию L-цистеина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655  $\Delta$ uncD::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-цистеина *E. coli* JM15(ydeD) с помощью P1-

трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма JM15(ydeD)-ΔyncD.

Штамм *E. coli* JM15(ydeD) является производным штамма *E. coli* JM15 (патент США 6218168), который может быть трансформирован ДНК, содержащей ген *ydeD*, кодирующий мембранный белок, не вовлеченный в пути биосинтеза ни одной из L-аминокислот (патент США 5972663). Штамм JM15 (CGSC# 5042) может быть получен в Коллекции Генетического Фонда Coli при Центре Генетических Ресурсов *E. coli* (The Coli Genetic Stock Collection at the *E. coli* Genetic Resource Center, MCD Biology Department, Yale University) (<http://cgsc.biology.yale.edu/>).

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

#### Пример 5. Продукция L-лейцина штаммом *E. coli* 57-ΔyncD.

Для оценки влияния инактивации гена *yncD* на продукцию L-лейцина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔyncD::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-лейцина *E. coli* 57 (ВКПМ В-7386, патент США 6124121) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма 57-pMW-ΔyncD. 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-ΔyncD, могут быть выращены в течение 18-24 часов при температуре 37 °С на чашках с L-агаром. Для получения посевной культуры указанные штаммы могут быть выращены на роторной качалке (250 об/мин) при 32°С 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%) посевного материала. 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°С 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 (рН 7.2) следующего состава (г/л):

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

Глюкозу и мел стерилизуют отдельно.

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

Для оценки влияния инактивации гена *uncD* на продукцию L-гистидина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 ΔuncD::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-гистидина *E. coli* 80 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма 80-ΔuncD. Штамм 80 описан в патенте РФ 2119536 и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1) 15 октября 1999 г. с инвентарным номером ВКПМ В-7270, затем 12 июля 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Оба штамма *E. coli*, 80 и 80-ΔuncD, могут быть выращены на L-бульоне при 29 °С в течение 6 часов. Затем по 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 °С 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.

Может быть использована ферментационная среда (pH 6.0) следующего состава (г/л):

Глюкоза	100.0
Мамено	0.2 общего азота
L-пролин	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0

	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>	0.01
5	Тиамин	0.001
	Бетаин	2.0
	CaCO <sub>3</sub>	60.0

10 Глюкозу, пролин, бетаин и CaCO<sub>3</sub> стерилизуют отдельно. pH доводят до 6.0 перед стерилизацией.

15 Пример 7. Продукция L-глутаминовой кислоты штаммом *E. coli* VL334thrC<sup>+</sup>-*ΔuncD*.

Для оценки влияния инактивации гена *uncD* на продукцию L-глутаминовой кислоты ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 *ΔuncD::cat* могут быть перенесены в штамм-продуцент L-глутаминовой кислоты *E. coli* VL334thrC<sup>+</sup> (EP 1172433) с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма VL334thrC<sup>+</sup>-*ΔuncD*. Штамм VL334thrC<sup>+</sup> депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия, 117545 Москва, 1-ый Дорожный проезд, 1) 6 декабря 2004 г. с инвентарным номером ВКПМ В-8961, затем 8 декабря 2004 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

Оба штамма, VL334thrC<sup>+</sup> и VL334thrC<sup>+</sup>-*ΔuncD*, могут быть выращены на чашках с L-агаром при 37 °С в течение 18-24 часов. Далее, одна петля клеток может быть перенесена в пробирки, содержащие 2 мл ферментационной среды. Ферментационная среда может содержать глюкозу - 60 г/л, сульфат аммония - 25 г/л, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> - 2 г/л, MgSO<sub>4</sub> - 1 г/л, тиамин - 0.1 мг/мл, L-изолейцин - 70 мкг/мл и мел - 25 г/л (pH 7.2). Глюкозу и мел стерилизуют отдельно. Выращивание может производиться при 30 °С 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% CdCl<sub>2</sub>.

50

Пример 8. Продукция L-фенилаланина штаммом *E. coli* AJ12739- $\Delta$ uncD.

Для оценки влияния инактивации гена *uncD* на продукцию L-фенилаланина ДНК-фрагменты хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655  $\Delta$ uncD::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-фенилаланина *E. coli* AJ12739 с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма AJ12739- $\Delta$ uncD . Штамм AJ12739 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1<sup>ый</sup> 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 и AJ12739- $\Delta$ uncD, могут быть выращены при 37 °С 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 °С 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.

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

Глюкоза	40.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
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
Тиамин HCl	0.0002
Дрожжевой экстракт	2.0
Тирозин	0.125

CaCO<sub>3</sub>

20.0

Глюкозу и сульфат магния стерилизуют отдельно. CaCO<sub>3</sub> стерилизуют сухим жаром при 180 °С в течение 2 часов. рН доводят до 7.0.

5

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

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

10

15

20

25

30

35

Оба штамма, SV164(pGH5) и SV164(pGH5)-Δ*uncD*, могут быть выращены с перемешиванием при 37 °С в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона с добавлением тетрациклина (маркера плазмиды pGH5, 10 мкг/мл). По 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды, содержащей тетрациклин (10 мкг/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.

40

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

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

Для оценки влияния инактивации гена *uncD* на продукцию L-пролина ДНК-фрагменты из хромосомы описанного выше штамма *E. coli* MG1655 Δ*uncD*::cat могут быть перенесены в штамм-продуцент L-пролина *E. coli* 702ilvA с помощью P1-трансдукции (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY) с целью получения штамма 702ilvA-Δ*uncD*. Штамм 702ilvA

45

50



депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Россия, 117545 Москва, 1<sup>ый</sup> Дорожный проезд, 1) с инвентарным номером ВКПМ В-8012, затем 18 мая 2001 г. было произведено международное депонирование этого штамма согласно условиям Будапештского Договора.

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

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

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

Оба штамма, 382 и 382-ΔuncD, могут быть выращены с перемешиванием при 37 °С в течение 18 часов в 3 мл питательного бульона, по 0.3 мл полученных культур может быть внесено в 3 мл ферментационной среды в пробирки размером 20 x 200 мм, и культуры могут быть выращены при 32 °С в течение 48 часов на роторной качалке.

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

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

Глюкоза	48.0
---------	------

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	35.0
---	------

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
5	Тиамин HCl	0.0002
	Дрожжевой экстракт	1.0
	L-изолейцин	0.1
	$\text{CaCO}_3$	5.0

10 Глюкозу и сульфат магния стерилизуют отдельно.  $\text{CaCO}_3$  стерилизуют сухим жаром при 180 °С в течение 2 часов. pH доводят до 7.0.

15

Хотя указанное изобретение описано в деталях со ссылкой на Наилучший способ осуществления изобретения, для специалиста в указанной области техники очевидно, что могут быть совершены различные изменения и произведены эквивалентные замены, и такие изменения и замены не выходят за рамки настоящего изобретения.

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

25

30

35

40

45

50

Таблица 1

Штамм	OD <sub>540</sub>	Количество L-треонина, г/л
В-3996	21.8 ± 0.5	19.5 ± 0.4
В-3996-ДуносD	23.4 ± 0.6	21.8 ± 0.7

Таблица 2

Растворы	Компонент	Конечная концентрация, г/л
A	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.28
	NaCl	0.14
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16
	L-Methionine	0.08
	L-Phenylalanine	0.28
	L-Tyrosine	0.28
	Mameno (total N)	0.07
B	Glucose	40.0
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.03
C	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.03
D	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.00015
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0025
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.00007
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.00025
	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.0016
	ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.0003
	E	Thiamine HCl
F	CaCO <sub>3</sub>	30.0
G	Pyridoxine	0.03

pH раствора А доводят до значения 7.1 при помощи NH<sub>4</sub>OH.

**Перечень последовательностей**

5 <110> Ajinomoto-Genetika Research Institute

10 <120> A METHOD FOR PRODUCING AN L-AMINO ACID USING BACTERIUM OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY WITH ATTENUATED EXPRESSION OF THE yncD GENE

<130> yncD

15 <160> 6

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1

<211> 2103

25 <212> DNA

<213> Escherichia coli

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(2103)

35 <223>

<400> 1

40 atg aag att ttt tcc gtc cga cag acc gtt ttg ccc gca ctg ctt gtc 48  
 Met Lys Ile Phe Ser Val Arg Gln Thr Val Leu Pro Ala Leu Leu Val  
 1 5 10 15

ctt tcc ccc gtt gtt ttt gcc gct gat gaa cag act atg att gtc agt 96  
 Leu Ser Pro Val Val Phe Ala Ala Asp Glu Gln Thr Met Ile Val Ser  
 20 25 30

45 gcc gca ccg cag gtg gtt tca gaa ctg gat acc cca gca gca gta agc 144  
 Ala Ala Pro Gln Val Val Ser Glu Leu Asp Thr Pro Ala Ala Val Ser  
 35 40 45

gtg gtg gat ggc gag gag atg cgc ctg gca aca ccg cgc att aac ttg 192  
 Val Val Asp Gly Glu Glu Met Arg Leu Ala Thr Pro Arg Ile Asn Leu  
 50 55 60

tcc gaa tca ctg acc ggc gtg cct ggt ttg cag gta caa aac cgg cag 240

	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Gln	Val	Gln	Asn	Arg	Gln	
	65					70					75					80	
	aac	tat	gcg	caa	gat	tta	cag	ctg	tcg	att	cgc	gga	ttt	ggc	tcc	cgc	288
5	Asn	Tyr	Ala	Gln	Asp	Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Arg	
					85					90					95		
	tcc	act	tac	ggt	att	cgc	ggt	att	cgc	ctg	tat	gtg	gac	ggt	att	ccc	336
	Ser	Thr	Tyr	Gly	Ile	Arg	Gly	Ile	Arg	Leu	Tyr	Val	Asp	Gly	Ile	Pro	
				100					105					110			
10	gcc	acc	atg	ccc	gac	ggg	caa	ggg	caa	aca	tcc	aac	atc	gat	tta	agc	384
	Ala	Thr	Met	Pro	Asp	Gly	Gln	Gly	Gln	Thr	Ser	Asn	Ile	Asp	Leu	Ser	
				115					120					125			
	agt	gtg	caa	aat	gtg	gaa	gtg	ctg	cgt	ggc	ccc	ttc	tct	gcc	ctg	tat	432
15	Ser	Val	Gln	Asn	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Pro	Phe	Ser	Ala	Leu	Tyr	
		130					135						140				
	ggc	aac	gcg	tct	ggt	ggg	gta	atg	aat	gtc	acc	acc	cag	acc	gga	caa	480
	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Gly	Val	Met	Asn	Val	Thr	Thr	Gln	Thr	Gly	Gln	
						150					155					160	
20	cag	cca	cca	acc	att	gaa	gcc	agt	agt	tac	tac	ggc	agt	ttt	ggc	agc	528
	Gln	Pro	Pro	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Phe	Gly	Ser	
					165						170					175	
	tgg	cgc	tat	ggg	ctg	aaa	gca	acg	ggc	gca	acg	gga	gac	ggc	aca	cag	576
25	Trp	Arg	Tyr	Gly	Leu	Lys	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Asp	Gly	Thr	Gln	
				180						185					190		
	cct	ggc	gat	gtc	gat	tac	acc	gtc	tca	acc	acg	cgt	ttt	acg	acc	cac	624
	Pro	Gly	Asp	Val	Asp	Tyr	Thr	Val	Ser	Thr	Thr	Arg	Phe	Thr	Thr	His	
				195				200						205			
30	ggc	tat	cgt	gac	cat	agt	ggc	gca	cag	aaa	aat	tta	gcc	aat	gcc	aaa	672
	Gly	Tyr	Arg	Asp	His	Ser	Gly	Ala	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Asn	Ala	Lys	
			210					215					220				
	ctg	ggc	gta	cgc	att	gat	gaa	gcc	agc	aaa	tta	agt	ctg	att	ttc	aat	720
35	Leu	Gly	Val	Arg	Ile	Asp	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Asn	
						230						235				240	
	agt	gtg	gat	atc	aaa	gca	gat	gac	cca	ggg	ctg	acc	aaa	gca	gaa		768
	Ser	Val	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp	Asp	Pro	Gly	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	
					245					250					255		
40	tgg	aag	gct	aat	cca	caa	caa	gcg	cct	cgt	gca	gaa	cag	tac	gac	acg	816
	Trp	Lys	Ala	Asn	Pro	Gln	Gln	Ala	Pro	Arg	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asp	Thr	
				260						265					270		
	cga	aaa	acc	atc	aag	caa	act	cag	gct	ggg	ttg	cgc	tat	gag	cgt	agc	864
45	Arg	Lys	Thr	Ile	Lys	Gln	Thr	Gln	Ala	Gly	Leu	Arg	Tyr	Glu	Arg	Ser	
				275				280						285			
	ctg	agt	tcg	cgg	gat	gat	atg	agt	gtg	atg	atg	tat	gcc	gga	gag	cga	912
	Leu	Ser	Ser	Arg	Asp	Asp	Met	Ser	Val	Met	Met	Tyr	Ala	Gly	Glu	Arg	
				290				295					300				
50	gaa	acg	acc	cag	tac	cag	tca	ata	ccc	atg	gca	cca	caa	ctt	aac	ccg	960
	Glu	Thr	Thr	Gln	Tyr	Gln	Ser	Ile	Pro	Met	Ala	Pro	Gln	Leu	Asn	Pro	
						310					315					320	
	tca	cat	gcg	ggc	ggc	gtg	att	acc	ctg	caa	cgc	cat	tac	cag	gga	ata	1008

	Ser	His	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Leu	Gln	Arg	His	Tyr	Gln	Gly	Ile	
					325					330					335		
5	gac	agc	cgc	tgg	aca	cac	cgt	ggt	gaa	ctg	ggc	ggt	ccg	gtc	acg	ttc	1056
	Asp	Ser	Arg	Trp	Thr	His	Arg	Gly	Glu	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Thr	Phe	
				340					345					350			
	act	acc	ggc	ctg	aac	tac	gaa	aac	atg	agt	gaa	aac	cgc	aag	ggc	tac	1104
	Thr	Thr	Gly	Leu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Met	Ser	Glu	Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	
			355					360					365				
10	aat	aac	ttc	cgc	ctg	aat	agc	ggc	atg	ccg	gag	tac	ggg	caa	aaa	ggt	1152
	Asn	Asn	Phe	Arg	Leu	Asn	Ser	Gly	Met	Pro	Glu	Tyr	Gly	Gln	Lys	Gly	
			370				375					380					
15	gag	ttg	cgt	cgc	gac	gaa	cgc	aat	ctg	atg	tgg	aac	atc	gat	ccc	tat	1200
	Glu	Leu	Arg	Arg	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Met	Trp	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	
	385					390					395					400	
	tta	cag	acg	cag	tgg	cag	ctg	agc	gaa	aaa	ctg	tcg	ctg	gat	gct	ggc	1248
	Leu	Gln	Thr	Gln	Trp	Gln	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Asp	Ala	Gly	
				405						410					415		
20	gtg	cgc	tac	agc	tcc	gtg	tgg	ttt	gat	tcc	aac	gac	cat	tac	gtt	act	1296
	Val	Arg	Tyr	Ser	Ser	Val	Trp	Phe	Asp	Ser	Asn	Asp	His	Tyr	Val	Thr	
				420					425					430			
25	ccg	ggt	aac	ggc	gat	gac	agc	ggt	gat	gcc	agt	tat	cat	aaa	tgg	cta	1344
	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Asp	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Tyr	His	Lys	Trp	Leu	
			435					440					445				
	cct	gcc	ggt	tcg	tta	aaa	tat	gca	atg	acc	gat	gcc	tgg	aat	atc	tat	1392
	Pro	Ala	Gly	Ser	Leu	Lys	Tyr	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Trp	Asn	Ile	Tyr	
			450				455					460					
30	ctg	gca	gcc	ggg	cga	ggt	ttt	gaa	acg	ccg	acg	att	aat	gag	ctg	tct	1440
	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Thr	Ile	Asn	Glu	Leu	Ser	
	465					470					475					480	
35	tat	cgt	gct	gat	ggg	caa	agc	ggt	atg	aac	tta	ggt	tta	aaa	cca	tcc	1488
	Tyr	Arg	Ala	Asp	Gly	Gln	Ser	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Lys	Pro	Ser	
					485				490						495		
40	acc	aac	gat	aca	att	gag	atc	ggc	agt	aaa	acg	cgt	att	ggt	gat	ggg	1536
	Thr	Asn	Asp	Thr	Ile	Glu	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Arg	Ile	Gly	Asp	Gly	
				500				505					510				
45	ctg	ctt	agt	ctc	gca	ttg	ttt	cag	acc	gac	act	gat	gat	gaa	att	gtt	1584
	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Phe	Gln	Thr	Asp	Thr	Asp	Asp	Glu	Ile	Val	
			515					520					525				
50	gtc	gat	agc	agt	agc	ggt	ggg	cgt	acg	act	tac	aaa	aat	gcc	gga	aag	1632
	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Asn	Ala	Gly	Lys	
			530				535					540					
55	acc	cgt	cgt	caa	ggc	gct	gaa	ctg	gca	tgg	gat	caa	cgt	ttc	gca	gga	1680
	Thr	Arg	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Trp	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Gly	
	545					550					555					560	
60	gat	ttt	cgc	gta	aac	gcg	tcc	tgg	acc	tgg	ctt	gat	gcg	acc	tat	cgc	1728
	Asp	Phe	Arg	Val	Asn	Ala	Ser	Trp	Thr	Trp	Leu	Asp	Ala	Thr	Tyr	Arg	
				565					570						575		
65	agc	aat	gtt	tgc	aat	gaa	cag	gat	tgt	aac	ggt	aat	cgg	atg	cca	ggg	1776

	Ser	Asn	Val	Cys	Asn	Glu	Gln	Asp	Cys	Asn	Gly	Asn	Arg	Met	Pro	Gly	
				580					585					590			
	atc	gcc	cgt	aat	atg	ggc	ttt	gcg	tcg	ata	ggg	tat	gta	ccg	gaa	gat	1824
5	Ile	Ala	Arg	Asn	Met	Gly	Phe	Ala	Ser	Ile	Gly	Tyr	Val	Pro	Glu	Asp	
			595					600					605				
	ggg	tgg	tat	gca	ggc	acg	gaa	gcg	cgt	tat	atg	ggc	gat	att	atg	gca	1872
	Gly	Trp	Tyr	Ala	Gly	Thr	Glu	Ala	Arg	Tyr	Met	Gly	Asp	Ile	Met	Ala	
		610					615					620					
10	gat	gat	gaa	aat	acg	gca	aaa	gcg	ccg	tct	tat	act	ctc	gtc	ggc	tta	1920
	Asp	Asp	Glu	Asn	Thr	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Leu	Val	Gly	Leu	
	625					630					635				640		
	ttc	acc	ggg	tat	aaa	tac	aat	tac	cac	aat	tta	act	gtg	gat	tta	ttt	1968
15	Phe	Thr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Tyr	His	Asn	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Phe	
					645					650					655		
	ggg	cgt	gtc	gat	aat	tta	ttc	gat	aaa	gaa	tac	ggt	ggg	tct	gtc	att	2016
	Gly	Arg	Val	Asp	Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Tyr	Val	Gly	Ser	Val	Ile	
				660					665					670			
20	gtc	aat	gag	tca	aac	ggg	cga	tat	tac	gaa	cct	tcg	ccc	gga	cga	aat	2064
	Val	Asn	Glu	Ser	Asn	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Ser	Pro	Gly	Arg	Asn	
			675				680						685				
	tat	ggg	gtc	ggc	atg	aat	att	gcg	tgg	aga	ttt	gag	taa				2103
25	Tyr	Gly	Val	Gly	Met	Asn	Ile	Ala	Trp	Arg	Phe	Glu					
		690				695						700					
	<210>		2														
	<211>		700														
30	<212>		PRT														
	<213>		Escherichia coli														
35	<400>		2														
	Met	Lys	Ile	Phe	Ser	Val	Arg	Gln	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	
	1				5					10					15		
40	Leu	Ser	Pro	Val	Val	Phe	Ala	Ala	Asp	Glu	Gln	Thr	Met	Ile	Val	Ser	
				20					25					30			
	Ala	Ala	Pro	Gln	Val	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Ser	
45			35					40					45				
	Val	Val	Asp	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Leu	Ala	Thr	Pro	Arg	Ile	Asn	Leu	
		50					55					60					
50	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Gln	Val	Gln	Asn	Arg	Gln	
	65					70					75					80	

Asn Tyr Ala Gln Asp Leu Gln Leu Ser Ile Arg Gly Phe Gly Ser Arg  
 85 90 95  
 5 Ser Thr Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Arg Leu Tyr Val Asp Gly Ile Pro  
 100 105 110  
 Ala Thr Met Pro Asp Gly Gln Gly Gln Thr Ser Asn Ile Asp Leu Ser  
 115 120 125  
 10 Ser Val Gln Asn Val Glu Val Leu Arg Gly Pro Phe Ser Ala Leu Tyr  
 130 135 140  
 15 Gly Asn Ala Ser Gly Gly Val Met Asn Val Thr Thr Gln Thr Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Pro Thr Ile Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Phe Gly Ser  
 165 170 175  
 20 Trp Arg Tyr Gly Leu Lys Ala Thr Gly Ala Thr Gly Asp Gly Thr Gln  
 180 185 190  
 25 Pro Gly Asp Val Asp Tyr Thr Val Ser Thr Thr Arg Phe Thr Thr His  
 195 200 205  
 Gly Tyr Arg Asp His Ser Gly Ala Gln Lys Asn Leu Ala Asn Ala Lys  
 210 215 220  
 30 Leu Gly Val Arg Ile Asp Glu Ala Ser Lys Leu Ser Leu Ile Phe Asn  
 225 230 235 240  
 35 Ser Val Asp Ile Lys Ala Asp Asp Pro Gly Gly Leu Thr Lys Ala Glu  
 245 250 255  
 Trp Lys Ala Asn Pro Gln Gln Ala Pro Arg Ala Glu Gln Tyr Asp Thr  
 260 265 270  
 40 Arg Lys Thr Ile Lys Gln Thr Gln Ala Gly Leu Arg Tyr Glu Arg Ser  
 275 280 285  
 45 Leu Ser Ser Arg Asp Asp Met Ser Val Met Met Tyr Ala Gly Glu Arg  
 290 295 300  
 Glu Thr Thr Gln Tyr Gln Ser Ile Pro Met Ala Pro Gln Leu Asn Pro  
 305 310 315 320  
 50 Ser His Ala Gly Gly Val Ile Thr Leu Gln Arg His Tyr Gln Gly Ile  
 325 330 335



Asp Ser Arg Trp Thr His Arg Gly Glu Leu Gly Val Pro Val Thr Phe  
 340 345 350

5 Thr Thr Gly Leu Asn Tyr Glu Asn Met Ser Glu Asn Arg Lys Gly Tyr  
 355 360 365

Asn Asn Phe Arg Leu Asn Ser Gly Met Pro Glu Tyr Gly Gln Lys Gly  
 370 375 380

10 Glu Leu Arg Arg Asp Glu Arg Asn Leu Met Trp Asn Ile Asp Pro Tyr  
 385 390 395 400

15 Leu Gln Thr Gln Trp Gln Leu Ser Glu Lys Leu Ser Leu Asp Ala Gly  
 405 410 415

Val Arg Tyr Ser Ser Val Trp Phe Asp Ser Asn Asp His Tyr Val Thr  
 420 425 430

20 Pro Gly Asn Gly Asp Asp Ser Gly Asp Ala Ser Tyr His Lys Trp Leu  
 435 440 445

25 Pro Ala Gly Ser Leu Lys Tyr Ala Met Thr Asp Ala Trp Asn Ile Tyr  
 450 455 460

Leu Ala Ala Gly Arg Gly Phe Glu Thr Pro Thr Ile Asn Glu Leu Ser  
 465 470 475 480

30 Tyr Arg Ala Asp Gly Gln Ser Gly Met Asn Leu Gly Leu Lys Pro Ser  
 485 490 495

35 Thr Asn Asp Thr Ile Glu Ile Gly Ser Lys Thr Arg Ile Gly Asp Gly  
 500 505 510

Leu Leu Ser Leu Ala Leu Phe Gln Thr Asp Thr Asp Asp Glu Ile Val  
 515 520 525

40 Val Asp Ser Ser Ser Gly Gly Arg Thr Thr Tyr Lys Asn Ala Gly Lys  
 530 535 540

45 Thr Arg Arg Gln Gly Ala Glu Leu Ala Trp Asp Gln Arg Phe Ala Gly  
 545 550 555 560

Asp Phe Arg Val Asn Ala Ser Trp Thr Trp Leu Asp Ala Thr Tyr Arg  
 565 570 575

50 Ser Asn Val Cys Asn Glu Gln Asp Cys Asn Gly Asn Arg Met Pro Gly  
 580 585 590

Ile Ala Arg Asn Met Gly Phe Ala Ser Ile Gly Tyr Val Pro Glu Asp  
 595 600 605

5 Gly Trp Tyr Ala Gly Thr Glu Ala Arg Tyr Met Gly Asp Ile Met Ala  
 610 615 620

Asp Asp Glu Asn Thr Ala Lys Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Val Gly Leu  
 625 630 635 640

10 Phe Thr Gly Tyr Lys Tyr Asn Tyr His Asn Leu Thr Val Asp Leu Phe  
 645 650 655

15 Gly Arg Val Asp Asn Leu Phe Asp Lys Glu Tyr Val Gly Ser Val Ile  
 660 665 670

Val Asn Glu Ser Asn Gly Arg Tyr Tyr Glu Pro Ser Pro Gly Arg Asn  
 675 680 685

20 Tyr Gly Val Gly Met Asn Ile Ala Trp Arg Phe Glu  
 690 695 700

25 <210> 3  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence: primer P1

30

<400> 3  
 atgaagattt tttccgtccg acagaccgtt ttgcccgctc aagttagtat aaaaaagct 59

35 <210> 4  
 <211> 60  
 <212> DNA

40 <213> Artificial sequence: primer P2

<400> 4  
 45 ttactcaaat ctccacgcaa tattcatgcc gacacctgaa gcctgctttt ttataactaag 60

<210> 5  
 <211> 18  
 50 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence: primer P3

<400> 5  
atcatcgtta cgctcttg

18

<210> 6

5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence: primer P4

10

<400> 6  
tgtgtgagat gattgagc

18

15

#### Формула изобретения

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

20

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

3. Способ получения L-треонина, включающий:

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

30

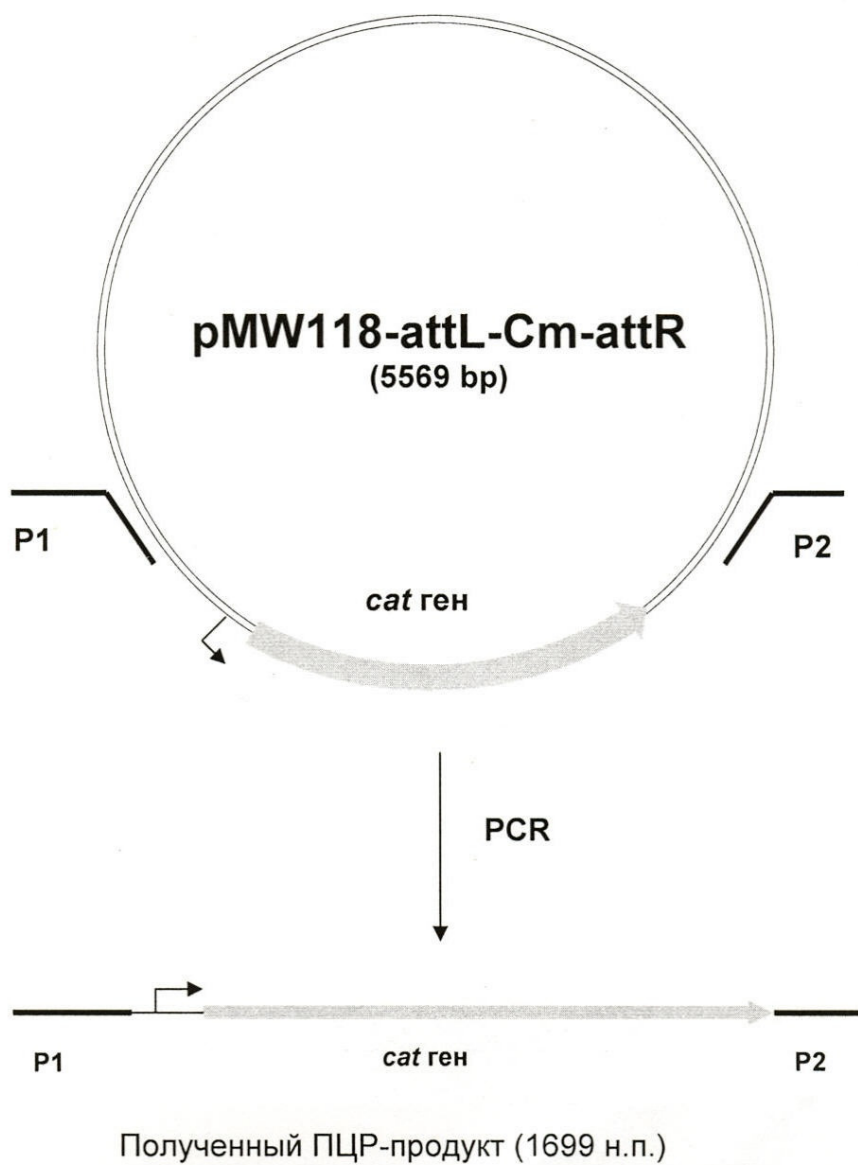
35

40

45

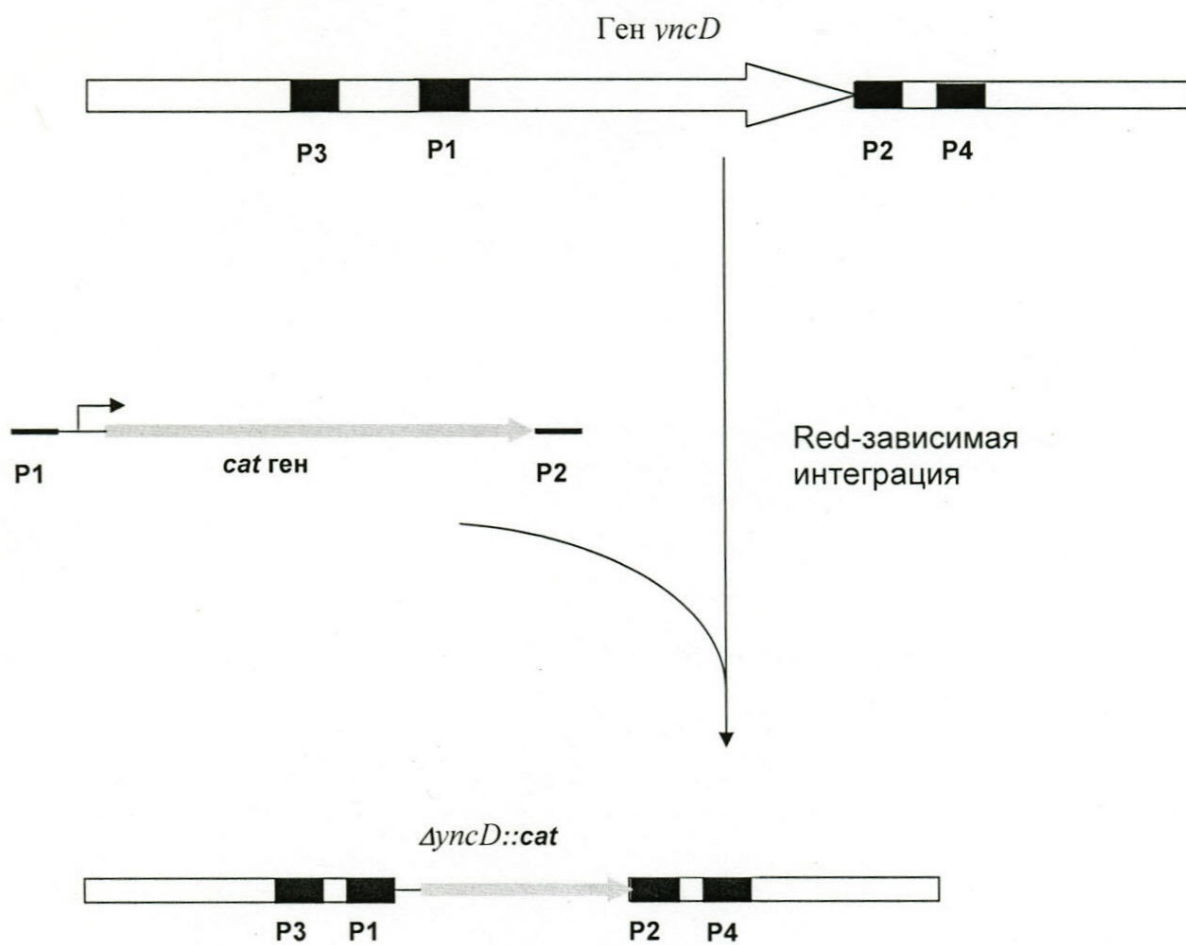
50

Относительные положения праймеров P1 и P2 на плазмиде pMW118-attL-Cm-attR.



Фиг. 1

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



~2.1 т. п.н.

Фиг.2