



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003105269/13, 26.02.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.02.2003

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2004

(45) Опубликовано: 10.04.2006 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: SU 904325 A1, 23.08.1990. US 6303352,
16.10.2001.

Адрес для переписки:

117279, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 55А, ЗАО
"Фирма "Центр патентных услуг", пат.пов.
Е.А.Харченко

(72) Автор(ы):

Саврасова Екатерина Алексеевна (RU),
Сычева Елена Викторовна (RU),
Мичурина Татьяна Анатольевна (RU),
Козлов Юрий Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАЦИИ СМЕСИ ГЛЮКОЗЫ И ПЕНТОЗ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. L-аминокислоты получают культивированием бактерии рода *Escherichia* - продуцента L-аминокислот в питательной среде, содержащей

смесь глюкозы и пентоз. Полученную и накопленную L-аминокислоту выделяют из культуральной жидкости. Изобретение позволяет получать L-аминокислоты с высокой степенью эффективности. 11 з.п. ф-лы, 6 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12P 13/04 (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C12R 1/19** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2003105269/13, 26.02.2003**(24) Effective date for property rights: **26.02.2003**(43) Application published: **27.10.2004**(45) Date of publication: **10.04.2006 Bull. 10**

Mail address:

**117279, Moskva, ul. Miklukho-Maklaja, 55A,
ZAO "Firma "Tsentr patentnykh uslug",
pat.pov. E.A.Kharchenko**

(72) Inventor(s):

**Savrasova Ekaterina Alekseevna (RU),
Sycheva Elena Viktorovna (RU),
Michurina Tat'jana Anatol'evna (RU),
Kozlov Jurij Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) METHOD FOR PREPARING L-AMINO ACIDS BY FERMENTATION OF MIXTURE OF GLUCOSE AND PENTOSE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, amino acids, biochemistry.

SUBSTANCE: method involves preparing L-amino acids by culturing microorganisms of genus *Escherichia* as a producer of L-amino acids in nutrient medium containing a mixture of glucose

and pentoses. Prepared and accumulated L-amino acid is isolated from the cultured liquid. Invention provides preparing L-amino acids with the high degree of effectiveness.

EFFECT: improved preparing method.

12 cl, 6 tbl, 4 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу получения L-аминокислот методом ферментации пентоз, более конкретно способу получения L-аминокислот методом ферментации смеси арабинозы и/или ксилозы вместе с глюкозой в качестве источника углерода. Дешевый источник углерода, содержащий смесь гексоз и пентоз в гемицеллюлозных фракциях, полученных из биомассы целлюлозы, может быть использован для коммерческой продукции L-аминокислот, например L-изолейцина, L-гистидина, L-треонина и L-триптофана.

Уровень техники

Промышленным способом L-аминокислоты традиционно получают методом ферментации с использованием штаммов различных микроорганизмов. Питательные среды для ферментации должны содержать достаточное количество источников углерода и азота.

В качестве источников углерода традиционно используют различные углеводы, такие как гексозы, пентозы, триозы; различные органические кислоты и спирты. К гексозам относятся глюкоза, фруктоза, манноза, сорбоза, галактоза и другие подобные соединения. К пентозам относятся арабиноза, ксилоза, рибоза и другие подобные соединения. Но указанные выше углеводы, а также другие традиционные источники углерода, используемые в промышленности, такие как меласса, зерновые, тростниковый сахар, крахмал и его гидролизат, являются достаточно дорогими, и поэтому снижение стоимости продуцируемых L-аминокислот желательно.

Биомасса целлюлозы является подходящим сырьем для продукции L-аминокислот ввиду как ее широкой доступности, так и меньшей стоимости, чем углеводы, зерновые, тростниковый сахар и другие источники углерода. Типичное содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в биомассе следующее: 40-60% целлюлозы, 20-40% гемицеллюлозы, 10-25% лигнина и около 10% других компонентов. Целлюлозная фракция состоит из полимера гексозы - глюкозы. Гемицеллюлозная фракция содержит, в основном, пентозы, включая ксилозу и арабинозу. Состав различных сырьевых биомасс показан в Таблице 1 (http://www.ott.doe.gov/understanding_biomass.html).

Таблица 1				
Материал	Сахара с шестью атомами углерода	Сахара с пятью атомами углерода	Лигнин	Зола
Твердая древесина	39-50%	18-28%	15-28%	0.3-1.0%
Мягкая древесина	41-57%	8-12%	24-27%	0.1-0.4%

Более детальная информация о составе более 150 образцов биомассы приведена в «Базе данных состава и свойств сырьевых биомасс» ("Biomass Feedstock Composition and Property Database", http://www.ott.doe.gov/biofuels/progs/search_1.cgi).

Ожидается, что процесс эффективной промышленной конверсии биомассы целлюлозы в сырье, годное к использованию в ферментации (обычно смесь углеводов), будет разработан в ближайшем будущем. Поэтому использование возобновляемых источников энергии, таких как целлюлозы и гемицеллюлозы, для продукции полезных соединений увеличится, как ожидается, в ближайшем будущем (Aristidou A., Penttilä M., Curr. Opin. Biotechnol., 2000, Apr., 11:2, 187-198). Но в большинстве опубликованных статей и патентов (или патентных заявок) описано использование биомассы целлюлозы биокатализаторами (бактериями и дрожжами) для производства этанола, который, как ожидается, будет альтернативным автомобильным топливом. В указанных процессах ферментация биомассы целлюлозы происходит с использованием различных модифицированных штаммов *Zymomonas mobilis* (Deanda K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1996 Dec., 62:12, 4465-70; Mohagheghi A. et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 2002, 98-100:885-98; Lawford H.G., Rousseau J.D., Appl. Biochem. Biotechnol., 2002, 98-100:429-48; заявки PCT WO 95/28476, WO 98/50524), модифицированных штаммов *Escherichia coli* (Dien B.S. et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 2000, 84-86:181-96; Nichols N.N. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,

2001 Jul, 56:1-2, 120-5; US patent 5000000). Ксилитол может быть получен методом ферментации ксилозы из гемицеллюлозных сахаров с использованием *Candida tropicalis* (Walthers T. et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, 91-93:423-35). 1,2-пропандиол может быть получен методом ферментации арабинозы, фруктозы, галактозы, глюкозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, ксилозы и их смесей с использованием рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* (патент США 6303352). Также было показано, что 3-дегидрошикимовая кислота может быть получена методом ферментации смеси глюкозы, ксилозы и арабинозы с использованием штаммов *Escherichia coli*, при этом в случае использования в качестве источника углерода смеси глюкозы, ксилозы и арабинозы были получены большие выходы 3-дегидрошикимовой кислоты, чем при использовании только ксилозы или глюкозы (Kai Li and J.W.Frost, Biotechnol. Prog., 1999, 15, 876-883).

Известно, что *Escherichia coli* могут утилизировать пентозы, такие как L-арабиноза и D-ксилоза. Транспорт L-арабинозы в клетку осуществляется двумя индуцируемыми системами: низко-аффинной пермеазой (K_m около 0.1 мМ), кодируемой геном *araE* и системой с высокой аффинностью (K_m 1-3 мкМ), кодируемой опероном *araFG*. Ген *araF* кодирует периплазматический связывающий белок (306 аминокислотных остатков) с функцией хемотактического рецептора, а локус *araG* кодирует внутри мембранный белок. Метаболизм сахара осуществляется набором ферментов, кодируемых опероном *araBAD*: изомеразой (кодируемой геном *araA*), которая обратимо превращает альдозу в L-рибулозу; киназой (кодируемой геном *araB*), которая фосфорилирует кетозу в рибулоза-5-фосфат; и L-рибулоза-5-фосфат-4-эпимеразой (кодируемой геном *araD*), катализирующей образование D-ксилоза-5-фосфата (*Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition, Editor in Chief: F.C.Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

Большинство штаммов *E.coli* способны расти на D-ксилозе, но штамм K-12 должен содержать определенную мутацию, чтобы расти на этом соединении. Утилизация этой пентозы происходит через индуцируемый и репресслируемый катаболитами путь, включающий транспорт через цитоплазматическую мембрану с помощью двух индуцируемых пермеаз (неактивных в случае D-рибозы и D-арабинозы), изомеризацию D-ксилулозы и АТФ-зависимого фосфорилирования пентулозы с выходом D-ксилулоза-5-фосфата. Высокоаффинная (K_m 0.3-3 мкМ) система транспорта включает периплазматический связывающий белок (37000 Да) и, вероятно, функционирует с использованием высокоэнергетических соединений. Система с низкой аффинностью (K_m около 170 мкМ) работает с использованием энергии переноса протона. Эта система транспорта D-ксилозы в симпорте с протоном кодируется геном *хуIЕ*. Основным кластером генов, определяющим утилизацию D-ксилозы, является *хуIAB(RT)*. Ген *хуIА* кодирует изомеразу (54000 Да), а ген *хуIВ* кодирует киназу (52000 Да). Оперон содержит две точки транскрипции, одна из которых расположена перед открытой рамкой считывания гена *хуIВ*. Поскольку пермеаза с низкой аффинностью кодируется несвязанным геном *хуIЕ*, локус *хуIТ*, вероятно, кодирует систему транспорта с высокой аффинностью и поэтому должна содержать, по крайней мере, два гена (один для периплазматического белка, другой для интегрального мембранного белка) (*Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition, Editor in Chief: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

Введение перечисленных выше генов, кодирующих L-арабиноизомеразу, L-рибулокиназу, L-рибулоза-5-фосфат-4-эпимеразу, ксилозоизомеразу и ксилулокиназу в дополнение к трансальдолазе и транскетолазе позволяет получить микроорганизмы, такие как *Zymomonas mobilis*, способные метаболизировать арабинозу и ксилозу в этанол (заявки РСТ WO/9528476, WO 98/50524). Напротив, гены, кодирующие алкогольдегидрогеназу (ADH) и пируватдекарбоксилазу (PDH), выделенные из *Zymomonas*, полезны для продукции этанола штаммами *Escherichia coli* (Dien B.S. et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 2000, 84-86:181-96; US patent 5000000).

Но к настоящему моменту нет сообщений, описывающих процесс получения L-аминокислот методом ферментации смеси глюкозы и пентоз, таких как арабиноза и ксилоза.

Описание изобретения

Целью настоящего изобретения является предоставление способа получения L-аминокислот из смеси гексозы, такой как глюкоза, и пентоз, таких как ксилоза и арабиноза, путем выращивания микроорганизма - продуцента L-аминокислоты в

5 питательной среде, содержащей смесь указанных сахаров. В качестве источника углерода в питательной среде может быть использовано сырье для ферментации, полученное из биомассы целлюлозы. Используемые микроорганизмы способны к росту на указанном сырье для ферментации и способны с высокой эффективностью продуцировать L-аминокислоты с использованием сырья для ферментации, содержащего в качестве

10 источника углерода ксилозу и арабинозу вместе с глюкозой.

Авторы настоящего изобретения установили, что известные штаммы - продуценты L-аминокислот - способны эффективно утилизировать пентозы вместе с глюкозой и продуцировать L-аминокислоты в количестве, сравнимом с количеством, полученном при ферментации только глюкозы. Примерами штаммов - продуцентов L-аминокислот -

15 являются такие штаммы *Escherichia coli*.

Другими словами, в настоящем изобретении описано использование рекомбинантных штаммов простых микроорганизмов для получения L-аминокислот из неиспользуемых источников биомассы, таких как целлюлоза и гемицеллюлоза, составляющих основную часть древесины и несъедобных частей растений.

20 Таким образом было совершено настоящее изобретение.

Настоящее изобретение включает в себя следующее:

1. Способ получения L-аминокислот, включающий стадии выращивания бактерии-продуцента L-аминокислоты в питательной среде и выделения полученной и накопленной L-аминокислоты из культуральной жидкости, в котором питательная среда содержит смесь

25 глюкозы и пентоз.

2. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором пентозами являются арабиноза и ксилоза.

3. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором смесь сахаров является сырьем для ферментации, полученным из биомассы целлюлозы.

30 4. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором бактерией-продуцентом L-аминокислоты является бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*.

5. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором бактерия-продуцент L-аминокислоты модифицирована с целью повышения степени утилизации пентоз.

6. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором получаемой L-аминокислотой является L-изолейцин.

35

7. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-изолейцина.

8. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором получаемой L-аминокислотой является L-гистидин.

40 9. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-гистидина.

10. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором получаемой L-аминокислотой является L-треонин.

11. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-треонина.

45

12. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором получаемой L-аминокислотой является L-триптофан.

13. Способ в соответствии с описанным выше способом, в котором бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-триптофана.

50 К способу получения L-аминокислот согласно настоящему изобретению относится способ получения L-изолейцина методом ферментации глюкозы и пентоз, таких как арабиноза и ксилоза. Также к способу получения L-аминокислот согласно настоящему изобретению относится способ получения L-гистидина методом ферментации глюкозы и

пентоз, таких как арабиноза и ксилоза. Также к способу получения L-аминокислот согласно настоящему изобретению относится способ получения L-треонина методом ферментации глюкозы и пентоз, таких как арабиноза и ксилоза. Также к способу получения L-аминокислот согласно настоящему изобретению относится способ получения L-триптофана методом ферментации глюкозы и пентоз, таких как арабиноза и ксилоза. Подобная смесь глюкозы и пентоз, таких как арабиноза и ксилоза, используемая в качестве сырья для ферментации, может быть получена из неиспользуемых источников растительной биомассы.

Настоящее изобретение более детально будет описано ниже.

Согласно настоящему изобретению «бактерия-продуцент L-аминокислоты» означает бактерию, обладающую способностью к накоплению L-аминокислоты в питательной среде, в условиях, когда бактерия согласно настоящему изобретению выращивается в указанной питательной среде. Способность к продукции L-аминокислоты может быть придана или улучшена путем селекции. Термин «бактерия-продуцент L-аминокислоты», использованный здесь, также означает бактерию, обладающую способностью к продукции и накоплению L-аминокислоты в питательной среде в количестве большем, чем родительский штамм или штамм дикого типа, и, предпочтительно, означает, что бактерия обладает способностью к продукции и накоплению в питательной среде не менее 0.5 г/л, более предпочтительно, не менее 1 г/л целевой L-аминокислоты. К L-аминокислотам относятся L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-цистеин, L-глутаминовая кислота, 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 «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*).

Примеры бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, - продуцентов L-аминокислот описаны ниже.

Бактерии-продуценты L-изолейцина

В качестве бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и обладающих способностью к продукции L-изолейцина, могут быть упомянуты следующие штаммы: штамм *E.coli* AJ12919 (выложенная заявка Японии №8-47397); штаммы *E.coli* VL1892 и KX141 (ВКПМ В-4781) (патент США 5658766); штаммы *E. coli* H-9146 (FERM BP-5055) и *E.coli* H-9156 (FERM BP-5056) (патент США 5695972); штаммы *E.coli* H-8670 (FERM BP-4051) и H-8683 (FERM BP-4052) (патент США 5460958); штамм *E.coli* FERM BP-3757 (патент США 5474918) и подобные им. Штамм ВКПМ В-3996, в котором амплифицирован оперон *ilv*, (штамм TDV5) также является предпочтительным примером бактерии-продуцента L-изолейцина (Hashiguchi K. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, 63(4), 672-9).

Бактерии-продуценты L-гистидина

В качестве бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и обладающих способностью к продукции L-гистидина, могут быть упомянуты следующие штаммы: 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 - В-12121 (патент США 4388405); штаммы *E.coli* H-9342 (FERM BP-6675) и H-9343 (FERM BP-6676) (патент США 6344347); штамм *E.coli* H-9341 (FERM BP-6674) (Европейский патент 1085087); штамм *E.coli* AI/pFM201 (патент США 6258554) и подобные им.

Бактерии-продуценты L-треонина

В качестве бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и обладающих способностью к продукции L-треонина, могут быть упомянуты следующие штаммы: штамм *E.coli* TDH6/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 EP1149911A) и подобные им.

Бактерии-продуценты L-триптофана

В качестве бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и обладающих способностью к
 5 продукции L-триптофана, могут быть упомянуты следующие штаммы: штаммы *E.coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) и JP6015/pMU91 (DSM10123), дефицитные по триптофанил-
 тРНК синтетазе, кодируемой мутантным геном *trpS* (патент США 5756345); штамм *E.coli* SV164 (pGH5), содержащий аллель *serA*, не чувствительный к ингибированию серином по
 10 типу обратной связи (патент США 6180373); штаммы *E.coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) и AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), дефицитные по ферменту триптофаназе (патент США 4371614); штамм *E.coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps, в котором увеличена способность к
 продукции фосфоенолпирувата (заявка PCT WO 97/08333, патент США 6319696) и
 подобные им.

Указанные выше штаммы-продуценты L-аминокислот в дальнейшем могут быть
 15 модифицированы с целью повышения степени ассимиляции (утилизации) пентоз и глюкозы
 или с целью повышения способности к биосинтезу L-аминокислот с помощью широкого
 спектра методов, хорошо известных специалисту в данной области.

Степень повышения утилизации пентоз может быть повышена амплификацией генов,
 принимающих участие в ассимиляции пентоз, таких как гены *araFG* и *araBAD* для
 20 арабинозы, и гены *xylE* и *xylAB(RT)* для ксиллозы, или получением мутаций в системе
 ассимиляции глюкозы (PTS и non-PTS), таких как мутация *pstG* (Nichols N.N. et al.,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, Jul. 56:1-2, 120-5).

Способность к биосинтезу бактерий-продуцентов L-аминокислот может быть в
 дальнейшем улучшена путем увеличения экспрессии одного или нескольких генов,
 25 вовлеченных в биосинтез L-аминокислот. Примерами таких генов являются гены оперона
ilvGMEDA, предпочтительно ген *ilvA*, кодирующий треониндеаминазу с повышенной
 устойчивостью к ингибированию L-изолейцином (патент США 5998178), для бактерий-
 продуцентов L-изолейцина. Также примерами таких генов являются гены гистидинового
 оперона, предпочтительно ген *hisG*, кодирующий АТФ-фосфорибозилтрансферазу, в
 30 которой чувствительность к ингибированию L-гистидином утрачена (патенты РФ 2003677 и
 2119536), для бактерий-продуцентов L-гистидина. Также примерами таких генов являются
 гены треонинового оперона, предпочтительно ген, кодирующий аспартаткиназа-
 гомосериндегидрогеназу, в которой чувствительность к ингибированию L-треонином
 утрачена (патентная заявка Японии 1-29559), для бактерий-продуцентов L-треонина.
 35 Также примерами таких генов являются гены оперона *trpEDCBA*, предпочтительно ген *trpE*,
 кодирующий антранилатсинтазу с утраченной чувствительностью к L-триптофану по типу
 обратной связи; ген *serA* с утраченной чувствительностью к L-серину по типу обратной
 связи, для бактерий-продуцентов L-триптофана. Также способность к продукции L-
 триптофана может быть улучшена путем создания бактерии, дефицитной в активности
 40 ферментов, утилизирующих L-триптофан, предпочтительно триптофанил-тРНК синтетазы,
 кодируемой мутантным геном *trpS*, или триптофаназы, кодируемой мутантным геном *aroP*.

К способу согласно настоящему изобретению относится способ получения L-
 аминокислоты, включающий стадии выращивания бактерии-продуцента L-аминокислоты в
 питательной среде с целью продукции и накопления указанной L-аминокислоты в
 45 питательной среде, и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости, при этом
 питательная среда содержит смесь глюкозы и пентоз. Также к способу согласно
 настоящему изобретению относится способ продукции L-изолейцина, включающий стадии
 выращивания бактерии-продуцента L-изолейцина в питательной среде с целью продукции
 и накопления L-изолейцина в питательной среде, и выделения L-изолейцина из
 50 культуральной жидкости, при этом питательная среда содержит смесь глюкозы и пентоз.
 Также к способу согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-
 гистидина, включающий стадии выращивания бактерии-продуцента L-гистидина в
 питательной среде с целью продукции и накопления L-гистидина в питательной среде, и

выделения L-гистидина из культуральной жидкости, при этом питательная среда содержит смесь глюкозы и пентоз. Также к способу согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-треонина, включающий стадии выращивания бактерии-продуцента L-треонина в питательной среде с целью продукции и накопления L-треонина в питательной среде, и выделения L-треонина из культуральной жидкости, при этом питательная среда содержит смесь глюкозы и пентоз. Также к способу согласно настоящему изобретению относится способ продукции L-триптофана, включающий стадии выращивания бактерии-продуцента L-триптофана в питательной среде с целью продукции и накопления L-триптофана в питательной среде, и выделения L-триптофана из культуральной жидкости, при этом питательная среда содержит смесь глюкозы и пентоз.

Смесь пентоз, таких как ксилоза и арабиноза, вместе с гексозами, такой как глюкоза, может быть получена из неиспользуемых источников биомассы. Глюкоза, ксилоза, арабиноза и другие углеводороды могут быть высвобождены из растительной биомассы в результате обработки паром и/или с помощью гидролиза концентрированной кислотой, разбавленной кислотой, гидролиза с использованием ферментов, таких как целлюлаза, щелочной обработки. В случае, когда субстратом является целлюлозный материал, целлюлоза может быть гидролизована до сахаров как отдельно, так и одновременно с ее ферментацией в L-аминокислоты. Поскольку гемицеллюлоза обычно гидролизуетсся легче, чем целлюлоза, желательно прегидролизовать целлюлозный материал, выделить пентозы, а затем гидролизовать целлюлозу путем обработки паром, кислотой, щелочью, целлюлазой или их комбинацией, с получением глюкозы.

В настоящем исследовании была использована смесь с различными соотношениями глюкозы, ксилозы и арабинозы в качестве приближения к составу сырьевой смеси глюкозы и пентоз, которая может быть получена из растительных гидролизатов. Содержание в смеси каждой из пентоз варьировалось в пределах от 12% до 50% от общего содержания углеводов (см. Примеры).

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 микроорганизма. 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, которые требуются микроорганизму для роста.

К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза, сахароза, арабиноза, ксилоза, а также другие пентозы и гексозы, которые способны утилизироваться бактерией-продуцентом L-аминокислоты. Глюкоза, ксилоза, арабиноза и другие углеводы могут быть частью сырьевой смеси сахаров, полученной из биомассы целлюлозы.

К пентозам, подходящим для ферментации в настоящем изобретении, относятся ксилоза и арабиноза, но круг пентоз не ограничивается только ими.

В качестве источника азота могут использоваться различные соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, другие соединения азота, такие как амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов и ферментализат микроорганизмов. В качестве минеральных добавок используются монофосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные соединения. Некоторые питательные добавки могут быть, при необходимости, добавлены в питательную среду. Например, если микроорганизму для роста необходим треонин (ауксотрофия по треонину), соответствующее количество треонина может быть добавлено в питательную среду для выращивания.

Выращивание осуществляется предпочтительно в аэробных условиях, таких как перемешивание, ферментация с аэрацией, при температуре от 20 до 42°C, предпочтительно от 30 до 38°C. pH питательной среды находится в пределах от 5 до 9,

предпочтительно от 6.5 до 7.2. pH среды может регулироваться аммиаком, карбонатом кальция, различными кислотами, основаниями и буферами. Обычно выращивание в течение от 1 до 5 дней приводит к накоплению целевой L-аминокислоты в культуральной жидкости.

После выращивания твердые остатки, такие как клетки, могут быть удалены из культуральной жидкости методом центрифугирования или фильтрацией через мембрану, а затем целевая L-аминокислота может быть собрана и очищена методами ионообменной хроматографии, концентрирования и кристаллизации.

Наилучший способ осуществления изобретения

Настоящее изобретение более детально описано ниже со ссылкой на примеры.

Пример 1. Получение L-изолейцина с использованием бактерии-продуцента L-изолейцина методом ферментации смеси глюкозы и пентоз.

В качестве штамма для продукции L-изолейцина методом ферментации смеси глюкозы и пентоз использовали штамм E.coli TDV5 - продуцент L-изолейцина. Штамм E.coli TDV5 является производным штамма TDH6/pVIC40 (ВКПМ В-3996), в котором дополнительно амплифицирован оперон *ilv* (плазмида pMWD5) (Hashiguchi K. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 672-9).

Для получения посевной культуры штамм выращивали при 37°C в течение 7 часов в среде LB, а затем добавляли в среду для ферментации в соотношении 1/20 (v/v). 2 мл посевной культуры переносили в пробирки 20×200 мм со средой для ферментации, содержащей смесь различных сахаров, и выращивали при 37°C в течение 72 часов на роторной мешалке. После процедуры выращивания накопленное в среде количество L-изолейцина определяли методом ТСХ. Для этого использовали пластины для ТСХ 10×15 см, покрытые слоем силикагеля Сорбфил (0.11 мм) без флуоресцентного красителя (АО Сорбполимер, Краснодар, Россия). Хроматографию пластин проводили в подвижной фазе пропан-2-ол:этилацетат:водный аммоний (25%):вода = 80:80:25:50 (v/v). В качестве визуализирующего агента использовали раствор нингидрина (2%) в ацетоне, Результаты (данные по крайней мере трех независимых экспериментов) представлены в Таблице 2.

Состав среды для ферментации (г/л):

Углеводы	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	18.0
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1.0
Тиамин HCl	0.02
CaCO ₃	25.0

Сахара и сульфат магния стерилизовали отдельно. CaCO₃ стерилизовали при 180°C в течение 2 часов. Значение pH соответствовало 7.0.

Таблица 2.				
Углеводы			OD ₅₄₀	L-изолейцин, г/л
D-глюкоза	L-арабиноза	D-ксилоза		
6%	-	-	16.0±2.3	15.0±0.6
-	6%	-	10.6±1.3	5.2±0.3
-	-	6%	11.1±0.4	8.4±0.5
3%	3%	-	11.9±2.0	9.5±2.8
3%	-	3%	14.1±0.3	12.8±1.9
3%	1.5%	1.5%	12.8±1.5	11.8±1.8
1.5%	3%	1.5%	12.7±1.2	10.4±2.3
1.5%	1.5%	3%	14.1±1.1	11.8±0.5

Как видно из Таблицы 2, штамм E.coli TDV5 - продуцент L-изолейцина - способен эффективно утилизировать пентозы в смеси с глюкозой и продуцировать L-изолейцин в количестве, сравнимом с количеством L-изолейцина, получающемся при ферментации с использованием только глюкозы.

Пример 2. Получение L-гистидина с использованием бактерии-продуцента L-гистидина методом ферментации смеси глюкозы и пентоз.

В качестве штамма для продукции L-гистидина методом ферментации смеси глюкозы и пентоз использовали штамм E.coli 80 - продуцент L-гистидина. Штамм E.coli 80 (ВКПМ В-7270) подробно описан в патенте РФ 2119536.

Для получения посевной культуры штамм выращивали на роторной мешалке (250 об/мин) при 27°C в течение 6 часов в пробирках объемом 40 мл, содержащих 2 мл L-бульона с 3% глюкозой. Затем в среду для ферментации добавляли 2 мл (5%) посевного материала. Ферментацию проводили на роторной мешалке (250 об/мин) при 27°C в течение 65 часов в пробирках объемом 40 мл, содержащих 2 мл среды для ферментации.

После процедуры выращивания накопленное в среде количество L-гистидина определяли методом бумажной хроматографии. Состав подвижной фазы следующий: бутанол:ацетат:вода = 4:1:1 (v/v). В качестве визуализирующего агента использовали раствор нингидрина (0.5%). Результаты приведены в Таблице 3.

Состав среды для ферментации (г/л):

Углеводы	100.0
Магено-TN	0.2
L-треонин	0.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1.0
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ ×5H ₂ O	0.01
Тиамин HCl	0.001
Бетаин	2.0
CaCO ₃	6.0

Сахара, L-треонин и сульфат магния стерилизовали отдельно. CaCO₃ стерилизовали при 110°C в течение 30 мин. Значение pH 6.0 установили с помощью КОН перед стерилизацией.

Таблица 3.				
Углеводы			OD ₄₅₀	L-гистидин, г/л
D-глюкоза	L-арабиноза	D-ксилоза		
10%	-	-	33.8	13.0
-	10%	-	30.5	14.2
-	-	10%	Отсутствие роста	-
5%	5%	-	29.0	13.6
5%	-	5%	32.6	7.8
5%	2.5%	2.5%	28.9	10.2
5%	1.25%	3.75%	28.0	6.6
5%	3.75%	1.25%	29.0	13.9
2.5%	3.75%	3.75%	25.7	9.0

Как видно из Таблицы 3, штамм E.coli 80 - продуцент L-гистидина способен эффективно утилизировать пентозы в смеси с глюкозой и продуцировать L-гистидин в количестве, сравнимом с количеством L-гистидина, получающемся при ферментации с использованием только глюкозы.

Пример 3. Получение L-треонина с использованием бактерии-продуцента L-треонина методом ферментации смеси глюкозы и пентоз.

В качестве штамма для продукции L-треонина методом ферментации смеси глюкозы и пентоз использовали штамм E.coli TDH6/pVIC40 (ВКПМ В-3996) - продуцент L-треонина. Штамм E.coli TDH6/pVIC40 подробно описан в патенте США 5175107.

Для получения посевной культуры штамм выращивали на роторной мешалке (250 об/мин) при 32°C в течение 18 часов в пробирках объемом 40 мл (Ø 18 мм), содержащих 2 мл L-бульона с 4% глюкозой. Затем в среду для ферментации добавляли 2 мл (5%)

посевого материала. Ферментацию проводили на роторной мешалке (250 об/мин) при 32 °С в течение 24 часов в пробирках объемом 40 мл, содержащих 2 мл среды для ферментации.

После процедуры выращивания накопленное в среде количество L-треонина определяли методом ТСХ. Хроматографию пластин, покрытых слоем силикагеля Сорбфил (АО Сорбполимер, Краснодар, Россия), проводили в подвижной фазе пропан-2-ол:ацетон: вода:водный аммоний (25%) = 25:25:7:6 (v/v). В качестве визуализирующего агента использовали раствор нингидрина (2%) в ацетоне. Результаты (данные по крайней мере 3 независимых экспериментов) приведены в Таблице 4.

Состав среды для ферментации (г/л):

Углеводы	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.4
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ ×5H ₂ O	0.02
Тиамин HCl	0.0002
Дрожжевой экстракт	1.0
CaCO ₃	20.0

Сахара и сульфат магния стерилизовали отдельно. CaCO₃ стерилизовали при 180°С в течение 2 часов. Значение pH соответствовало 7.0. Антибиотик добавляли в среду после стерилизации.

Таблица 4.				
Углеводы			OD ₄₅₀	L-треонин, г/л
D-глюкоза	L-арабиноза	D-ксилоза		
4%	-	-	13.8±0.5	14.1±1.0
-	4%	-	15.8±0.2	14.9±0.4
-	-	4%	13.1±0.1	16.6±0.1
2%	2%	-	13.7±0.2	15.9±0.3
2%	-	2%	14.2±0.5	14.5±1.1
2%	1%	1%	13.3±0.4	15.8±0.6
1%	2%	1%	14.6±0.3	16.6±0.8
1%	1%	2%	15.6±0.7	12.4±1.9

Как видно из Таблицы 4, штамм E.coli TDH6/pVIC40 - продуцент L-треонина способен эффективно утилизировать пентозы в смеси с глюкозой и продуцировать L-треонин в количестве, сравнимом с количеством L-треонина, получающемся при ферментации с использованием только глюкозы.

Пример 4. Получение L-триптофана с использованием бактерии-продуцента L-триптофана методом ферментации смеси глюкозы и пентоз.

В качестве штамма для продукции L-триптофана методом ферментации смеси глюкозы и пентоз использовали штамм E.coli SV164(pGH5) - продуцент L-триптофана. Штамм E.coli SV164(pGH5) подробно описан в патенте США 6180373 и Европейском патенте 0662143.

Для получения посевной культуры штамм выращивали на роторной мешалке (250 об/мин) при 37°С в течение 18 часов в пробирках объемом 40 мл (Ø 18 мм), содержащих 3 мл L-бульона с 4% глюкозой и 20 мг/мл тетрациклина (маркер для плазмиды pGH5). Затем к 3 мл среды для ферментации, содержащей тетрациклин (20 мг/мл), в пробирках 20×200 мл добавляли 0.3 мл полученного посевного материала и выращивали при 37°С в течение 48 часов на роторной мешалке (250 об/мин).

Состав среды для ферментации приведен в Таблице 5.

Таблица 5.		
Секция	Компонент	Конечная концентрация, г/л
A	KH ₂ PO ₄	1.5

5

10

15

	NaCl	0.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5
	L-метионин	0.05
	L-фенилаланин	0.1
	L-тирозин	0.1
	Матено (общий азот)	0,07
B	Глюкоза	40.0
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.3
C	CaCl ₂	0.011
D	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0.075
	Цитрат натрия	1.0
E	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.00015
	H ₃ BO ₃	0.0025
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.00007
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.00025
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	0.0016
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.0003
F	Тиамин HCl	0.005
G	CaCO ₃	30.0
H	Пиридоксин	0.03

20

Секция А имела pH 7.1, установленный с помощью NH₄OH. Каждую секцию стерилизовали отдельно.

25

После процедуры выращивания накопленное в среде количество L-триптофана определяли методом ТСХ. Для этого использовали пластины для ТСХ 10×15 см, покрытые слоем силикагеля Сорбфил (0.11 мм) без флуоресцентного красителя (АО Сорбполимер, Краснодар, Россия). Хроматографию пластин проводили в подвижной фазе пропан-2-ол: этилацетат:водный аммоний (25%):вода = 40:40:7:16 (v/v). В качестве визуализирующего агента использовали раствор нингидрина (2%) в ацетоне. Результаты (данные по крайней мере трех независимых экспериментов) представлены в Таблице 6.

30

Таблица 6.				
Углеводы			OD ₅₆₀	L-триптофан, г/л
D-глюкоза	L-арабиноза	D-ксилоза		
4%	-	-	10.5±0.1	4.7±0.2
-	4%	-	1.6±0.1	Следовые количества
-	-	4%	0.7±0.1	Следовые количества
2%	2%	-	9.1±1.0	5.2±0.1
2%	-	2%	9.1±0.2	3.8±0.1
-	2%	2%	6.2±1.1	0.9±0.1
1.33%	1.33%	1.33%	9.2±0.3	4.4±0.1
0.4%	1.8%	1.8%	3.6±0.2	3.8±0.1

35

40

Как видно из Таблицы 6, штамм E.coli SV164(pGH5) - продуцент L-триптофана способен эффективно утилизировать пентозы в смеси с глюкозой и продуцировать L-триптофан в количестве, сравнимом с количеством L-триптофана, получающемся при ферментации с использованием только глюкозы.

45

Формула изобретения

50

1. Способ получения L-аминокислот, включающий стадии выращивания бактерии, принадлежащей к роду Escherichia, - продуцента L-аминокислоты в питательной среде - и выделения полученной и накопленной L-аминокислоты из культуральной жидкости, отличающийся тем, что питательная среда содержит смесь глюкозы и пентоз.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что пентозами являются арабиноза и ксилоза.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что смесь сахаров является сырьем для

ферментации, полученным из биомассы целлюлозы.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что бактерия - продуцент L-аминокислоты - модифицирована с целью повышения степени утилизации пентоз.

5 5. Способ по п.1, отличающийся тем, что получаемой L-аминокислотой является L-изолейцин.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанная бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-изолейцина.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что получаемой L-аминокислотой является L-гистидин.

10 8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанная бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-гистидина.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что получаемой L-аминокислотой является L-треонин.

15 10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-треонина.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что получаемой L-аминокислотой является L-триптофан.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанная бактерия обладает повышенной экспрессией генов биосинтеза L-триптофана.

20

25

30

35

40

45

50