



(51) МПК
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)

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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2007135818/13, 27.09.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.09.2007

(43) Дата публикации заявки: **10.04.2009**

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

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 1033407 A1, 06.09.2000. YAMAMOTO Y. et. al. SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. RNA. 2003 Apr; 9(4): 408-18. RU 2276687 C2, 20.05.2006. RU 2202607 C2, 20.04.2003.

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

**Шакулов Рустэм Саидович (RU),
 Клячко Елена Витальевна (RU),
 Дорошенко Вера Георгиевна (RU),
 Айрих Лариса Готлибовна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИИ, ПРИНАДЛЕЖАЩЕЙ К РОДУ *Escherichia*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения L-аминокислоты, включающий выращивание бактерии и выделение указанной L-аминокислоты из культуральной жидкости. При этом бактерия-продуцент представляет собой бактерию, принадлежащую к роду *Escherichia*, содержащую ДНК, включающую ген, кодирующий фермент бактерии, который влияет на биосинтез указанной L-аминокислоты, и транскрибируемый фрагмент ДНК, кодирующий пептид SsrA. Изобретение касается также

способа получения сложного эфира низших алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина, включающего выращивание вышеуказанной бактерии в питательной среде, выделение L-фенилаланина, и синтез сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина из аспарагиновой кислоты или ее производных и полученного L-фенилаланина. Изобретение позволяет получать L-аминокислоты и сложные эфиры низших алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина с высокой степенью эффективности. 3 н. и 7 з.п. ф-лы, 5 ил., 2 табл.

RU 2 3 9 6 3 3 6 C 2

RU 2 3 9 6 3 3 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)*C12N 15/00* (2006.01)*C12P 13/04* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2007135818/13, 27.09.2007**(24) Effective date for property rights:
27.09.2007(43) Application published: **10.04.2009**(45) Date of publication: **10.08.2010 Bull. 22**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Shakulov Rustehm Saidovich (RU),
Kljachko Elena Vital'evna (RU),
Doroshenko Vera Georgievna (RU),
Ajrikh Larisa Gotlibovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD OF PRODUCING AMINO ACIDS USING Escherichia GENUS BACTERIA**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and is a method of producing L-amino acid which involves growing bacteria and extracting said L-amino acid from the culture fluid. The bacteria producer is bacteria belonging to the Escherichia genus which contains DNA which contains a gene which codes a ferment of bacteria which has an effect on biosynthesis of the said L-amino acid, and a transcribable DNA fragment which codes the SsrA

peptide. The invention also pertains to a method of producing an ester of lower alkyls α -L-aspartyl-L-phenylalanine, involving growing the said bacteria in a culture medium, extraction of L-phenylalanine and synthesis of the ester of lower alkyl α -L-aspartyl-L-phenylalanine from aspartic acid or its derivatives and the obtained L-phenylalanine.

EFFECT: invention enables highly efficient production of L-amino acid and esters of lower alkyls α -L-aspartyl-L-phenylalanine.

10 cl, 4 dwg, 2 tbl, 3 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область техники

5 Настоящее изобретение относится к способу получения L-аминокислоты путем ферментации, более конкретно к генам, способствующим этой ферментации. Данные гены полезны для увеличения продукции L-аминокислот, в частности L-фенилаланина и L-гистидина.

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
25 обратному ингибированию продуцируемой L-аминокислотой (см., например, заявка РСТ WO 95/16042 или патенты США 4,346,170; 5,661,012 и 6,040,160) и конструирование бактериальных штаммов, в которых отсутствуют гены, обеспечивающие использование
30 предшественников целевых соединений для других путей биосинтеза, или конструирование бактериальных штаммов, в которых отсутствуют гены, ответственные за деградацию целевых соединений.

35 Эти манипуляции обычно приводят к получению штаммов, которые не могут расти, растут только со значительно меньшей скоростью или для их роста требуются дополнительные питательные вещества, такие как аминокислоты. Например, усиление экспрессии некоторых генов может стать избыточным и могло бы привести к
40 значительному ингибированию роста бактерии и, как результат, к снижению способности бактерии к продукции целевого соединения.

45

50

Возможный подход для избежания описанных выше трудностей- оптимизация экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в распределение потоков углерода, азота или фосфора или в выведение из клетки целевого соединения.

5 Эта цель часто достигается введением мутации в последовательности промоторов генов пути биосинтеза аминокислот или нуклеиновых кислот (Европейская патентная заявка EP1033407A1), получением библиотеки синтетических промоторов различной силы
10 (Jensen P.R., and Hammer K., Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64, No.1. 82-87 Biotechnol. Bioeng., 1998, 58, 2-3, 191-5) и конструированием библиотеки искусственных промоторов (международная заявка PCT WO03089605).

15 Известно, что присоединение к концу белка пептида *ssrA*, кодируемого РНК *SsrA*, приводит к тому, что белок оказывается меченым для протеолитической деградации (Gottesmann S. and al, Genes&Dev.,12:1338-1347(1998)). Функция РНК *SsrA* (синонимы: *SsrA*, *tmRNA*, *10Sa RNA*, транспортная-матричная РНК, *SipB*, B2621) состоит в
20 освобождении рибосомы от мРНК в случае приостановки процесса трансляции на дефектной мРНК, в которой отсутствует стоп-кодон, при этом *SsrA* в процессе тран- трансляции функционирует и как тРНК, и как мРНК. *SsrA* также опосредует освобождение
25 рибосомы в случае приостановки процесса трансляции из-за нехватки соответствующей тРНК (Hayes C.S. and al, PNAS, 99(6):3440-3445(2002)). *SsrA* также активна в случае возникновения других проблем при трансляции. Кроме того, РНК *SsrA* стимулирует деградацию дефектных мРНК (Yamamoto Y. et al, RNA, 9:408-418 (2003)).

30 РНК *SsrA* содержит тРНК-подобную структурную область, которая процессируется РНКазой Р и аминокацилируется аланил-тРНКсинтетазой (Komine Y et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 (20):9223-7 (1994)). РНК *SsrA* также содержит область, функционирующую в
35 качестве матричной РНК, кодирующую транслируемый «хвост», который добавляется к образующемуся белку, в результате белок становится мишенью для ферментов, осуществляющих деградацию (Tu G.-F.and al, J Biol Chem, 270(16):9322-9326 (1995)).
40 Структура РНК *SsrA* и механизм трансляции детально изучены (Corvaisier S. et al, J Biol Chem, 278(17):14788-97(2003)). РНК *SsrA* после транскрипции представляет собой более длинный предшественник, который затем процессируется в зрелую форму РНК.

45 *SsrA* имеет сходство с РНК из *Mycoplasma capricolum*, *Bacillus subtilis* (Muto A. and al, Genes Cells, 7(5):509-19 (2000)), *Dichelobacter nodosus*, *Synechococcus sp.* штаммы PCC6301 и PCC6803, *Thermus thermophilus*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, и с

РНК из *Caulobacter crescentus*. Гены тм-РНК используются в качестве зондов при идентификации бактериальных видов (Schonhuber W. et al, BMC Microbiology, 1(1):20 (2001)).

5 В настоящее время нет сообщений, описывающих использование присоединения к концу белка пептида SsrA для получения L-аминокислот, например, L-фенилаланина или L-гистидина. В частности, ранее не описано использование бактерии семейства
10 *Enterobacteriaceae*, содержащей ДНК, кодирующую пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под SEQ ID NO: 2, или его вариант, присоединенную непосредственно к гену, кодирующему бактериальный фермент, влияющий на биосинтез L-аминокислот.

Краткое описание рисунков

На Фигуре 1 изображена схема удлинения гена *tyrA*.

20 На Фигуре 2 изображены относительные положения праймеров P1 и P2 на плазмиде pMW118-attL-Cm-attR.

На Фигуре 3 изображено конструирование фрагмента хромосомной ДНК,
25 содержащего инактивированный ген *pheA*.

На Фигуре 4 изображена схема замены локуса гена *cat* геном *pheA*.

На Фигуре 5 показано выравнивание первичных последовательностей тм-РНК-
30 кодирующего индуцирующего протеолиз пептидного «хвоста» из *Bacillus subtilis* (BACSU), *Bacillus stearothermophilus* (BACST), *Serratia marcescens* (SERMA), *Escherichia coli* (ECOLI), *Pseudomonas fluorescens* (PSEFL), *Pseudomonas chlororaphis* (PSECL), *Pseudomonas putida* (PSEUPU). Выравнивание было выполнено с использованием программы множественного
35 выравнивания PIR (<http://pir.georgetown.edu>). Идентичные аминокислоты отмечены звездочкой (*), похожие аминокислоты отмечены двоеточием (:).

Описание изобретения

40 Целями настоящего изобретения являются увеличение продуктивности штаммов-продуцентов L-аминокислот и метод получения L-аминокислот с использованием этих штаммов. Вышеназванные цели были достигнуты обнаружением того факта, что
45 присоединение пептида SsrA к ферменту, вовлеченному в синтез целевой аминокислоты, имеющей общие стадии биосинтеза с другими аминокислотами, может вести к увеличению

50

5 продукции целевой аминокислоты за счет аминокислот, имеющих с целевой
аминокислотой общие пути биосинтеза или общих предшественников. Также было
обнаружено, что присоединение пептида SsrA к ферменту, вовлеченному в распределение
10 потоков углерода между различными путями гликолиза (например между
пентозофосфатным путем и путем Энтнера-Дудорова) может увеличить продукцию
аминокислот, предшественники которых образуются в одном из путей гликолиза.
15 Обнаружено, что и в том, и в другом случае сохраняются прототрофные свойства
модифицированной бактерии.

Цель настоящего изобретения была достигнута конструированием нового варианта
гена *tyrA* и нового варианта гена *pgi*, отличающихся тем, что образующиеся белки имеют
15 на С-конце короткий пептид, кодируемый частью гена *ssrA*. Показано, что использование
такого мутантного TyrA-ssrA может увеличить продукцию L-фенилаланина, когда
мутантный ген *tyrA-ssrA* вводится в клетки штамма-производителя L-фенилаланина вместо
20 нативного гена *tyrA*. Также показано, что использование такого мутантного Pgi-ssrA может
увеличить продукцию L-гистидина, когда мутантный ген *pgi-ssrA* вводится в клетки
штамма-производителя L-гистидина вместо нативного гена *pgi*. Таким образом было
25 осуществлено настоящее изобретение.

Целью настоящего изобретения является предоставление бактерии-производителя L-
аминокислоты, принадлежащей к семейству *Enterobacteriaceae*, содержащей ДНК,
включающую ген, кодирующий фермент бактерии, который влияет на биосинтез L-
30 аминокислоты, и фрагмент ДНК, способный транскрибироваться и кодирующий пептид,
последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером
SEQ ID NO: 2, или его вариант, отличающийся тем, что указанный фрагмент присоединен к
35 3' концу указанного гена.

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

40 Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше
бактерии, при этом указанная бактерия является производителем L-фенилаланина.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше
бактерии, при этом указанным ферментом является хоризматмутаза/
45 префенатдегидрогеназа.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом указанная бактерия является продуцентом L-гистидина.

5 Также целью настоящего изобретения является предоставление описанной выше бактерии, при этом указанным ферментом является фосфоглюкозоизомераза.

10 Также целью настоящего изобретения является предоставление способа получения L-аминокислоты, включающий выращивание описанной выше бактерии в питательной среде и выделение указанной L-аминокислоты из культуральной жидкости.

Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, при этом указанной L-аминокислотой является L-фенилаланин.

15 Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, при этом указанной L-аминокислотой является L-гистидин.

20 Также целью настоящего изобретения является предоставление способа получения сложного эфира низших алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина, включающего выращивание описанной выше бактерии в питательной среде с целью образования и накопления L-фенилаланина, и синтез сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина из аспарагиновой кислоты или ее производных и полученного L-фенилаланина.

25 Также целью настоящего изобретения является предоставление описанного выше способа, дополнительно включающего этерификацию L-фенилаланина с образованием сложного эфира низшего алкила L-фенилаланина, конденсирование сложного эфира низшего алкила L-фенилаланина с производным аспарагиновой кислоты, при этом указанным производным является N-ацил-ангидрид L-аспарагиновой кислоты, выделение сложного эфира низшего алкила N-ацил- α -L-аспартил-L-фенилаланина из реакционной смеси, и гидрогенизирование сложного эфира низшего алкила N-ацил- α -L-аспартил-L-фенилаланина с образованием сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина.

Наилучший способ осуществления настоящего изобретения

1. Бактерия согласно настоящему изобретению

45 Известно, что некоторые L-аминокислоты имеют общих предшественников в процессе биосинтеза в клетке, например, ароматические аминокислоты, аминокислоты с разветвленной цепью, и т.д.. При продукции такой аминокислоты в бактериальном штамме

50

полезно сделать штамм ауксотрофным по другим аминокислотам, имеющим общего предшественника с целевой аминокислотой. Это может предотвратить отвлечение общего предшественника от пути биосинтеза целевой аминокислоты.

5 Другим методом обеспечения продукции целевой аминокислоты, в противоположность продукции аминокислот, имеющих с целевой общего предшественника, является конструирование мутаций с сохранением остаточного уровня экспрессии фермента, ответственного за синтез других аминокислот из общего предшественника. В этом случае нет необходимости добавлять в питательную среду для бактерии другую/-ие L-аминокислоту/-ы, т.к. синтез этих L-аминокислот в бактерии ослаблен.

15 Присоединение пептида SsrA к ферменту ведет к снижению активности фермента, поскольку фермент деградирует – РНК с присоединенным ssrA подвергается воздействию РНКазы Р (Komine Y et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 (20):9223-7 (1994)), а фермент с присоединенным пептидом ssrA подвергается протеолизу под воздействием протеаз ClpXP и ClpAP (Wah D.A. et al, Chem. Biol., 9(11):1237-45 (2002)). Такая модификация путем присоединения ssrA позволяет сохранить прототрофные свойства модифицированной бактерии, проявляя фенотип мутации с сохранением остаточного уровня экспрессии (“leaky”). Также присоединение SsrA позволяет снизить уровень побочных продуктов путем снижения активности одного или нескольких ферментов, вовлеченных в биосинтез этих побочных продуктов.

30 Согласно настоящему изобретению, «бактерия-производитель 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. Способность к продукции L-аминокислоты может быть придана или усилена искусственно. Используемый здесь термин «бактерия-производитель L-аминокислоты» также означает бактерию, которая способна к продукции L-аминокислоты и вызывает накопление L-аминокислоты в ферментационной среде в больших количествах по сравнению с природным или родительским штаммом *E. coli*, таким, как штамм *E. coli* K-12, и предпочтительно означает, что указанный микроорганизм способен накапливать в среде целевую L-аминокислоту в количестве не менее, чем 0.5 г/л, более предпочтительно, не менее, чем 1.0 г/л. Термин «L-аминокислоты» 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. L-гистидин особенно предпочтителен. Ароматические аминокислоты, такие как L-фенилаланин, L-триптофан и L-тирозин более предпочтительны и L-фенилаланин наиболее предпочтителен.

Семейство *Enterobacteriaceae* включает в себя бактерии, принадлежащие к родам *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *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.

Бактерия настоящего изобретения включает штамм, принадлежащий к семейству *Enterobacteriaceae*, способный к продукции L-аминокислот и модифицированный путем присоединения к 3'-концу гена, кодирующего фермент бактерии, фрагмента ДНК, содержащего часть гена *ssrA*. Часть гена *ssrA* кодирует пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2 или его вариант, а фермент бактерии вовлечен в путь биосинтеза L-аминокислоты, имеющей общего предшественника с целевой L-аминокислотой. Кроме того, бактерия настоящего изобретения включает штамм, принадлежащий к семейству *Enterobacteriaceae*, способный к продукции L-аминокислот и

трансформированный фрагментом ДНК, кодирующим часть гена *ssrA*, таким образом, чтобы экспрессировался кодируемый этой ДНК пептид.

5 Ген *ssrA* (синонимы: ECK2617, b2621, sipB) кодирует тмРНК(синонимы: SsrA, 10Sa RNA, транспортная-матричная РНК, SipB, B2621). Ген *ssrA* (нуклеотиды с 2753615 по 2753977 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *smpB* и геном *intA* на хромосоме штамма 10 *E. coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *ssrA* из *Escherichia coli* приведена в Перечне последовательностей под номером 1 (SEQ ID NO: 1). Последовательность кодируемого тмРНК индуцирующего протеолиз концевое пептида приведена в Перечне последовательностей под номером 2 (SEQ ID NO: 2). Этот пептид кодируется 15 нуклеотидами в положениях с 90 по 119 в гене *ssrA*, представленном в SEQ ID NO: 1. Также изучены другие гены *ssrA*, такие как: кодируемый тмРНК индуцирующий протеолиз концевой пептид из *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Serratia marcescens*, 20 *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis* и *Pseudomonas putida*.

Может использоваться бактерия, способная к параллельной продукции двух L-аминокислот, имеющих общего предшественника. Цель настоящего изобретения была достигнута путем использования штамма, предварительно модифицированного для 25 параллельной продукции двух аминокислот, а именно L-фенилаланина и L-тирозина. Такой штамм может быть получен путем разрушения двойного регулятора транскрипции, а именно, гена *tyrR*, с использованием стандартного метода Red-зависимой рекомбинации. 30 Делеция гена *tyrR* может быть подтверждена методом ПЦР с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК трансформированного штамма. Может использоваться бактерия, способная к продукции L-аминокислот, и предпочтительна бактерия, способная к 35 параллельной продукции фенилаланина и тирозина, примером такого штамма является *E.coli* MG1655 $\Delta tyrR$. Штамм *E. coli* MG1655 $\Delta tyrR$ был получен путем замены хромосомного гена *tyrR* кассетой ДНК, содержащей маркер Cm^R с последующим вырезанием маркера путем использования стандартной техники, описанной в 40 международной заявке WO 05/010175. Также включен и описан штамм- продуцент L-гистидина, в котором ген *pgi* модифицирован путем присоединения пептида *ssrA* для увеличения потока D-глюкозо-6-фосфата по пентозофосфатному пути с целью увеличения 45 продукции L-гистидина.

50

Фраза “фрагмент ДНК, способный транскрибироваться и кодирующий пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, или его вариант, отличающийся тем, что указанный фрагмент присоединен к 3’-концу указанного гена” означает, что ген, кодирующий фермент бактерии, модифицирован таким образом, чтобы на 3’-конце присутствовали дополнительные, по сравнению с немодифицированным геном, например, с геном штамма дикого типа, нуклеотиды. Присутствие этого фрагмента ДНК (SEQ ID NO: 1) на 3’-конце гена, кодирующего фермент бактерии, приводит к образованию видов мРНК с добавленной последовательностью, и транслированный соответствующий белок имеет добавленный к С-концу дополнительный пептид. Фермент бактерии может быть модифицирован методами, включающими генетическую рекомбинацию, удлинение С-конца, С-концевые гибриды и т.д. Размер модифицированного ферментного белка может быть измерен, например, Вестерн-блоттингом со специфическими антителами, секвенированием белка и т.д. Фраза “присоединение фрагмента ДНК, кодирующего пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, или его вариант, к карбоксильному концу белка” также означает, что транслированный модифицированный белок экспрессируется в бактерии таким образом, что модифицированный белок деградирует с контролируемой скоростью (McGinness K.E. and al, Molecular Cell, 22: 701-707 (2006)).

Фраза “фрагмент ДНК, способный транскрибироваться” означает, что фрагмент ДНК присоединен к 3’-концу гена, кодирующего фермент бактерии, таким образом, что стоп-кодон гена, кодирующего фермент бактерии, удален, а необходимый фрагмент ДНК введен непосредственно за последним кодоном гена. Такая конструкция ДНК транскрибируется как одна транскрипционная единица, при этом кодируемая желаемым фрагментом ДНК последовательность оказывается присоединенной к мРНК представляющего интерес гена (кодирующего фермент бактерии). В результате экспрессируется белок с присоединенным пептидом SsrA.

Фраза “его вариант” в настоящем изобретении означает пептид, имеющий изменения в последовательности, будь то делеции, вставки, добавления или замены, сохраняющий желаемую активность на полезном уровне, например, полезном для снижения активности белка с присоединенным пептидом и вследствие этого увеличения продукции L-аминокислоты. Число изменений в варианте пептида зависит от положения

или типа аминокислотного остатка в первичной последовательности пептида. Число изменений может быть от 3 до 4 и предпочтительно от 1 до 2 в пептиде, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2. Эти изменения в вариантах могут иметь место в областях пептида, некритичных для его функции. Это возможно благодаря тому, что некоторые аминокислоты имеют высокую гомологию друг к другу, поэтому такие изменения не влияют на активность. Следовательно, варианты пептида могут иметь гомологию не менее 70 %, предпочтительно не менее 80 %, более предпочтительно не менее 90 %, наиболее предпочтительно не менее 95 % по отношению к полной аминокислотной последовательности, приведенной в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO. 2 при условии, что белок с присоединенным пептидом ssgA узнают протеазы, результатом чего является последующая деградация. Гомология между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена известными методами, например, с использованием компьютерной программы BLAST 2.0, которая считает три параметра: число аминокислот, идентичность и сходство.

Замена, делеция, вставка или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков должны быть консервативными мутациями, с тем, чтобы сохранялась активность. Характерными консервативными мутациями являются консервативные замены. Примеры консервативных замен включают замену Ala на Ser или Thr, замену Arg на Gln, His или Lys, замену Asn на Glu, Gln, Lys, His или Asp, замену Asp на Asn, Glu или Gln, замену Cys на Ser или Ala, замену Gln на Asn, Glu, Lys, His, Asp или Arg, замену Glu на Asn, Gln, Lys или Asp, замену Gly на Pro, замену His на Asn, Lys, Gln, Arg или Tyr, замену Ile на Leu, Met, Val или Phe, замену Leu на Ile, Met, Val или Phe, замену Lys на Asn, Glu, Gln, His или Arg, замену Met на Ile, Leu, Val или Phe, замену Phe на Trp, Tyr, Met, Ile или Leu, замену Ser на Thr или Ala, замену Thr на Ser или Ala, замену Trp на Phe или Tyr, замену Tyr на His, Phe или Trp, и замену Val на Met, Ile или Leu.

Результаты сравнения первичных последовательностей кодируемых тм-ПНК индуцирующих протеолиз присоединенных пептидов из *Bacillus subtilis* (BACSU), *Bacillus stearothermophilus* (BACST), *Serratia marcescens* (SERMA), *Escherichia coli* (ECOLI), *Pseudomonas fluorescens* (PSEFL), *Pseudomonas chlororaphis* (PSECL), *Pseudomonas putida* (PSEUPU) демонстрируют высокий уровень гомологии аминокислотной последовательности "YALAA" на N-конце (см. Фигуру 5). Возможна замена похожих

(отмеченных двоеточием) аминокислотных остатков без снижения активности пептида. Однако модификации других неконсервативных аминокислотных остатков могут вести к изменению активности кодируемого тм-РНК индуцирующего протеолиз присоединенного пептида. Аминокислотные последовательности присоединенных пептидов, указанные McGinness K.E. et al. (Molecular Cell, 22:701-707 (2006)) также могут считаться вариантом пептида настоящего изобретения.

ДНК, кодирующие по существу такие же пептиды, как компоненты присоединяемых пептидов, могут быть получены, например, модификацией нуклеотидных последовательностей ДНК, кодирующих компоненты присоединяемого пептида (SEQ ID NO: 1), например, посредством метода сайт-направленного мутагенеза, таким образом, что один или более аминокислотных остатков затрагивают делеция, замена, вставка или добавление. ДНК с описанными выше модификациями могут быть получены путем традиционных известных вызывающих мутации обработок. Такие обработки включают обработку гидроксиламином ДНК, кодирующей белки настоящего изобретения, или обработку бактерии, содержащей ДНК, УФ излучением или обработку реагентом, таким как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин) или азотистая кислота. ДНК, кодирующие по существу такие же пептиды, как присоединяемый пептид, могут быть получены экспрессией ДНК, имеющих описанные выше мутации, в соответствующих клетках и исследование активности продукта экспрессии. ДНК, кодирующие по существу такие же пептиды, как присоединяемый пептид, могут также быть получены выделением ДНК, гибридизующихся в жестких условиях с зондами, имеющими нуклеотидную последовательность, содержащую, например, нуклеотидную последовательность, представленную в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1, и кодирующих пептиды, имеющие активность присоединяемого пептида. «Жесткие условия», упоминаемые здесь, - это такие условия, при которых так называемые специфические гибриды образуются, а неспецифические гибриды не образуются. Например, жесткими являются условия, при которых ДНК с высокой гомологией, например, ДНК с гомологией не менее 50%, предпочтительно не менее 60%, более предпочтительно не менее 70%, еще более предпочтительно не менее 80%, еще более предпочтительно не менее 90% и наиболее предпочтительно не менее 95%, могут гибридизоваться друг с другом, а ДНК с меньшей гомологией, чем указано выше, не могут гибридизоваться друг с другом.

С другой стороны, жесткие условия могут быть представлены условиями, при которых ДНК может гибридизоваться 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 HybondTM N+ (Amersham) при жестких условиях-15 минут. Предпочтительна двух-, трехкратная отмывка.

В качестве зонда также может быть использована часть нуклеотидной последовательности, представленной в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1. Зонды могут быть изготовлены методом ПЦР с использованием праймеров, сконструированных на основе нуклеотидной последовательности, представленной в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1, и фрагментов ДНК, содержащих нуклеотидную последовательность, представленную в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1, в качестве матрицы.

Описанные выше замена, делеция, вставка или добавление нуклеотидов включают природные мутации (мутант или вариант), например, вследствие видовых или родовых различий бактерий, содержащих компоненты присоединяемого пептида.

Экспрессия бактериального гена с фрагментом ДНК, кодирующим пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, или его вариант, присоединенным к 3'-концу гена, может быть достигнута путем трансформации бактерии кодирующей пептид ДНК, более точно, путем введения фрагмента ДНК в хромосому бактерии за геном, кодирующим белок, без нарушения рамки считывания или предпочтительно заменой традиционными методами нативного хромосомного гена мутантным геном, кодирующим присоединяемый пептид. Трансформация бактерии ДНК приведет к формированию нового хромосомного мутантного гена, кодирующего удлиненный белок настоящего изобретения. Методы трансформации включают известные, упоминаемые здесь.

Например, следующие методы могут применяться для введения ДНК, кодирующей мутантный ген, путем генной рекомбинации. Конструируется мутантный ген, и бактерия трансформируется фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген. Затем нативный ген на хромосоме путем гомологичной рекомбинации заменяется мутантным геном и отбирается полученный штамм. Такая замена гена путем гомологичной рекомбинации может быть

осуществлена с использованием линейной ДНК- метод известен как “Red-зависимая интеграция” (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12, p 6640-6645 (2000)) или методом с использованием плазмиды, репликация которой чувствительна к температуре (U.S. Patent 6,303,383 or JP 05-007491A). Для увеличения проницаемости клеток для ДНК может быть использована описанная для *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)) обработка реципиентных клеток хлоридом кальция.

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).

В настоящем изобретении фраза “фермент бактерии, который влияет на биосинтез L-аминокислоты” означает, что фермент вовлечен в путь биосинтеза нежелательного продукта, например, продукта, имеющего общего предшественника с целевой L-аминокислотой. Фраза “фермент бактерии, вовлеченный в путь биосинтеза нежелательного продукта” означает фермент, катализирующий реакцию общего с целевой L-аминокислотой предшественника и этот предшественник превращается в нежелательный продукт. Это происходит оттого, что фермент направляет реакцию по ответвлению пути биосинтеза, которое приводит к продукции нежелательного продукта. Фраза “фермент бактерии, который влияет на биосинтез L-аминокислоты” также означает фермент, вовлеченный в путь биосинтеза побочных продуктов биосинтеза целевой L-аминокислоты. Присутствие таких побочных продуктов может вызывать значительные проблемы в процессе очистки и отрицательно влиять на продукцию целевой L-аминокислоты.

Гены, кодирующие фермент бактерии, который влияет на биосинтез L-аминокислоты являются генами, представляющими интерес в настоящем изобретении. Такие гены представлены, но не ограничиваются, геном *tyrA*, кодирующим хоризматмутазу/ префенатдегидрогеназу, геном *pgi*, кодирующим фосфоглюкозоизомеразу, геном *ilvE*, кодирующим аминотрансферазу аминокислот с разветвленной цепью, генами *ilvA* и *tdcB*, кодирующими треониндегидратазу, генами *sdaA* и *sdaB*, кодирующими треониндеаминазу, геном *argA*, кодирующим N-ацетилглутаматсинтазу, геном *argG*, кодирующим аргининосукцинатсинтазу, геном *proB*, кодирующим γ -глутамилкиназу,

геном *thrB*, кодирующим гомосеринкиназу, геном, кодирующим гомосериндегидрогеназу и т.д. В общем, любой ген, кодирующий фермент, который обеспечивает продукцию метаболита, выходящего из пути биосинтеза целевой L-аминокислоты и/или вовлеченный в образование побочного продукта, является геном, представляющим интерес в настоящем изобретении.

Хоризматмутаза/ префенатдегидрогеназа (синонимы: B2600, TugA) катализирует обратимые превращения между хоризматом и префенатом и обратимые превращения между префенатом и п-гидроксифенилпируватом, являющимся промежуточным соединением в пути биосинтеза тирозина. Превращение хоризмата - первая стадия биосинтеза как тирозина, так и фенилаланина. Модификация белка TugA путем присоединения пептида SsrA может быть полезной для снижения потока префената по пути биосинтеза L-тирозина и увеличения продукции L-фенилаланина. Активность хоризматмутазы/префенатдегидрогеназы может быть определена с использованием методики «stopped-time assay» в присутствии 2.5 мМ хоризмата или иммунодиффузного анализа комплексов фермент-антитело на чашках с агарозой (0.8%) (Rood J.I., Perrot B. et al., Eur J Biochem.; 124, 513-519 (1982)). Изучен ген *tyrA* дикого типа (синонимы: ECK2597, b2600), кодирующий хоризматмутаза / префенатдегидрогеназу *Escherichia coli*. Ген *tyrA* (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 2736970 по 2738091 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *pheA* и геном *aroF* на хромосоме штамма *E. coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *tyrA* *Escherichia coli* приведена в Перечне последовательностей под номером 3 (SEQ ID NO: 3), а аминокислотная последовательность, кодируемая геном *tyrA*, приведена в Перечне последовательностей под номером 4 (SEQ ID NO: 4).

В пути биосинтеза фенилаланина взаимопревращения между префенатом и фенилпируватом катализируются хоризматмутазой / префенатдигидратазой (синонимы: B2599, PheA), субъединица которой кодируется геном *pheA* *E. coli* (синонимы: ECK2596, b2599). Ген *pheA* (нуклеотиды с 2735767 по 2736927 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *pheL* и геном *tyrA* на хромосоме штамма *E. coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *pheA* *Escherichia coli* приведена в Перечне последовательностей под номером 5 (SEQ ID NO: 5), а аминокислотная последовательность, кодируемая геном *pheA*, приведена в Перечне последовательностей под номером 6 (SEQ ID NO: 6). Одновременная

модификация белков TugA и PheA путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезна для снижения потока хоризмата по пути биосинтеза L-тирозина и L-фенилаланина и увеличения продукции L-триптофана.

5 Фосфоглюкозоизомераза (синонимы: B4025, Pgi, глюкозо-6-фосфатизомераза, D-глюкозо-6-фосфаткетолоизомераза) катализирует взаимопревращение β -D-глюкозо-6-фосфата и D-фруктозо-6-фосфата в путях глюконеогенеза и гликолиза. Снижение
10 активности фосфоглюкозоизомеразы ведет к перераспределению потоков углерода в пользу пентозофосфатного пути, в котором образуется предшественник гистидина 5-фосфорибозил-1-пирофосфат. Активность фосфоглюкозоизомеразы может быть
15 определена, например, методом, описанным Friedberg I. (J Bacteriol., 112,3:1201-1205 (1972)) с использованием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Winkler H.H., J Bacteriol., 101, 2:470-475 (1970)). Изучен ген *pgi* дикого типа (синонимы: ECK4017, b4025), кодирующий глюкозо-6-фосфатизомеразу *Escherichia coli*. Ген *pgi* (нуклеотиды с 4,231,781 по 4,233,430
20 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *lysC* и геном *yjbE* на хромосоме штамма *E. coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *pgi* *Escherichia coli* приведена в Перечне
25 последовательностей под номером 7 (SEQ ID NO: 7), а аминокислотная последовательность, кодируемая геном *pgi*, приведена в Перечне последовательностей под номером 8 (SEQ ID NO: 8).

30 Аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью (синонимы: B3770, IlvE) катализирует серию реакций трансаминирования, в каждой из которых образуются α -кетоглутарат и одна из трех алифатических аминокислот с разветвленной цепью. Модификация белка IlvE путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезна для
35 снижения потока 2-кетоизовалерата по пути биосинтеза L-валина, это также ведет к снижению выхода L-изолейцина как побочного продукта, и увеличению продукции L-лейцина. Активность аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью может быть
40 измерена, например, методом, описанным Lee-Peng FC et al (J. Bacteriol., 139(2); 339-45 (1979)). Изучен ген *ilvE* дикого типа (синонимы: ECK3762, b3770, треониндеаминаза, L-треонингидролаза), кодирующий аминотрансферазу аминокислот с разветвленной
45 *Escherichia coli*. Ген *ilvE* (нуклеотиды с 3,950,507 по 3,951,436 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *ilvM* и геном *ilvD* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

50

Треониндегидратаза (синонимы: B3772, Ile, IlvA) катализирует деаминацию L-треонина. Модификация белка IlvA путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для предотвращения деградации L-треонина и снижения потока L-треонина по пути биосинтеза L-изолейцина, а также полезной для повышения продукции L-аргинина. Активность треониндегидратазы может быть измерена, например, методом, описанным Eisenstein, E. (J. Biol. Chem., 266(9); 5801-7 (1991)). Изучен ген дикого типа *ilvA* (синонимы: ECK3764, b3772, ile), кодирующий треониндегидратазу *Escherichia coli*. Ген *ilvA* (нуклеотиды с 3,953,354 по 3,954,898 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *ilvD* и геном *ilvY* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

Треониндегидратаза (синонимы: B3117, Tdc, TdcB, треониндеаминаза, L-сериндегидратаза, сериндеаминаза, L-треонингидролаза) катализирует деаминацию L-треонина. Модификация белка TdcB путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для предотвращения деградации L-треонина и снижения потока L-треонина по пути биосинтеза L-изолейцина. Изучен ген дикого типа *tdcB* (синонимы: ECK3106, b3117, tdc), кодирующий треониндегидратазу *Escherichia coli*. Ген *tdcB* (нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам с 3,263,061 по 3,264,050 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *tdcC* и геном *tdcA* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

Треониндеаминазы SdaA (синонимы: B1814, SdaA, SDH1, L-SD, L-треониндеаминаза I, L-сериндегидратаза 1, SDH-1, L-SD1, дегидратаза L-гидроксиаминокислот 1, L-сериндеаминаза 1, L-серингидролизаза 1) и SdaB (синонимы: B2797, SdaB, L-треониндеаминаза II, L-сериндеаминаза 2, L-сериндегидратаза 2, SDH-2, L-SD2, L-серингидролизаза 2) катализируют деаминацию L-треонина. Модификация белка треониндеаминазы путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезно для предотвращения деградации L-треонина и снижения потока L-треонина по пути биосинтеза L-изолейцина. Изучены гены дикого типа *sdaA* (синонимы: ECK1812, b1814) и *sdaB* (синонимы: ECK2792, b2797), кодирующие треониндеаминазы *Escherichia coli*. Ген *sdaA* (нуклеотиды с 1,894,956 по 1,896,320 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *yeaB* и геном *yoaD* на хромосоме штамма *E. coli* K-12. Ген *sdaB* (нуклеотиды с 2,927,598 по 2,928,965 в

последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *sdaC* и геном *xni* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

5 N-ацетилглутаматсинтаза (синонимы: B2818, ArgA, NAGS, ацетил-СоА:L-глутамат-N-ацетилтрансфераза, N-ацетилтрансфераза аминокислот) катализирует синтез N-ацетилглутамата из L-глутамата и ацетил-СоА, что является первой стадией пути биосинтеза аргинина и орнитина. Модификация белка ArgA путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для накопления глутамата для продукции L-пролина. 10 Активность N-ацетилглутаматсинтазы может быть измерена, например, методом, описанным Marvil, D.K. and Leisinger, T. (J. Biol. Chem., 252(10); 3295-303 (1977)). Изучен ген дикого типа *argA* (синонимы: ECK2814, Arg2, Arg1, b2818), кодирующий N-ацетилглутаматсинтазу *Escherichia coli*. Ген *argA* (нуклеотиды с 2,947,264 по 2,948,595 в 15 последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *amiC* и геном *recD* на хромосоме штамма *E. coli* K-20 12.

Аргининосукцинатсинтаза (синонимы: B3172, ArgG, аргининосукцинатсинтетазы, цитруллинаспартатлигаза, L-цитруллин:L-аспартатлигаза) катализирует синтез 25 аргининосукцинат- L-аспартата и цитруллина. Модификация белка ArgG путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для продукции цитруллина. Изучен ген дикого типа *argG* (синонимы: ECK3161, b3172), кодирующий аргининосукцинатсинтазу *Escherichia coli*. Ген *argG* (нуклеотиды с 3,316,659 по 3,318,002 в последовательности с 30 инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *argR* и геном *yhbX* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

γ-Глутамилкиназа (синонимы: B0242, ProB, глутамат-5-киназа, GK, АТФ:L-35 глутамат-5-фосфотрансфераза, G5K) катализирует реакцию фосфорилирования глутамата, являющуюся первой стадией синтеза пролина. Модификация белка ProB путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для накопления глутамата для 40 продукции L-аргинина. Активность γ-глутамилкиназы может быть измерена, например, методом, описанным Smith, C.J. et al, (J. Bacteriol., 157(2); 545-51 (1984)). Изучен ген дикого типа *proB* (синонимы: ECK0243, pro(2), b0242, pro2), кодирующий γ-глутамилкиназу *Escherichia coli*. Ген *proB* (нуклеотиды с 259,612 по 260,715 в 45 последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank;

gi:49175990) расположен между геном *phoE* и геном *proA* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

Гомосеринкиназа (синонимы: B0003, ThrB, АТФ:L-гомосерин-О-фосфотрансфераза) катализирует реакцию фосфорилирования гомосерина. Модификация белка ThrB путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для продукции L-метионина.

Активность гомосеринкиназы может быть измерена, например, методом, описанным Shames, S.L. and Wedler, F.C. (Arch. Biochem. Biophys., 235(2); 359-70 (1984)). Изучен ген дикого типа *thrB* (синонимы: ECK0003, b0003), кодирующий гомосеринкиназу *Escherichia coli*. Ген *thrB* (нуклеотиды с 2,801 по 3,733 в последовательности с инвентарным номером NC_000913.2 в базе данных GenBank; gi:49175990) расположен между геном *thrA* и геном *thrC* на хромосоме штамма *E. coli* K-12.

Гомосериндегидрогеназа катализирует реакцию образования L-аспартат-полуальдегида из гомосерина. В *Escherichia coli* гомосериндегидрогеназа является частью белка аспартаткиназы/гомосериндегидрогеназы, кодируемого геном *thrA*. Однако в других микроорганизмах, таких как *Corynebacteria*, гомосериндегидрогеназа является отдельным ферментом. Модификация гомосериндегидрогеназы путем присоединения пептида *ssrA* может быть полезной для продукции L-лизина.

Гены *ssrA*, *tyrA*, *pheA*, *pgi*, *ilvE*, *ilvA*, *tdcB*, *sdaA*, *sdaB*, *argA*, *argG*, *proB*, *thrB* и другие представляющие интерес гены могут быть получены с использованием ПЦР (полимеразная цепная реакция; White, T.J. et al., *Trends Genet.*, 5, 185 (1989)) с использованием праймеров, сконструированных на основе известных нуклеотидных последовательностей генов. Гены, кодирующие присоединяемые пептиды, из других микроорганизмов могут быть получены сходным образом.

Вышеописанные способы для присоединения способного транскрибироваться фрагмента ДНК, кодирующего пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, или его вариант, к 3'-концу гена, кодирующего хоризматмутазу/префенатдегидрогеназу и фосфоглюкозоизомеразу, могут быть сходным образом применимы для модификации активности других белков, кодируемых другими представляющими интерес генами.

Бактерия настоящего изобретения может быть получена введением вышеупомянутых ДНК в бактерию, уже обладающую способностью к продукции L-аминокислоты. С другой стороны, бактерия согласно настоящему изобретению может быть

получена путем придания бактерии, которая уже содержит эти ДНК, способности к продукции L-аминокислот.

5 Бактерия-продуцент L-аминокислоты

В настоящем изобретении может использоваться бактерия, способная к продукции ароматической или неароматической L-аминокислоты.

10 Бактерия-продуцент L-фенилаланина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-фенилаланина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* AJ12739 (*tyrA*::Tn10, *tyrR*) (ВКМП В-8197); штамм HW1089 (ATCC-55371), содержащий ген *pheA34* (патент США 5354672); мутантный штамм MWEC101-b (KR8903681); штаммы NRRL В-12141, NRRL В-12145, NRRL В-12146 и NRRL В-12147 (патент США 4407952) и пободные им. Также в качестве родительских штаммов могут быть использованы бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, – продуценты L-фенилаланина, такие как штамм *E. coli* К-12[W3110(*tyrA*)/pPHAB] (FERM ВР-3566), штамм *E. coli* К-12[W3110(*tyrA*)/pPHAD] (FERM ВР-12659), штамм *E. coli* К-12[W3110(*tyrA*)/pPHATerm] (FERM ВР-12662) и штамм *E. coli* К-12[W3110(*tyrA*)/pBR-*aroG4*, pACMAB], названный как AJ12604 (FERM ВР-3579) (Европейский патент EP488424В1). Кроме того, также могут быть использованы бактерии-продуценты L-фенилаланина, принадлежащие к роду *Escherichia* с повышенной активностью белков, кодируемых геном *yedA* или геном *yddG* (патентные заявки США 2003/0148473 А1 и 2003/0157667 А1).

35 Бактерия-продуцент L-гистидина

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

50

США 6344347); штамм *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (Европейский патент 1085087); штамм *E. coli* AI80/pFM201 (патент США 6258554) и подобными им.

5 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
10 (*hisG*), фосфорибозил-АМФ-циклогидролазу (*hisI*), фосфорибозил-АТФ-фосфогидролазу (*hisIE*), фосфорибозилформимино-5-аминоимидазолкарбоксамидриботидизомеразу (*hisA*), амидотрансферазу (*hisH*), гистидинолфосфатаминотрансферазу (*hisC*), гистидинолфосфатазу (*hisB*), гистидинолдегидрогеназу (*hisD*) и т.д.

15 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*)
20 (патенты РФ. 2003677 и 2119536).

25 Специфические примеры штаммов, обладающих способностью к продукции L-гистидина, включают *E. coli* FERM-P 5038 и 5048, в которые был введен вектор, содержащий ДНК, кодирующую фермент биосинтеза L-гистидина (заявка Японии 56-005099 А), штаммы *E. coli*, в которые введен ген *rht*, для экспорта аминокислоты (европейская заявка EP1016710А), штамм *E. coli* 80, которому придана устойчивость к сульфатуанидину, DL-1,2,4-триазол-3-аланину и стрептомицину (ВКПМ В-7270, патент
30 РФ. 2119536), и т.д.

35 Бактерия-продуцент L-триптофана

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-триптофана согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются бактериями-продуцентами L-триптофана, принадлежащими к роду
40 *Escherichia*, такими как штаммы *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) и JP6015/pMU91 (DSM10123), лишённые активности триптофанил-тРНК синтетазы, кодируемой мутантным геном *trpS* (патент США 5756345); штамм *E. coli* SV164 (pGH5), содержащий аллель *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, не ингибируемую серином по типу обратной
45 связи и аллель *trpE*, кодирующий антранилатсинтазу, не ингибируемую триптофаном по

50

типу обратной связи (патент США 6180373); штаммы *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) и AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), в которых отсутствует активность триптофаназы (патент США 4371614); штамм *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, в котором усилена способность к синтезу фосфоенолпирувата (заявка РСТ WO9708333, патент США 6319696), и подобные им. Также могут быть использованы бактериипродуценты L-триптофана принадлежащие к роду *Escherichia*, в которых увеличена активность белка, кодируемого геном *yedA* или геном *yddG* (заявки на патент США 2003/0148473 A1 и 2003/0157667 A1).

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактериипродуцента L-триптофана, согласно настоящему изобретению, также включают в себя штаммы, в которых увеличена активность одного или нескольких ферментов, выбранных из группы, состоящей из антранилатсинтазы, фосфоглицератдегидрогеназы, и триптофансинтазы. И антранилатсинтаза, и фосфоглицератдегидрогеназа подвержены ингибированию L- триптофаном и L- серином по типу обратной связи, так что в эти ферменты могут быть введены мутации, снижающие чувствительность к ингибированию по типу обратной связи. Специфические примеры штаммов с такой мутацией включают *E. coli* SV164, антранилатсинтаза которой не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи, и штамм-трансформант, полученный введением в *E. coli* SV164 плазмиды pGH5 (заявка РСТ WO 94/08031), которая содержит мутантный ген *serA*, кодирующий фосфоглицератдегидрогеназу, которая не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактериипродуцента L-триптофана, согласно настоящему изобретению, также включают в себя штаммы, в которые введен триптофановый оперон, содержащий ген, кодирующий антранилатсинтазу, которая не чувствительна к ингибированию по типу обратной связи (заявка Японии 57-71397 А, заявка Японии 62-244382 А, патент США 4,371,614). Кроме того, способность к продукции L-триптофана может быть придана путем усиления экспрессии гена (из триптофанового оперона) , кодирующего триптофансинтазу (*trpBA*). Триптофансинтаза состоит из двух субъединиц α и β , которые кодируются *trpA* и *trpB* соответственно. Кроме того, способность к продукции L-триптофана может быть увеличена усилением экспрессии оперона изоцитратлиазы-малатсинтазы (заявка РСТ WO2005/103275).

Бактерия-продуцент L-валина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-валина, согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, штаммы, модифицированные с целью сверхэкспрессии оперона *ilvGMEDA* (патент США 5998178). Желательно удалить область оперона *ilvGMEDA*, которая необходима для ослабления экспрессии, с тем чтобы экспрессия оперона не ослаблялась образующимся L-валином. Далее, желательно разрушить в опероне ген *ilvA* с тем чтобы снизить активность треониндеаминазы.

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

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

Бактерия-продуцент L-изолейцина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-изолейцина, согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, мутантные штаммы с устойчивостью к б-диметиламинопурина (заявка Японии 5-304969А), мутантные штаммы с устойчивостью к аналогу изолейцина, такому как тиаизолейцин и гидроксамат изолейцина, и мутантные штаммы, дополнительно имеющие устойчивость к DL-этионину и/или гидроксамату аргинина (заявка Японии 5-130882А). Кроме того, в качестве родительских штаммов также могут использоваться рекомбинантные штаммы, трансформированные генами, кодирующими белки, вовлеченные в биосинтез L-изолейцина, такие как треониндеаминаза и ацетогидроксатсинтаза (заявка Японии 2-458А, патент Франции 0356739 и патент США 5998178).

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, β -2-тиенилаланин, 3-гидроксилейцин, 4-азалейцин и 5,5,5-трифлуоролейцин (выложенные патентные заявки Японии 62-34397 и 8-70879), штаммы *E. coli*, полученные с помощью генно-инженерных методов, описанных в заявке РСТ 96/06926; *E. coli* штамм H-9068 (JP8-70879A), и подобные им.

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 *ygaZH*) (европейская заявка EP 1239041 A2).

Бактерия-продуцент L-аргинина

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-аргинина согласно настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваются штаммами, принадлежащими к роду *Escherichia*, такими как штамм *E. coli* 237 (ВКПМ В-7925) (патентная заявка США 2002/058315 A1) и его производные, содержащие мутантную N-ацетилглутаматсинтазу (патентная заявка РФ 2001112869), штамм *E. coli* 382 (ВКПМ В-7926) (Европейская патентная заявка EP1170358A1), штамм-продуцент аргинина, в который введен ген *argA*, кодирующий N-ацетилглутаматсинтазу (Европейская патентная заявка EP1170361A1), и подобные им.

Примеры родительских штаммов, используемых для получения бактерии-продуцента L-аргинина, согласно настоящему изобретению, также включают в себя штаммы, в которых усилена экспрессия одного или нескольких генов, кодирующих ферменты биосинтеза L- аргинина. Примеры ферментов биосинтеза L- аргинина.

50

включают N-ацетилглутамилфосфатредуктазу (*argC*), орнитинацетилтрансферазу (*argJ*), N-ацетилглутаматкиназу (*argB*), ацетилорнитинтрансминазу (*argD*), орнитинкарбамоилтрансферазу (*argF*), синтетазу аргининсукциниловой кислоты (*argG*), лиазу аргининсукциниловой кислоты (*argH*), и карбамоилфосфатсинтетазу (*carAB*).

Бактерия-продуцент L-цитруллина

Примеры родительских штаммов для получения бактерий, продуцирующих L-цитруллин, настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, штаммы, принадлежащие к роду *Escherichia*, содержащие мутантную, устойчивую к ингибированию по типу обратной связи карбамоилфосфатсинтетазу (патент США 6,991,924) и т.п.

2. Способ согласно настоящему изобретению.

Способом согласно настоящему изобретению является способ получения L-аминокислоты, включающий стадии выращивания бактерии согласно настоящему изобретению в питательной среде с целью продукции и накопления L-аминокислоты в питательной среде, и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости.

Согласно настоящему изобретению выращивание, выделение и очистка L-аминокислоты из культуральной или подобной ей жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам ферментации, в которых аминокислота продуцируется с использованием бактерии.

Питательная среда, используемая для выращивания, может быть как синтетической, так и натуральной, при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, минеральные добавки и, если необходимо, соответствующее количество питательных добавок, необходимых для роста микроорганизмов. К источникам углерода относятся различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, а также различные органические кислоты. В зависимости от характера ассимиляции используемого микроорганизма, могут использоваться спирты, такие как этанол и глицерин. В качестве источника азота могут использоваться различные неорганические соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, другие соединения азота, такие как амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, ферментализат микроорганизмов. В качестве минеральных добавок могут использоваться фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия,

сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные им соединения. В качестве витаминов могут использоваться тиамин, дрожжевой экстракт и т.п.

5 Выращивание осуществляется предпочтительно в аэробных условиях, таких как 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 10 регулироваться аммиаком, карбонатом кальция, различными кислотами, основаниями и буферными растворами. Обычно, выращивание в течение от 1 до 5 дней приводит к накоплению целевой L-аминокислоты в культуральной среде.

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

20 Фенилаланин, образующийся способом настоящего изобретения может использоваться, например, для получения сложного эфира низших алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина (также называемого "аспартам"). А именно, способ настоящего 25 изобретения включает способ получения сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина с использованием L-фенилаланина в качестве сырья. Способ включает синтез сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина из L-фенилаланина, получаемого описанным выше способом настоящего изобретения, и аспарагиновой 30 кислоты или ее производных. В качестве сложных эфиров низших алкилов могут быть упомянуты метиловый эфир, этиловый эфир, пропиловый эфир и т.п.

В способе настоящего изобретения процесс синтеза сложного эфира низших 35 алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина из L-фенилаланина и аспарагиновой кислоты или ее производных никак особо не ограничивается, и может использоваться любой традиционный способ при условии, что для синтеза сложного эфира низших алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина могут использоваться L-фенилаланин или его производные. 40 Конкретно, сложный эфир низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина может быть получен, например, следующим способом (U.S. Pat. No. 3,786,039). L-фенилаланин этерифицируется с целью получения сложного эфира низшего алкила L-фенилаланина. 45 Сложный эфир низшего алкила L-фенилаланина взаимодействует с производным L-аспарагиновой кислоты, у которого аминогруппа и β -карбоксовая группа защищены, а α -

50

карбоксильная группа свободна для этерификации. К производным относятся N-ацилангидрид L-аспарагиновой кислоты, такой как N-формил-, N-карбобензоксид- или N-р-метоксикарбобензоксид- ангидрид L-аспарагиновой кислоты. При реакции конденсации образуется смесь N-ацил- α -L-аспартил-L-фенилаланина и N-ацил- β -L-аспартил-L-фенилаланина. Если реакция осуществляется в присутствии органической кислоты, константа диссоциации которой при 37 °C 10^{-4} или менее, отношение α -формы к β -форме в смеси увеличивается (Japanese Patent Laid-Open Publication No. 51-113841). Затем N-ацил- α -L-аспартил-L-фенилаланин выделяется из смеси и гидрогенизируется с целью получения α -L-аспартил-L-фенилаланина.

Примеры

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

Пример 1. Конструирование штамма *E. coli* MG1655 Δ *tyrR**tyrA*-*ssrA*, содержащего мутантный ген *tyrA*-*ssrA*.

1. Замена в *E. coli* нативного гена *pheA* и области величиной 36 нуклеотидов, локализованной в 3' области гена *tyrA*, мутантным геном *tyrA*-*ssrA*.

Для замены нативного гена *pheA* и области величиной 36 нуклеотидов, локализованной в 3'-области гена *tyrA*, фрагмент ДНК, содержащий: 1) область величиной 36 нуклеотидов, локализованную в 5' области гена *pheA*, 2) ген *cat* с сайтами *attL* и *attR*, 3) фрагмент ДНК, кодирующий маркер устойчивости к хлорамфениколу (Cm^R), 4) терминирующий кодон TAA, 5) область величиной 30 нуклеотидов, локализованную в положении с 90 по 119 гена *ssrA*, и 6) область величиной 36 нуклеотидов, локализованную в 3'-области гена *tyrA*, был интегрирован в хромосому *E. coli* MG1655 Δ *tyrR* вместо нативного гена *pheA* и 3'-области гена *tyrA* с использованием метода, описанного Datsenko K.A. and Wanner B.L. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2000, 97, 6640-6645), также называемого "Red-зависимая интеграция" (Фигура 1).

Этот фрагмент ДНК был получен с использованием двух последовательных ПЦР, при этом 5 мкл продуктов амплификации в первой ПЦР использовали в качестве матрицы во второй ПЦР.

Первый фрагмент ДНК, содержащий маркер Cm^R, кодируемый геном *cat*, был получен в ПЦР с использованием праймеров P1 (SEQ ID NO: 9) и P2 (SEQ ID NO: 10) и плазмиды pMW118-attL-Cm-attR (WO 05/010175) в качестве матрицы (Фигура 2). Праймер P1 содержит область, идентичную области величиной 36 нуклеотидов, локализованной на 5'-конце гена *pheA*, и область, комплементарную области attL величиной 27 нуклеотидов плазмиды pMW118-attL-Cm-attR. Праймер P2 содержит область, идентичную области величиной 30 нуклеотидов гена *ssrA*, и область, комплементарную attR области величиной 27 нуклеотидов плазмиды pMW118-attL-Cm-attR. Между этими двумя областями в праймер P2 был введен терминирующий кодон TAA. Использовали следующий температурный профиль для ПЦР: денатурация при 95 °C в течение 5 мин; последующие 30 циклов: 30 сек при 95 °C, 30 сек при 50 °C, 1 мин при 72 °C; и заключительная полимеризация: 5 мин при 72 °C.

Полученный ПЦР-продукт длиной 1709 п.н. был очищен в агарозном геле, затем 5 мкл очищенного продукта ПЦР использовали в качестве матрицы во второй реакции ПЦР с использованием праймеров P1 (SEQ ID NO: 9) и P3 (SEQ ID NO: 11). Праймер P3 содержит область, комплементарную области величиной 36 нуклеотидов, локализованной на 3'-конце гена *tyrA*, и область, идентичную области величиной 18 нуклеотидов, локализованной на 5'-конце праймера P2. Использовали следующий температурный профиль для ПЦР: денатурация при 95 °C в течение 5 мин; последующие 30 циклов: 30 сек при 95 °C, 30 сек при 50 °C, 1 мин при 72 °C; и заключительная полимеризация: 5 мин при 72 °C.

Полученный ПЦР-продукт длиной 1745 п.н. очищали в агарозном геле и использовали для электропорации в штамм *E. coli* MG1655 (ATCC 700926), содержащий плазмиду pKD46 с термочувствительным репликоном. Плазмида pKD46 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):6640-6645) содержит ДНК-фрагмент фага λ длиной 2154 п.н. (позиции с 31088 по 33241 нуклеотидной последовательности с инвентарным номером J02459 в базе данных GenBank), а также содержит гены λ Red-гомологичной системы рекомбинации (гены γ , β , ϵ) под контролем промотора P_{araB}, индуцируемого арабинозой. Плазмида pKD46 необходима для интеграции продукта ПЦР в хромосому штамма MG1655 Δ *tyrR* на место нативного гена и области на 3'-конце гена *tyrA* величиной 36 нуклеотидов.

Электрокомпетентные клетки были получены следующим образом: ночную культуру штамма *E. coli* MG1655 Δ *tyrR* /pKD46 выращивали при 30 °C в среде LB с добавкой ампициллина (100 мг/л), разводили в 100 раз, добавив 5 мл среды SOB (Sambrook et al, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), содержащей ампициллин и L-арабинозу (10 мМ) [арабинозу использовали для индукции плазмиды с генами Red системы]. Полученную культуру растили с перемешиванием при 30 °C до достижения OD₆₀₀≈0.6, после чего делали клетки электрокомпетентными путем концентрирования в 100 раз и трехкратного отмывания ледяной деионизированной H₂O. Электропорацию проводили с использованием 70 мкл клеток и ≈100 нг ПЦР-продукта. Для проведения электропорации использовали электропоратор “BioRad” (USA, No. 165-2098, version 2-89) в соответствии с инструкциями производителя. После электропорации клетки инкубировали в 1 мл среды SOC (Sambrook et al, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) при 37 °C в течение 2.5 часов, после чего высевали на чашки с L-агаром, содержащим 30 мкг/мл хлорамфеникола и выращивали при 37 °C для отбора Cm^R-рекомбинантов. Затем для удаления плазмиды pKD46 проводили 2 пассажа на L-агаре с Cm при 42 °C, и полученные колонии проверяли на чувствительность к ампициллину.

2. Подтверждение делеции гена *pheA* с помощью ПЦР.

После 24 ч роста клоны проверили на присутствие маркера Cm^R с помощью ПЦР с использованием локус-специфичных праймеров P4 (SEQ ID NO: 12) и P5 (SEQ ID NO: 13). Для этого свежевыращенную колонию суспендировали в воде (20 мкл), и 1 мкл полученной суспензии использовали для ПЦР. Использовали следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: денатурация при 95 °C в течение 5 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 95 °C, 30 сек при 50 °C, 1 мин при 72 °C; заключительный шаг: 5 мин при 72 °C.

Несколько проверенных Cm^R клонов содержали требуемый фрагмент 2373 п.н., что подтверждало замену области нативного гена величиной 1869 гибридным геном *tyrA-ssrA* (см. Фигуры 1 и 3). Полученный штамм был назван MG1655 Δ *tyrR* Δ *pheA::cat tyrA-ssrA*.

3. Замена гена *cat* в штамме *E. coli* MG1655 Δ *tyrR* Δ *pheA::cat tyrA-ssrA* геном дикого типа *pheA*.

Для замены гена *cat* фрагмент ДНК, содержащий ген дикого типа *pheA*, интегрировали в хромосому *E. coli* MG1655 $\Delta tyrR \Delta pheA::cat tyrA-ssrA/pKD46$ вместо гена *cat* методом, описанным Datsenko K.A. and Wanner B.L. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2000, 97, 6640-6645), также называемым “Red-зависимая интеграция”, как описано выше в секции 1
5 Примера 1 (Фигура 3).

Ген дикого типа *pheA* был получен в ПЦР с использованием хромосомной ДНК
10 *E. coli* MG1655 в качестве матрицы и праймеров P4 (SEQ ID NO: 12) и P6 (SEQ ID NO: 14).

Праймер P6 содержит область величиной 30 нуклеотидов, идентичную области, локализованной в положении от 90 до 119 гена *ssrA*, терминирующий кодон TAA и область, комплементарную 3' области гена *pheA* величиной 19 н.
15

Использовали следующий температурный профиль для ПЦР: денатурация при 95 °C в течение 5 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 95 °C, 30 сек при 50 °C, 1 мин при 72 °C; заключительный шаг: 5 мин при 72 °C.
20

Аmplифицированный фрагмент ДНК очищали с использованием электрофореза в агарозном геле, экстрагировали с использованием “GenElute Spin Columns” (“Sigma”, USA) и осаждали этанолом. Полученный фрагмент ДНК использовали для электропорации и
25 Red-зависимой интеграции в хромосому бактерии штамма *E. coli* MG1655 $\Delta tyrR \Delta pheA::cat tyrA-ssrA/pKD46$ как описано ранее. Полученный штамм *E. coli* MG1655 $\Delta tyrR tyrA-ssrA/pKD46$ отбирали на минимальной среде M9. Отсутствие в среде L-фенилаланина давало возможность селекции прототрофных клонов Phe⁺.
30

4. Подтверждение восстановления гена *pheA* с помощью ПЦР.

После 24 ч роста клоны проверяли на присутствие гена *pheA* с помощью ПЦР с
35 использованием локус-специфичных праймеров P4 (SEQ ID NO: 12) и P5 (SEQ ID NO: 13). Для этого свежевывращенную колонию суспендировали в воде (20 мкл), и 1 мкл полученной суспензии использовали для ПЦР. Использовали следующий температурный профиль для
40 ПЦР-проверки: денатурация при 95 °C в течение 5 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 95 °C, 30 сек при 50 °C, 1 мин при 72 °C; заключительный шаг: 5 мин при 72 °C.

Несколько проверенных клонов Phe⁺ содержали требуемый фрагмент ДНК величиной 1827, что подтверждало замену области гена *cat* величиной 2373 н. геном *pheA* (см. Фигуру
45 2). Полученный мутантный штамм был назван MG1655 $\Delta tyrR tyrA-ssrA/pKD46$ (Фигура 4).

Затем для удаления плазмиды рKD46 было проведено два пассажа на L-агаре с Cm при 42 °С, и были отобраны клоны, чувствительные к ампициллину.

Таким образом был получен штамм с мутантным геном *tyrA* и с отсутствующим геном *tyrR*. Этот штамм был назван MG1655 Δ *tyrR**tyrA-ssrA*.

Пример 2. Влияние присоединения фрагмента ДНК, кодирующего пептид *ssrA*, к гену *tyrA* на продукцию L-фенилаланина.

Далее штаммы *E. coli* MG1655 Δ *tyrR* *tyrA-ssrA* и MG1655 Δ *tyrR* культивировали при 37 °С в течение 18 ч на питательном бульоне, по 0.3 мл культур инокулировали в 3 мл ферментационной среды приведенного ниже состава в пробирках 20x200 мм и культивировали с перемешиванием при 32 °С в течение 72 ч.

После культивирования количество накопленного в среде L-фенилаланина и L-тирозина определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Тонкослойную пластину силикагеля (10x15 см) с нанесенной аликвотой (1-2 мкл) культуральной жидкости обрабатывали проявляющим раствором (2-пропанол : этилацетат : аммиак : вода = 16 : 16 : 3 : 9) и определяли L-фенилаланин и L-тирозин с использованием нингидринового реагента. Результаты четырех пробирочных ферментаций приведены в Таблице 1.

Состав использованной ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	16.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Дрожжевой экстракт	2.0
CaCO ₃	30.0

MgSO₄·7H₂O и CaCO₃ стерилизовали по отдельности.

Как следует из Таблицы 1, штамм MG1655 Δ *tyrR* *tyrA-ssrA* накапливал больше L-фенилаланина и меньше L-тирозина, чем штамм MG1655 Δ *tyrR*.

Пример 3. Влияние присоединения фрагмента ДНК, кодирующего пептид *ssrA*, к гену *pgi* на продукцию L-гистидина.

Были получены штаммы-продуценты L-гистидина с геном *pgi*, к которому присоединена последовательность, кодирующая присоединяемый пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, или присоединяемый пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 15. Эти два пептида различаются по одному конечному аминокислотному остатку, это либо аланин, либо валин. Данные штаммы были получены следующим образом. Сначала варианты гена *pgi*, содержащие на 3'-конце гена дополнительные нуклеотидные последовательности, кодирующие присоединяемый пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, и присоединяемый пептид, последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 15, были получены с помощью ПЦП с использованием хромосомной ДНК штамма *E. coli* MG1655 и праймеров *pgi*1 (SEQ ID NO: 16) и *pgi*-LAA (SEQ ID NO: 17) или *pgi*LVA (SEQ ID NO: 18), соответственно. Праймер *pgi*1 комплементарен 5'-области гена *pgi* и содержит на 5'-конце сайт рестрикции *Sac*I. Праймеры *pgi*-LVA и *pgi*-LAA содержат области 3'-конца гена *pgi* без терминирующего кодона, область, кодирующую короткие пептиды, последовательности которых представлены в Перечне последовательностей под номерами SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 15, соответственно, терминирующий кодон и сайт рестрикции *Xba*I на 5'-конце. Затем каждый из двух фрагментов ПЦП был обработан рестриктазами *Sac*I и *Xba*I и лигирован с плазмидой pMW119, предварительно обработанной теми же рестриктазами. Полученные плазмиды были названы pMW-*pgi*-*ssrA*^{LAA} и pMW*pgi*-*ssrA*^{LVA}, соответственно.

Затем, в штамме-продуценте L-гистидина *E. coli* 80 осуществили делецию гена дикого типа *pgi*.

С этой целью фрагмент ДНК, содержащий маркер Cm^R, кодируемый геном *cat*, получили с помощью ПЦП с использованием праймеров P7 (SEQ ID NO: 19) и P8 (SEQ ID NO: 20) и плазмиды pMW118-attL-Cm-attR (WO 05/010175) в качестве матрицы (Фигура 2). Праймер P7 содержит область, идентичную области, локализованной на 5'-конце гена *pgi*, величиной 36 н. и область, комплементарную attR области плазмиды pMW118-attL-Cm-attR, величиной 28 н. Праймер P8 содержит область, идентичную области, локализованной на 3'-конце гена *pgi*, величиной 36 н. и область, комплементарную attL области плазмиды

pMW118-attL-Cm-attR, величиной 28 н. ПЦР и введение электропорацией полученного фрагмента ДНК осуществляли как описано выше (см. Пример 1, секцию 1).

Делецию гена *pgi* подтверждали с помощью ПЦР с использованием праймеров P9 (SEQ ID NO: 21) и P10 (SEQ ID NO: 22). С этой целью свежевывращенную колонию суспендировали в воде (20 мкл) и 1 мкл этой суспензии использовали для ПЦР.

Использовали следующий температурный профиль для ПЦР-проверки: денатурация при 95 °С в течение 5 мин; профиль для 30 циклов: 30 сек при 95 °С, 30 сек при 50 °С, 1 мин 10 сек при 72 °С; заключительный шаг: 5 мин при 72 °С.

Несколько проверенных Cm^R клонов содержали требуемый фрагмент ДНК величиной 1709 п.н., что подтверждает замену нативной области гена *pgi* величиной 1651 п.н. геном *cat*. Полученный мутантный штамм был назван 80Δ*pgi*.

Полученный штамм 80 Δ*pgi* трансформировали плазмидами pMW-*pgi-ssrA*^{LAA} и pMW*pgi-ssrA*^{LVA} как описано выше. Полученные штаммы были названы 80 Δ*pgi*/pMW-*pgi-ssrA*^{LAA} и 80 Δ*pgi*/pMW*pgi-ssrA*^{LVA}, соответственно.

Для лабораторной ферментации (периодическое культивирование) по одной петле каждого из штаммов 80, 80Δ*pgi*/pMW-*pgi-ssrA*^{LAA} и 80 Δ*pgi*/pMW*pgi-ssrA*^{LVA}, выросших на L-агаре, переносили на L-бульон и культивировали при 30°C со встряхиванием (140 об/мин) до достижения культурой оптической плотности OD₅₄₀ ≈ 2.0. Затем 25 мл посевной культуры добавляли в 250 мл ферментационной среды и культивировали при 29 °С с перемешиванием (1500 об/мин). Продолжительность ферментации была около 35-40 ч. После культивирования количество накопленного в среде гистидина определяли методом бумажной хроматографии. Бумагу обрабатывали подвижной фазой следующего состава: n-бутанол - уксусная кислота - вода = 4 : 1 : 1 (v/v). Для визуализации использовали раствор нингидрина (0.5%) в ацетоне. Результаты представлены в Таблице 2. Как следует из Таблицы 2, штаммы 80 Δ*pgi*/pMW-*pgi-ssrA*^{LAA} и 80 Δ*pgi*/pMW*pgi-ssrA*^{LVA} накапливали больше L-гистидина, чем штамм 80.

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

Глюкоза	50.0
Мамено	0.2 общего азота
(NH ₄) ₂ SO ₄	8.0
КН ₂ РО ₄	0.5

	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.4
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.02
	MnSO ₄	0.02
5	Тиамин	0.001
	Бетаин	2.0
	L-пролин	0.8
10	L-глутамат	3.0
	L-аспартат	1.0
	Аденозин	0.2

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

Таблица 1.

Штамм	OD ₅₄₀	Количество L-фенилаланина, г/л	Количество L-тирозина, г/л
MG1655Δ <i>tyrR</i>	28,5 ± 0,6	0,13 ± 0,01	0,017 ± 0,002
MG1655Δ <i>tyrR tyrA-ssrA</i>	26,3 ± 0,4	0,46 ± 0,04	следы

35

Таблица 2.

Штамм	OD ₄₅₀	Количество гистидина, г/л	Выход на глюкозу, %
80 (VKPM В-7270)	31.0	9.0	18.0
80 Δ <i>pgi</i>	20.2	8.1	16.2
80 Δ <i>pgi/pMW-pgi-ssrA</i> ^{LAA}	23.2	10.7	21.4
80Δ <i>pgi/pMW-pgi-ssrA</i> ^{LVA}	22.8	10.6	21.2

50

Перечень последовательностей

<110> Ajinomoto-Genetika Research Institute

5

<120> METHOD FOR PRODUCING AMINO ACIDS USING BACTERIUM OF THE
ENTEROBACTERIACEAE FAMILY

10

<130> ssrA

<160> 22

15

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

25

<213> Escherichia coli

<400> 1

ggggctgatt ctggattcga cgggatttgc gaaacccaag gtgcatgccg aggggctggtt 60

30

ggcctcgtaa aaagccgcaa aaaatagtcg caaacgcgca aaactacgct ttagcagctt 120

aataacctgc ttagagccct ctctccctag cctccgctct taggacgggg atcaagagag 180

gtcaaaccce aaagagatcg cgtggaagcc ctgcctgggg ttgaagcggt aaaacttaat 240

35

caggctagtt tgtagtggtc gtgtccgtcc gcagctggca agcgaatgta aagactgact 300

aagcatgtag taccgaggat gtaggaattt cggacgcggg ttcaactccc gccagctcca 360

cca 363

40

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

45

<213> Escherichia coli

50

<400> 2
 Ala Ala Asn Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Ala Ala
 1 5 10

5
 <210> 3
 <211> 1122
 <212> DNA

10
 <213> Escherichia coli

<220>
 15
 <221> CDS
 <222> (1)..(1122)
 <223> tyrA

20
 <400> 3
 atg gtt gct gaa ttg acc gca tta cgc gat caa att gat gaa gtc gat 48
 Met Val Ala Glu Leu Thr Ala Leu Arg Asp Gln Ile Asp Glu Val Asp
 1 5 10 15

25
 aaa gcg ctg ctg aat tta tta gcg aag cgt ctg gaa ctg gtt gct gaa 96
 Lys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Ala Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Glu
 20 25 30

30
 gtg ggc gag gtg aaa agc cgc ttt gga ctg cct att tat gtt ccg gag 144
 Val Gly Glu Val Lys Ser Arg Phe Gly Leu Pro Ile Tyr Val Pro Glu
 35 40 45

35
 cgc gag gca tct atg ttg gcc tcg cgt cgt gca gag gcg gaa gct ctg 192
 Arg Glu Ala Ser Met Leu Ala Ser Arg Arg Ala Glu Ala Glu Ala Leu
 50 55 60

40
 ggt gta ccg cca gat ctg att gag gat gtt ttg cgt cgg gtg atg cgt 240
 Gly Val Pro Pro Asp Leu Ile Glu Asp Val Leu Arg Arg Val Met Arg
 65 70 75 80

45
 gaa tct tac tcc agt gaa aac gac aaa gga ttt aaa aca ctt tgt ccg 288
 Glu Ser Tyr Ser Ser Glu Asn Asp Lys Gly Phe Lys Thr Leu Cys Pro
 85 90 95

50
 tca ctg cgt ccg gtg gtt atc gtc ggc ggt ggc ggt cag atg gga cgc 336
 Ser Leu Arg Pro Val Val Ile Val Gly Gly Gly Gly Gln Met Gly Arg
 100 105 110

45
 ctg ttc gag aag atg ctg acc ctc tcg ggt tat cag gtg cgg att ctg 384

RU 2 396 336 C2

	Leu	Phe	Glu	Lys	Met	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gln	Val	Arg	Ile	Leu	
			115					120					125				
	gag	caa	cat	gac	tgg	gat	cga	gcg	gct	gat	att	gtt	gcc	gat	gcc	gga	432
5	Glu	Gln	His	Asp	Trp	Asp	Arg	Ala	Ala	Asp	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Gly	
		130					135					140					
	atg	gtg	att	gtt	agt	gtg	cca	atc	cac	gtt	act	gag	caa	gtt	att	ggc	480
	Met	Val	Ile	Val	Ser	Val	Pro	Ile	His	Val	Thr	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	
	145					150					155					160	
10	aaa	tta	ccg	cct	tta	ccg	aaa	gat	tgt	att	ctg	gtc	gat	ctg	gca	tca	528
	Lys	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Asp	Cys	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Ala	Ser	
					165					170					175		
	gtg	aaa	aat	ggg	cca	tta	cag	gcc	atg	ctg	gtg	gcg	cat	gat	ggt	ccg	576
	Val	Lys	Asn	Gly	Pro	Leu	Gln	Ala	Met	Leu	Val	Ala	His	Asp	Gly	Pro	
15				180					185					190			
	gtg	ctg	ggg	cta	cac	ccg	atg	ttc	ggt	ccg	gac	agc	ggt	agc	ctg	gca	624
	Val	Leu	Gly	Leu	His	Pro	Met	Phe	Gly	Pro	Asp	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	
			195					200					205				
20	aag	caa	gtt	gtg	gtc	tgg	tgt	gat	gga	cgt	aaa	ccg	gaa	gca	tac	caa	672
	Lys	Gln	Val	Val	Val	Trp	Cys	Asp	Gly	Arg	Lys	Pro	Glu	Ala	Tyr	Gln	
		210					215					220					
	tgg	ttt	ctg	gag	caa	att	cag	gtc	tgg	ggc	gct	cgg	ctg	cat	cgt	att	720
	Trp	Phe	Leu	Glu	Gln	Ile	Gln	Val	Trp	Gly	Ala	Arg	Leu	His	Arg	Ile	
25	225				230					235					240		
	agc	gcc	gtc	gag	cac	gat	cag	aat	atg	gcg	ttt	att	cag	gca	ctg	cgc	768
	Ser	Ala	Val	Glu	His	Asp	Gln	Asn	Met	Ala	Phe	Ile	Gln	Ala	Leu	Arg	
				245						250					255		
30	cac	ttt	gct	act	ttt	gct	tac	ggg	ctg	cac	ctg	gca	gaa	gaa	aat	gtt	816
	His	Phe	Ala	Thr	Phe	Ala	Tyr	Gly	Leu	His	Leu	Ala	Glu	Glu	Asn	Val	
			260					265						270			
	cag	ctt	gag	caa	ctt	ctg	gcg	ctc	tct	tcg	ccg	att	tac	cgc	ctt	gag	864
	Gln	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Pro	Ile	Tyr	Arg	Leu	Glu	
35			275				280						285				
	ctg	gcg	atg	gtc	ggg	cga	ctg	ttt	gct	cag	gat	ccg	cag	ctt	tat	gcc	912
	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Arg	Leu	Phe	Ala	Gln	Asp	Pro	Gln	Leu	Tyr	Ala	
		290					295					300					
40	gac	atc	att	atg	tcg	tca	gag	cgt	aat	ctg	gcg	tta	atc	aaa	cgt	tac	960
	Asp	Ile	Ile	Met	Ser	Ser	Glu	Arg	Asn	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	Tyr	
	305				310						315					320	
	tat	aag	cgt	ttc	ggc	gag	gcg	att	gag	ttg	ctg	gag	cag	ggc	gat	aag	1008
	Tyr	Lys	Arg	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Gly	Asp	Lys	
				325						330				335			
45	cag	gcg	ttt	att	gac	agt	ttc	cgc	aag	gtg	gag	cac	tgg	ttc	ggc	gat	1056
	Gln	Ala	Phe	Ile	Asp	Ser	Phe	Arg	Lys	Val	Glu	His	Trp	Phe	Gly	Asp	
			340						345					350			

50

RU 2 396 336 C2

tac gca cag cgt ttt cag agt gaa agc cgc gtg tta ttg cgt cag gcg 1104
 Tyr Ala Gln Arg Phe Gln Ser Glu Ser Arg Val Leu Leu Arg Gln Ala
 355 360 365

5 aat gac aat cgc cag taa 1122
 Asn Asp Asn Arg Gln
 370

<210> 4

10 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15 <400> 4

Met Val Ala Glu Leu Thr Ala Leu Arg Asp Gln Ile Asp Glu Val Asp
 1 5 10 15

20 Lys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Ala Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Glu
 20 25 30

25 Val Gly Glu Val Lys Ser Arg Phe Gly Leu Pro Ile Tyr Val Pro Glu
 35 40 45

Arg Glu Ala Ser Met Leu Ala Ser Arg Arg Ala Glu Ala Glu Ala Leu
 50 55 60

30 Gly Val Pro Pro Asp Leu Ile Glu Asp Val Leu Arg Arg Val Met Arg
 65 70 75 80

35 Glu Ser Tyr Ser Ser Glu Asn Asp Lys Gly Phe Lys Thr Leu Cys Pro
 85 90 95

Ser Leu Arg Pro Val Val Ile Val Gly Gly Gly Gly Gln Met Gly Arg
 100 105 110

40 Leu Phe Glu Lys Met Leu Thr Leu Ser Gly Tyr Gln Val Arg Ile Leu
 115 120 125

45 Glu Gln His Asp Trp Asp Arg Ala Ala Asp Ile Val Ala Asp Ala Gly
 130 135 140

50

RU 2 396 336 C2

Met Val Ile Val Ser Val Pro Ile His Val Thr Glu Gln Val Ile Gly
 145 150 155 160

5 Lys Leu Pro Pro Leu Pro Lys Asp Cys Ile Leu Val Asp Leu Ala Ser
 165 170 175

Val Lys Asn Gly Pro Leu Gln Ala Met Leu Val Ala His Asp Gly Pro
 180 185 190

10 Val Leu Gly Leu His Pro Met Phe Gly Pro Asp Ser Gly Ser Leu Ala
 195 200 205

Lys Gln Val Val Val Trp Cys Asp Gly Arg Lys Pro Glu Ala Tyr Gln
 210 215 220

15 Trp Phe Leu Glu Gln Ile Gln Val Trp Gly Ala Arg Leu His Arg Ile
 225 230 235 240

20 Ser Ala Val Glu His Asp Gln Asn Met Ala Phe Ile Gln Ala Leu Arg
 245 250 255

His Phe Ala Thr Phe Ala Tyr Gly Leu His Leu Ala Glu Glu Asn Val
 260 265 270

25 Gln Leu Glu Gln Leu Leu Ala Leu Ser Ser Pro Ile Tyr Arg Leu Glu
 275 280 285

30 Leu Ala Met Val Gly Arg Leu Phe Ala Gln Asp Pro Gln Leu Tyr Ala
 290 295 300

Asp Ile Ile Met Ser Ser Glu Arg Asn Leu Ala Leu Ile Lys Arg Tyr
 305 310 315 320

35 Tyr Lys Arg Phe Gly Glu Ala Ile Glu Leu Leu Glu Gln Gly Asp Lys
 325 330 335

40 Gln Ala Phe Ile Asp Ser Phe Arg Lys Val Glu His Trp Phe Gly Asp
 340 345 350

Tyr Ala Gln Arg Phe Gln Ser Glu Ser Arg Val Leu Leu Arg Gln Ala
 355 360 365

45 Asn Asp Asn Arg Gln
 370

50

```

<210> 5
<211> 1161
<212> DNA
5 <213> Escherichia coli

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(1161)
<223> pheA

15
<400> 5
atg aca tcg gaa aac ccg tta ctg gcg ctg cga gag aaa atc agc gcg      48
Met Thr Ser Glu Asn Pro Leu Leu Ala Leu Arg Glu Lys Ile Ser Ala
1          5          10          15

20 ctg gat gaa aaa tta tta gcg tta ctg gca gaa cgg cgc gaa ctg gcc      96
Leu Asp Glu Lys Leu Leu Ala Leu Leu Ala Glu Arg Arg Glu Leu Ala
          20          25          30

25 gtc gag gtg gga aaa gcc aaa ctg ctc tcg cat cgc ccg gta cgt gat      144
Val Glu Val Gly Lys Ala Lys Leu Leu Ser His Arg Pro Val Arg Asp
          35          40          45

att gat cgt gaa cgc gat ttg ctg gaa aga tta att acg ctc ggt aaa      192
Ile Asp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Arg Leu Ile Thr Leu Gly Lys
          50          55          60

30 gcg cac cat ctg gac gcc cat tac att act cgc ctg ttc cag ctc atc      240
Ala His His Leu Asp Ala His Tyr Ile Thr Arg Leu Phe Gln Leu Ile
65          70          75          80

att gaa gat tcc gta tta act cag cag gct ttg ctc caa caa cat ctc      288
Ile Glu Asp Ser Val Leu Thr Gln Gln Ala Leu Leu Gln Gln His Leu
35          85          90          95

aat aaa att aat ccg cac tca gca cgc atc gct ttt ctc ggc ccc aaa      336
Asn Lys Ile Asn Pro His Ser Ala Arg Ile Ala Phe Leu Gly Pro Lys
          100          105          110

40 ggt tct tat tcc cat ctt gcg gcg cgc cag tat gct gcc cgt cac ttt      384
Gly Ser Tyr Ser His Leu Ala Ala Arg Gln Tyr Ala Ala Arg His Phe
          115          120          125

gag caa ttc att gaa agt ggc tgc gcc aaa ttt gcc gat att ttt aat      432
Glu Gln Phe Ile Glu Ser Gly Cys Ala Lys Phe Ala Asp Ile Phe Asn
45          130          135          140

```

50

RU 2 396 336 C2

	cag gtg gaa acc ggc cag gcc gac tat gcc gtc gta ccg att gaa aat	480
	Gln Val Glu Thr Gly Gln Ala Asp Tyr Ala Val Val Pro Ile Glu Asn	
	145 150 155 160	
5	acc agc tcc ggt gcc ata aac gac gtt tac gat ctg ctg caa cat acc	528
	Thr Ser Ser Gly Ala Ile Asn Asp Val Tyr Asp Leu Leu Gln His Thr	
	165 170 175	
	agc ttg tcg att gtt ggc gag atg acg tta act atc gac cat tgt ttg	576
	Ser Leu Ser Ile Val Gly Glu Met Thr Leu Thr Ile Asp His Cys Leu	
	180 185 190	
10	ttg gtc tcc ggc act act gat tta tcc acc atc aat acg gtc tac agc	624
	Leu Val Ser Gly Thr Thr Asp Leu Ser Thr Ile Asn Thr Val Tyr Ser	
	195 200 205	
15	cat ccg cag cca ttc cag caa tgc agc aaa ttc ctt aat cgt tat ccg	672
	His Pro Gln Pro Phe Gln Gln Cys Ser Lys Phe Leu Asn Arg Tyr Pro	
	210 215 220	
	cac tgg aag att gaa tat acc gaa agt acg tct gcg gca atg gaa aag	720
	His Trp Lys Ile Glu Tyr Thr Glu Ser Thr Ser Ala Ala Met Glu Lys	
	225 230 235 240	
20	gtt gca cag gca aaa tca ccg cat gtt gct gcg ttg gga agc gaa gct	768
	Val Ala Gln Ala Lys Ser Pro His Val Ala Ala Leu Gly Ser Glu Ala	
	245 250 255	
25	ggc ggc act ttg tac ggt ttg cag gta ctg gag cgt att gaa gca aat	816
	Gly Gly Thr Leu Tyr Gly Leu Gln Val Leu Glu Arg Ile Glu Ala Asn	
	260 265 270	
	cag cga caa aac ttc acc cga ttt gtg gtg ttg gcg cgt aaa gcc att	864
	Gln Arg Gln Asn Phe Thr Arg Phe Val Val Leu Ala Arg Lys Ala Ile	
	275 280 285	
30	aac gtg tct gat cag gtt ccg gcg aaa acc acg ttg tta atg gcg acc	912
	Asn Val Ser Asp Gln Val Pro Ala Lys Thr Thr Leu Leu Met Ala Thr	
	290 295 300	
35	ggg caa caa gcc ggt gcg ctg gtt gaa gcg ttg ctg gta ctg cgc aac	960
	Gly Gln Gln Ala Gly Ala Leu Val Glu Ala Leu Leu Val Leu Arg Asn	
	305 310 315 320	
	cac aat ctg att atg acc cgt ctg gaa tca cgc ccg att cac ggt aat	1008
	His Asn Leu Ile Met Thr Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile His Gly Asn	
	325 330 335	
40	cca tgg gaa gag atg ttc tat ctg gat att cag gcc aat ctt gaa tca	1056
	Pro Trp Glu Glu Met Phe Tyr Leu Asp Ile Gln Ala Asn Leu Glu Ser	
	340 345 350	
45	gcg gaa atg caa aaa gca ttg aaa gag tta ggg gaa atc acc cgt tca	1104
	Ala Glu Met Gln Lys Ala Leu Lys Glu Leu Gly Glu Ile Thr Arg Ser	
	355 360 365	
50	atg aag gta ttg ggc tgt tac cca agt gag aac gta gtg cct gtt gat	1152

RU 2 396 336 C2

Met Lys Val Leu Gly Cys Tyr Pro Ser Glu Asn Val Val Pro Val Asp
 370 375 380

cca acc tga
 Pro Thr
 385

1161

5

<210> 6

<211> 386

10

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 6

Met Thr Ser Glu Asn Pro Leu Leu Ala Leu Arg Glu Lys Ile Ser Ala
 1 5 10 15

20

Leu Asp Glu Lys Leu Leu Ala Leu Leu Ala Glu Arg Arg Glu Leu Ala
 20 25 30

Val Glu Val Gly Lys Ala Lys Leu Leu Ser His Arg Pro Val Arg Asp
 35 40 45

25

Ile Asp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Arg Leu Ile Thr Leu Gly Lys
 50 55 60

30

Ala His His Leu Asp Ala His Tyr Ile Thr Arg Leu Phe Gln Leu Ile
 65 70 75 80

Ile Glu Asp Ser Val Leu Thr Gln Gln Ala Leu Leu Gln Gln His Leu
 85 90 95

35

Asn Lys Ile Asn Pro His Ser Ala Arg Ile Ala Phe Leu Gly Pro Lys
 100 105 110

40

Gly Ser Tyr Ser His Leu Ala Ala Arg Gln Tyr Ala Ala Arg His Phe
 115 120 125

Glu Gln Phe Ile Glu Ser Gly Cys Ala Lys Phe Ala Asp Ile Phe Asn
 130 135 140

45

Gln Val Glu Thr Gly Gln Ala Asp Tyr Ala Val Val Pro Ile Glu Asn
 145 150 155 160

50

RU 2 396 336 C2

Thr Ser Ser Gly Ala Ile Asn Asp Val Tyr Asp Leu Leu Gln His Thr
 165 170 175
 5 Ser Leu Ser Ile Val Gly Glu Met Thr Leu Thr Ile Asp His Cys Leu
 180 185 190
 Leu Val Ser Gly Thr Thr Asp Leu Ser Thr Ile Asn Thr Val Tyr Ser
 195 200 205
 10 His Pro Gln Pro Phe Gln Gln Cys Ser Lys Phe Leu Asn Arg Tyr Pro
 210 215 220
 His Trp Lys Ile Glu Tyr Thr Glu Ser Thr Ser Ala Ala Met Glu Lys
 225 230 235 240
 15 Val Ala Gln Ala Lys Ser Pro His Val Ala Ala Leu Gly Ser Glu Ala
 245 250 255
 Gly Gly Thr Leu Tyr Gly Leu Gln Val Leu Glu Arg Ile Glu Ala Asn
 260 265 270
 Gln Arg Gln Asn Phe Thr Arg Phe Val Val Leu Ala Arg Lys Ala Ile
 275 280 285
 25 Asn Val Ser Asp Gln Val Pro Ala Lys Thr Thr Leu Leu Met Ala Thr
 290 295 300
 Gly Gln Gln Ala Gly Ala Leu Val Glu Ala Leu Leu Val Leu Arg Asn
 305 310 315 320
 His Asn Leu Ile Met Thr Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile His Gly Asn
 325 330 335
 35 Pro Trp Glu Glu Met Phe Tyr Leu Asp Ile Gln Ala Asn Leu Glu Ser
 340 345 350
 Ala Glu Met Gln Lys Ala Leu Lys Glu Leu Gly Glu Ile Thr Arg Ser
 355 360 365
 40 Met Lys Val Leu Gly Cys Tyr Pro Ser Glu Asn Val Val Pro Val Asp
 370 375 380
 45
 50

Pro Thr
385

5 <210> 7
 <211> 1650
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

10 <220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(1650)
 <223>

20 <400> 7
 atg aaa aac atc aat cca acg cag acc gct gcc tgg cag gca cta cag 48
 Met Lys Asn Ile Asn Pro Thr Gln Thr Ala Ala Trp Gln Ala Leu Gln
 1 5 10 15

25 aaa cac ttc gat gaa atg aaa gac gtt acg atc gcc gat ctt ttt gct 96
 Lys His Phe Asp Glu Met Lys Asp Val Thr Ile Ala Asp Leu Phe Ala
 20 25 30

aaa gac ggc gat cgt ttt tct aag ttc tcc gca acc ttc gac gat cag 144
 Lys Asp Gly Asp Arg Phe Ser Lys Phe Ser Ala Thr Phe Asp Asp Gln
 35 40 45

30 atg ctg gtg gat tac tcc aaa aac cgc atc act gaa gag acg ctg gcg 192
 Met Leu Val Asp Tyr Ser Lys Asn Arg Ile Thr Glu Glu Thr Leu Ala
 50 55 60

35 aaa tta cag gat ctg gcg aaa gag tgc gat ctg gcg ggc gcg att aag 240
 Lys Leu Gln Asp Leu Ala Lys Glu Cys Asp Leu Ala Gly Ala Ile Lys
 65 70 75 80

tcg atg ttc tct ggc gag aag atc aac cgc act gaa aac cgc gcc gtg 288
 Ser Met Phe Ser Gly Glu Lys Ile Asn Arg Thr Glu Asn Arg Ala Val
 85 90 95

40 ctg cac gta gcg ctg cgt aac cgt agc aat acc ccg att ttg gtt gat 336
 Leu His Val Ala Leu Arg Asn Arg Ser Asn Thr Pro Ile Leu Val Asp
 100 105 110

45 ggc aaa gac gta atg ccg gaa gtc aac gcg gtg ctg gag aag atg aaa 384
 Gly Lys Asp Val Met Pro Glu Val Asn Ala Val Leu Glu Lys Met Lys
 115 120 125

acc ttc tca gaa gcg att att tcc ggt gag tgg aaa ggt tat acc ggc 432

50

RU 2 396 336 C2

	Thr	Phe	Ser	Glu	Ala	Ile	Ile	Ser	Gly	Glu	Trp	Lys	Gly	Tyr	Thr	Gly	
		130					135					140					
	aaa	gca	atc	act	gac	gta	gtg	aac	atc	ggg	atc	ggc	ggt	tct	gac	ctc	480
5	Lys	Ala	Ile	Thr	Asp	Val	Val	Asn	Ile	Gly	Ile	Gly	Gly	Ser	Asp	Leu	
	145					150					155				160		
	ggc	cca	tac	atg	gtg	acc	gaa	gct	ctg	cgt	ccg	tac	aaa	aac	cac	ctg	528
	Gly	Pro	Tyr	Met	Val	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Pro	Tyr	Lys	Asn	His	Leu	
					165					170					175		
10	aac	atg	cac	ttt	gtt	tct	aac	gtc	gat	ggg	act	cac	atc	gcg	gaa	gtg	576
	Asn	Met	His	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Thr	His	Ile	Ala	Glu	Val	
				180					185					190			
	ctg	aaa	aaa	gta	aac	ccg	gaa	acc	acg	ctg	ttc	ttg	gta	gca	tct	aaa	624
15	Leu	Lys	Lys	Val	Asn	Pro	Glu	Thr	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ser	Lys	
			195					200					205				
	acc	ttc	acc	act	cag	gaa	act	atg	acc	aac	gcc	cat	agc	gcg	cgt	gac	672
	Thr	Phe	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Met	Thr	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Arg	Asp	
		210					215					220					
20	tgg	ttc	ctg	aaa	gcg	gca	ggt	gat	gaa	aaa	cac	gtt	gca	aaa	cac	ttt	720
	Trp	Phe	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Glu	Lys	His	Val	Ala	Lys	His	Phe	
	225					230					235					240	
	gcg	gcg	ctt	tcc	acc	aat	gcc	aaa	gcc	gtt	ggc	gag	ttt	ggt	att	gat	768
25	Ala	Ala	Leu	Ser	Thr	Asn	Ala	Lys	Ala	Val	Gly	Glu	Phe	Gly	Ile	Asp	
					245					250					255		
	act	gcc	aac	atg	ttc	gag	ttc	tgg	gac	tgg	gtt	ggc	ggc	cgt	tac	tct	816
	Thr	Ala	Asn	Met	Phe	Glu	Phe	Trp	Asp	Trp	Val	Gly	Gly	Arg	Tyr	Ser	
				260					265					270			
30	ttg	tgg	tca	gcg	att	ggc	ctg	tcg	att	gtt	ctc	tcc	atc	ggc	ttt	gat	864
	Leu	Trp	Ser	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ile	Val	Leu	Ser	Ile	Gly	Phe	Asp	
			275					280					285				
	aac	ttc	gtt	gaa	ctg	ctt	tcc	ggc	gca	cac	gcg	atg	gac	aag	cat	ttc	912
35	Asn	Phe	Val	Glu	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	His	Ala	Met	Asp	Lys	His	Phe	
		290					295					300					
	tcc	acc	acg	cct	gcc	gag	aaa	aac	ctg	cct	gta	ctg	ctg	gcg	ctg	att	960
	Ser	Thr	Thr	Pro	Ala	Glu	Lys	Asn	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Ile	
	305					310					315					320	
40	ggc	atc	tgg	tac	aac	aat	ttc	ttt	ggt	gcg	gaa	act	gaa	gcg	att	ctg	1008
	Gly	Ile	Trp	Tyr	Asn	Asn	Phe	Phe	Gly	Ala	Glu	Thr	Glu	Ala	Ile	Leu	
					325					330					335		
	ccg	tat	gac	cag	tat	atg	cac	cgt	ttc	gcg	gcg	tac	ttc	cag	cag	ggc	1056
	Pro	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Met	His	Arg	Phe	Ala	Ala	Tyr	Phe	Gln	Gln	Gly	
				340					345					350			
45	aat	atg	gag	tcc	aac	ggt	aag	tat	gtt	gac	cgt	aac	ggt	aac	gtt	gtg	1104
	Asn	Met	Glu	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Gly	Asn	Val	Val	
			355					360					365				

50

RU 2 396 336 C2

	gat tac cag act ggc ccg att atc tgg ggt gaa cca ggc act aac ggt	1152
	Asp Tyr Gln Thr Gly Pro Ile Ile Trp Gly Glu Pro Gly Thr Asn Gly	
	370 375 380	
5	cag cac gcg ttc tac cag ctg atc cac cag gga acc aaa atg gta ccg	1200
	Gln His Ala Phe Tyr Gln Leu Ile His Gln Gly Thr Lys Met Val Pro	
	385 390 395 400	
	tgc gat ttc atc gct ccg gct atc acc cat aac ccg ctc tct gat cat	1248
	Cys Asp Phe Ile Ala Pro Ala Ile Thr His Asn Pro Leu Ser Asp His	
	405 410 415	
10	cac cag aaa ctg ctg tct aac ttc ttc gcc cag acc gaa gcg ctg gcg	1296
	His Gln Lys Leu Leu Ser Asn Phe Phe Ala Gln Thr Glu Ala Leu Ala	
	420 425 430 435	
15	ttt ggt aaa tcc cgc gaa gtg gtt gag cag gaa tat cgt gat cag ggt	1344
	Phe Gly Lys Ser Arg Glu Val Val Glu Gln Glu Tyr Arg Asp Gln Gly	
	435 440 445	
	aaa gat ccg gca acg ctt gac tac gtg gtg ccg ttc aaa gta ttc gaa	1392
	Lys Asp Pro Ala Thr Leu Asp Tyr Val Val Pro Phe Lys Val Phe Glu	
	450 455 460	
20	ggt aac cgc ccg acc aac tcc atc ctg ctg cgt gaa atc act ccg ttc	1440
	Gly Asn Arg Pro Thr Asn Ser Ile Leu Leu Arg Glu Ile Thr Pro Phe	
	465 470 475 480	
25	agc ctg ggt gcg ttg att gcg ctg tat gag cac aaa atc ttt act cag	1488
	Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ala Leu Tyr Glu His Lys Ile Phe Thr Gln	
	485 490 495	
	ggc gtg atc ctg aac atc ttc acc ttc gac cag tgg ggc gtg gaa ctg	1536
	Gly Val Ile Leu Asn Ile Phe Thr Phe Asp Gln Trp Gly Val Glu Leu	
	500 505 510	
30	ggt aaa cag ctg gcg aac cgt att ctg cca gag ctg aaa gat gat aaa	1584
	Gly Lys Gln Leu Ala Asn Arg Ile Leu Pro Glu Leu Lys Asp Asp Lys	
	515 520 525	
35	gaa atc agc agc cac gat agc tcg acc aat ggt ctg att aac cgc tat	1632
	Glu Ile Ser Ser His Asp Ser Ser Thr Asn Gly Leu Ile Asn Arg Tyr	
	530 535 540	
	aaa gcg tgg cgc ggt taa	1650
	Lys Ala Trp Arg Gly	
	545	
40	<210> 8	
	<211> 549	
	<212> PRT	
45	<213> Escherichia coli	

50

RU 2 396 336 C2

<400> 8

Met Lys Asn Ile Asn Pro Thr Gln Thr Ala Ala Trp Gln Ala Leu Gln
 1 5 10 15

5
 Lys His Phe Asp Glu Met Lys Asp Val Thr Ile Ala Asp Leu Phe Ala
 20 25 30

10
 Lys Asp Gly Asp Arg Phe Ser Lys Phe Ser Ala Thr Phe Asp Asp Gln
 35 40 45

Met Leu Val Asp Tyr Ser Lys Asn Arg Ile Thr Glu Glu Thr Leu Ala
 50 55 60

15
 Lys Leu Gln Asp Leu Ala Lys Glu Cys Asp Leu Ala Gly Ala Ile Lys
 65 70 75 80

20
 Ser Met Phe Ser Gly Glu Lys Ile Asn Arg Thr Glu Asn Arg Ala Val
 85 90 95

Leu His Val Ala Leu Arg Asn Arg Ser Asn Thr Pro Ile Leu Val Asp
 100 105 110

25
 Gly Lys Asp Val Met Pro Glu Val Asn Ala Val Leu Glu Lys Met Lys
 115 120 125

30
 Thr Phe Ser Glu Ala Ile Ile Ser Gly Glu Trp Lys Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140

Lys Ala Ile Thr Asp Val Val Asn Ile Gly Ile Gly Gly Ser Asp Leu
 145 150 155 160

35
 Gly Pro Tyr Met Val Thr Glu Ala Leu Arg Pro Tyr Lys Asn His Leu
 165 170 175

Asn Met His Phe Val Ser Asn Val Asp Gly Thr His Ile Ala Glu Val
 180 185 190

40
 Leu Lys Lys Val Asn Pro Glu Thr Thr Leu Phe Leu Val Ala Ser Lys
 195 200 205

45
 Thr Phe Thr Thr Gln Glu Thr Met Thr Asn Ala His Ser Ala Arg Asp
 210 215 220

50

RU 2 396 336 C2

Trp Phe Leu Lys Ala Ala Gly Asp Glu Lys His Val Ala Lys His Phe
 225 230 235 240

5 Ala Ala Leu Ser Thr Asn Ala Lys Ala Val Gly Glu Phe Gly Ile Asp
 245 250 255

Thr Ala Asn Met Phe Glu Phe Trp Asp Trp Val Gly Gly Arg Tyr Ser
 260 265 270

10 Leu Trp Ser Ala Ile Gly Leu Ser Ile Val Leu Ser Ile Gly Phe Asp
 275 280 285

Asn Phe Val Glu Leu Leu Ser Gly Ala His Ala Met Asp Lys His Phe
 290 295 300

15 Ser Thr Thr Pro Ala Glu Lys Asn Leu Pro Val Leu Leu Ala Leu Ile
 305 310 315 320

20 Gly Ile Trp Tyr Asn Asn Phe Phe Gly Ala Glu Thr Glu Ala Ile Leu
 325 330 335

Pro Tyr Asp Gln Tyr Met His Arg Phe Ala Ala Tyr Phe Gln Gln Gly
 340 345 350

25 Asn Met Glu Ser Asn Gly Lys Tyr Val Asp Arg Asn Gly Asn Val Val
 355 360 365

30 Asp Tyr Gln Thr Gly Pro Ile Ile Trp Gly Glu Pro Gly Thr Asn Gly
 370 375 380

Gln His Ala Phe Tyr Gln Leu Ile His Gln Gly Thr Lys Met Val Pro
 385 390 395 400

35 Cys Asp Phe Ile Ala Pro Ala Ile Thr His Asn Pro Leu Ser Asp His
 405 410 415

40 His Gln Lys Leu Leu Ser Asn Phe Phe Ala Gln Thr Glu Ala Leu Ala
 420 425 430

Phe Gly Lys Ser Arg Glu Val Val Glu Gln Glu Tyr Arg Asp Gln Gly
 435 440 445

45

50

RU 2 396 336 C2

Lys Asp Pro Ala Thr Leu Asp Tyr Val Val Pro Phe Lys Val Phe Glu
 450 455 460

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

Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ala Leu Tyr Glu His Lys Ile Phe Thr Gln
 485 490 495

10 Gly Val Ile Leu Asn Ile Phe Thr Phe Asp Gln Trp Gly Val Glu Leu
 500 505 510

15 Gly Lys Gln Leu Ala Asn Arg Ile Leu Pro Glu Leu Lys Asp Asp Lys
 515 520 525

Glu Ile Ser Ser His Asp Ser Ser Thr Asn Gly Leu Ile Asn Arg Tyr
 530 535 540

20 Lys Ala Trp Arg Gly
 545

<210> 9

25 <211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence:primer P1

30

<400> 9
 atgacatcgg aaaaccggtt actggcgctg cgagagtgaa gcttgctttt ttataactaag 60

35 <210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence:primer P2

40

<400> 10
 gcaaacgacg aaaactacgc tttagcagct taacgctcaa gttagtataa aaaagctgaa 60

45

<210> 11

50

<211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence:primer P3
 5

 <400> 11
 gcagtgttat tgcgtcaggc gaatgacaat cgccaggcaa acgacgaaaa ctac 54
 10
 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 15
 <213> Artificial sequence:primer P4

 <400> 12
 atgaaacaca taccgtttt 19
 20
 <210> 13
 <211> 20
 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence:primer P5

 <400> 13
 gtccggacag cggtagcctg 20
 30
 <210> 14
 35
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence:primer P6
 40
 <400> 14
 caggcaaacg acgaaaacta cgcttttagca gcttaatcag gttggatcaa caggc 55
 45
 <210> 15
 <211> 11
 50

<210> 19
 <211> 64
 <212> DNA
 5 <213> Artificial sequence:primer P7

 <400> 19
 10 aatgaaaaac atcaatccaa cgcagaccgc tgccctgcgct caagttagta taaaaaagct 60
 gaac 64
 <210> 20
 <211> 64
 15 <212> DNA
 <213> Artificial sequence:primer P8

 <400> 20
 20 ttaaccgcgc cacgctttat agcgggtaat cagacctgaa gcttgcctttt ttataactaag 60
 ttgg 64
 <210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 25 <213> Artificial sequence:primer P9

 <400> 21
 30 aatgaaaaac atcaatccaa cgcag 25
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 40 <213> Artificial sequence:primer P9

 <400> 22
 45 ttaaccgcgc cacgctttat ag 22

Формула изобретения

1. Бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, - продуцент L-аминокислоты, содержащая ДНК, включающую:

А) ген, кодирующий фермент бактерии, который влияет на биосинтез указанной L-аминокислоты, и

В) транскрибируемый фрагмент ДНК, кодирующий пептид SsrA,

последовательность которого представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2, или его функциональный вариант, отличающийся тем, что указанный фрагмент присоединен к 3' концу указанного гена.

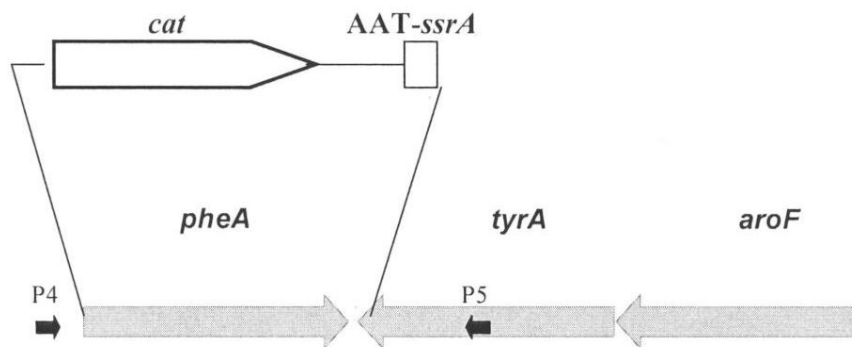
- 5 2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия является продуцентом L-фенилаланина.
3. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанным ферментом является хоризматмутаза/префенатдегидрогеназа.
- 10 4. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия является продуцентом L-гистидина.
5. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанным ферментом является фосфоглюкозоизомераза.
- 15 6. Способ получения L-аминокислоты, включающий выращивание бактерии по п.1 в питательной среде и выделение указанной L-аминокислоты из культуральной жидкости.
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанной L-аминокислотой является L-фенилаланин.
8. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанной L-аминокислотой является L-гистидин.
- 20 9. Способ получения сложного эфира низших алкилов α -L-аспартил-L-фенилаланина, включающий выращивание бактерии по любому из пп.2 и 3 в питательной среде, приводящее к накоплению L-фенилаланина, выделение L-фенилаланина, и синтез сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина из аспарагиновой кислоты или ее производных и полученного L-фенилаланина.
- 25 10. Способ по п.9, дополнительно включающий этерификацию полученного L-фенилаланина с образованием сложного эфира низшего алкила L-фенилаланина, конденсирование сложного эфира низшего алкила L-фенилаланина с производным аспарагиновой кислоты, при этом указанным производным является N-ацил-ангидрид L-аспарагиновой кислоты, выделение сложного эфира низшего алкила N-ацил- α -L-аспартил-L-фенилаланина из реакционной смеси и гидрогенизирование сложного эфира низшего алкила N-ацил- α -L-аспартил-L-фенилаланина с
- 30 35 образованием сложного эфира низшего алкила α -L-аспартил-L-фенилаланина.

40

45

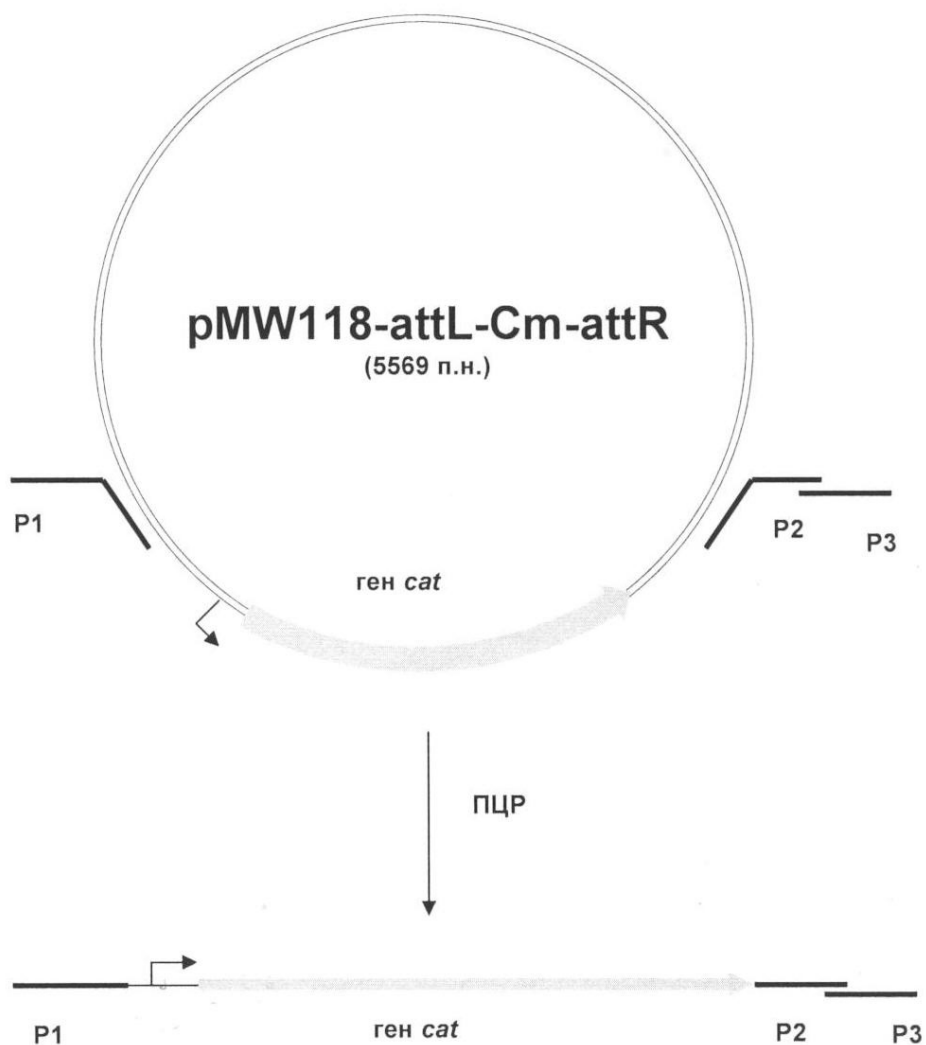
50

Схема удлинения гена *tyrA*.



Фиг. 1

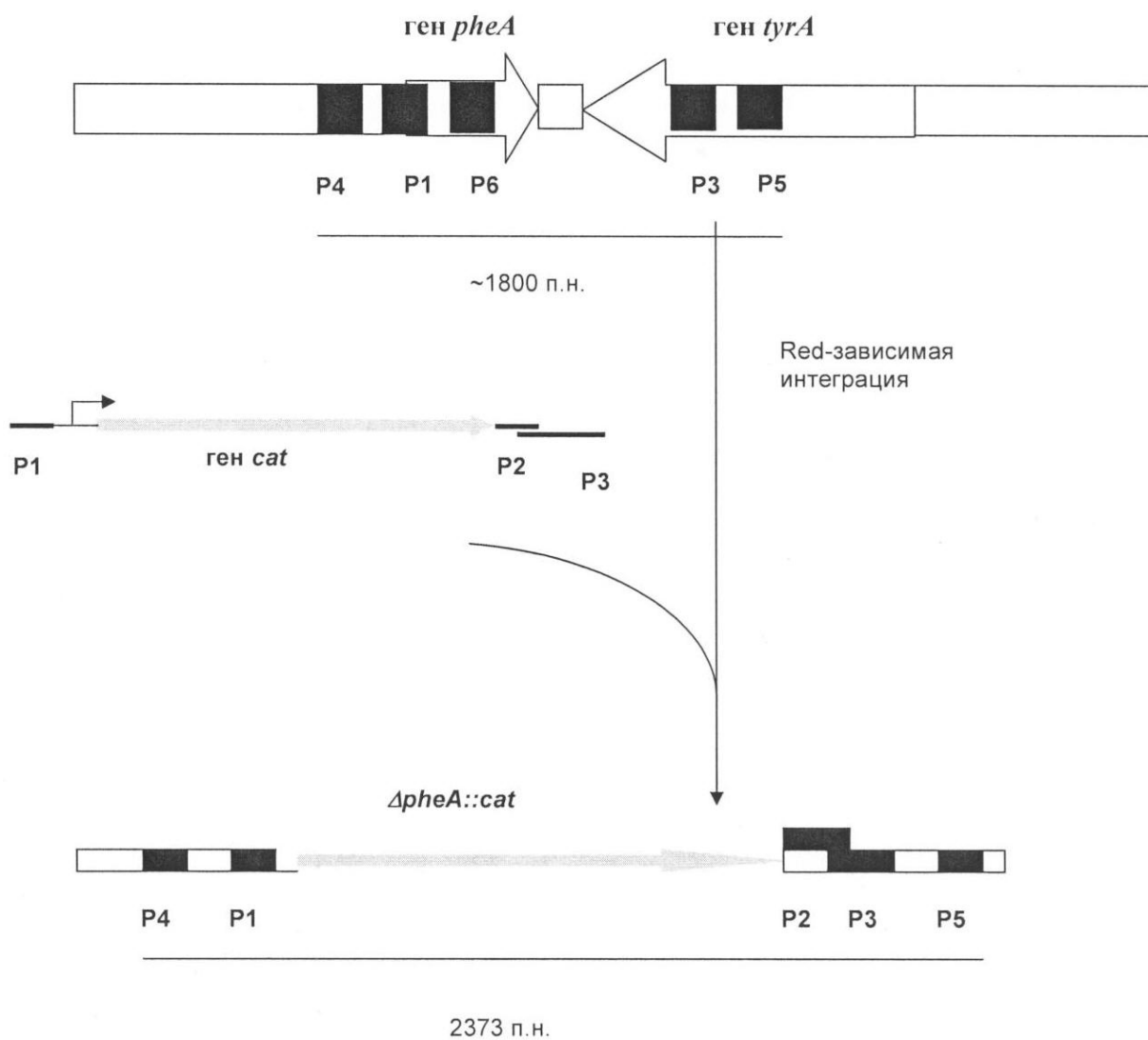
Относительные положения праймеров P1 и P2 на плазмиде pMW118-attL-Cm-attR.



Полученный продукт ПЦР (1745 п.н.)

Фиг. 2

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

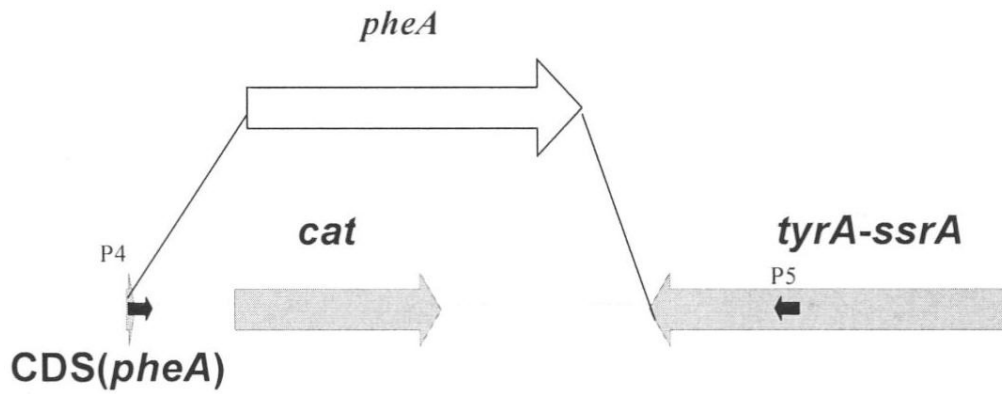


Фиг. 3

Схема замены локуса гена *cat* геном *pheA*.

Локус хромосомы *E.coli*, содержащий аллель *tyrA-ssrA* и ген *cat*.

Сайты P4 и P5, использованные для проверки полученной конструкции показаны черными стрелками.



Фиг. 4

BACSU	GKTNSFNQN-----VALAA
BACST	GK-----QN-----YALAA
SERMA	AN-----DEN-----YALAA
ECOLI	AN-----DEN-----YALAA
PSEFL	AN-----DETYGE--YALAA
PSECL	AN-----DETYGE--YALAA
PSEUPU	AN-----DETYGEETYALAA
..	.. ****

Фиг. 5