



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/70 (2020.02); C12P 13/08 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019144154, 26.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.12.2019

Дата регистрации:
28.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.12.2019

(45) Опубликовано: 28.07.2020 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-ый Дорожный пр-д, 1, НИЦ
"Курчатовский институт" - ГосНИИГенетика

(72) Автор(ы):

Выборная Татьяна Владимировна (RU),
Юзбашев Тигран Владимирович (RU),
Филиппова Светлана Сергеевна (RU),
Бубнов Дмитрий Михайлович (RU),
Хозов Андрей Александрович (RU),
Кудима Максим Дмитриевич (RU),
Федоров Александр Сергеевич (RU),
Синеокий Сергей Павлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Государственный
научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных
микроорганизмов Национального
исследовательского центра "Курчатовский
институт" (НИЦ "Курчатовский институт"
- ГосНИИГенетика) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2697219 C1, 13.08.2019. RU
2546237 C1, 10.04.2015. БИРЮКОВА И.В. И
ДР. Конструирование на основе Escherichia
coli K-12 MG1655 нового штамма с
улучшенными ростовыми характеристиками
для экспериментов по метаболической
инженерии. ГЕНЕТИКА, 2010, Том 46, N 3,
С. 349-355. LEE J.H. ET AL. Metabolic
engineering of a reduced-genome strain of (см.
прод.)

(54) Штамм Escherichia coli - продуцент L-треонина

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и
микробиологической промышленности.
Предложен штамм Escherichia coli ВКПМ В-13427,
продуцирующий L-треонин. Штамм имеет
генотип rph^{wt}, ΔtdcBCDE, Δkbl-tdh, ΔsstT, rpsL^{K43R},
galK^{Tyr38TAG}, araB^{Tyr57TAG}, rhaB^{Tyr163TAG},

P_{H207-thrA}⁴³³BC-T_{grnB}, P_{I077PR-rhtA}, spoT^{T252ins}
(CATGAT)253A; G520T; C1585T. Штамм характеризуется
высокой скоростью роста и скоростью синтеза
L-треонина. Изобретение позволяет расширить
арсенал штаммов Escherichia coli,
продуцирующих L-треонин. 1 табл., 2 пр., 10 ил.

(56) (продолжение):

Escherichia coli for L-threonine production. Microbial Cell Factories 2009, 8:2, p. 1-12. BUBNOV D.M. ET AL.
Development of new versatile plasmid-based systems for λ Red-mediated Escherichia coli genome engineering
Journal of Microbiological Methods, Vol. 151, August 2018, P. 48-56.

R U
2 7 2 8 2 4 2 C 1

R U
2 7 2 8 2 4 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)*C12N 15/70* (2006.01)*C12P 13/08* (2006.01)*C12R 1/19* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/70 (2020.02); *C12P 13/08* (2020.02)(21)(22) Application: **2019144154, 26.12.2019**(24) Effective date for property rights:
26.12.2019Registration date:
28.07.2020

Priority:

(22) Date of filing: **26.12.2019**(45) Date of publication: **28.07.2020** Bull. № 22

Mail address:

**117545, Moskva, 1-yj Dorozhnyj pr-d, 1, NITS
"Kurchatovskij institut" - GosNIIgenetika**

(72) Inventor(s):

**Vybornaya Tatyana Vladimirovna (RU),
Yuzbashev Tigran Vladimirovich (RU),
Filippova Svetlana Sergeevna (RU),
Bubnov Dmitrij Mikhajlovich (RU),
Khozov Andrej Aleksandrovich (RU),
Kudima Maksim Dmitrievich (RU),
Fedorov Aleksandr Sergeevich (RU),
Sineokij Sergej Pavlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
uchrezhdenie "Gosudarstvennyj
nauchno-issledovatel'skij institut genetiki i
selekcii promyshlennykh mikroorganizmov
Natsionalnogo issledovatel'skogo tsentra
"Kurchatovskij institut" (NITS "Kurchatovskij
institut" - GosNIIgenetika) (RU)****(54) ESCHERICHIA COLI STRAIN - L-THREONINE PRODUCER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and microbiological industry. Disclosed is a strain of *Escherichia coli* VKPM B-13427, which produces L-threonine. Strain has a genotype rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $P_{H207-thrA^{433}BC-T_{rrnB}}$, $P_{1077PR-rhtA}$, $spoT^{T252ins(CATGAT)253A}$; G520T; C1585T.

Strain is characterized by high rate of growth and rate of synthesis of L-threonine.

EFFECT: invention widens the range of *Escherichia coli* strains producing L-threonine.

1 cl, 1 tbl, 2 ex, 10 dwg

Настоящее изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности, к микробиологическому синтезу L-треонина с использованием бактерии вида *Escherichia coli*.

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

Описано множество методов увеличения продукции L-аминокислот, например, путем трансформации микроорганизма рекомбинантной ДНК (US 4278765). Указанные методы основаны на повышении активности ферментов, вовлеченных в биосинтез аминокислот и/или уменьшении чувствительности целевого фермента к обратному ингибированию продуцируемой L-аминокислотой (WO 9516042, US 5661012, US 6040160).

Известны различные штаммы, использующиеся для производства L-треонина методом ферментации. Это штаммы с увеличенными активностями ферментов, вовлеченных в биосинтез L-треонина (US 5175107; US 5661012; US 5705371; US 5939307; EP 219027), штаммы, устойчивые к некоторым химическим реагентам, таким как L-треонин и его аналоги (WO 0114525, EP 301572, US 5376538), штаммы с инактивированными ферментами системы деградации L-треонина (US 5939307 и US 6297031), штаммы, в которых устранена чувствительность целевого фермента к ингибированию продуцируемой аминокислотой или ее побочными продуктами по типу обратной связи (US 5175107 и US 5661012).

В настоящее время известны штаммы-продуценты L-треонина с различным уровнем продукции аминокислоты. Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-11820 (RU 2546237) за 24 часа ферментации способен синтезировать до 7,1 г/л L-треонина, штамм *Escherichia coli* В-3996/pMrelA (RU 20041177) - 12,2 г/л за 24 часа ферментации, *Escherichia coli* ВКПМ В-13240 (RU 2697499) - 16,5 г/л за 24 часа культивирования, штамм *Escherichia coli* В-3996/pMW118-ptsG-mut-43 (RU 2335536) продуцирует до 12,0 г/л за 48 часов ферментации, при более продолжительном культивировании в течение 65 часов штамм *Escherichia coli* В-3996-ΔgcvB (RU 2395567) синтезирует L-треонин до 31,0 г/л. Различие в уровне продукции L-треонина связано как с биотехнологическими показателями конкретного штамма, так и с условиями его культивирования: количество субстрата, продолжительность ферментации, способ рН-статирования, условия аэрации и др.

Однако, все вышеприведенные штаммы получены на основе штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-3996, который сам был получен на основе дикого штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-7. в том числе с использованием ненаправленного мутагенеза, что предопределило наличие в нем мутаций, отрицательно влияющих на биотехнологические показатели.

В соответствии с этим, важную роль при конструировании продуцента L-треонина играет направленное введение модификаций в геном дикого штамма *Escherichia coli*, не подвергавшегося мутагенезу и селекционным работам, что позволяет получить конечный штамм-продуцент с известной нуклеотидной последовательностью.

Преимущество такого подхода заключается в том, что влияние на продукцию L-треонина каждой из вводимой генетической модификации возможно оценить независимо от других, в то время, как при использовании штамма, ранее подвергнутого ненаправленному мутагенезу, накопленные мутации, могут искажать эффект от вновь вводимой модификации.

Технической задачей, на решение которой направлено настоящее изобретение является расширение арсенала штаммов *Escherichia coli*, способных к продукции L-

треонина.

Поставленная задача решена тем, что на основе дикого штамма *Escherichia coli* MG1655 ВКПМ В-13106 в несколько этапов, путем введения направленных модификаций, получен штамм бактерии *Escherichia coli* ВКПМ В - 13427.

Штамм *Escherichia coli* MG1655 ВКПМ В-13106 взят за основу благодаря своей изученности. Он является одним из популярных штаммов *E. coli* K-12 дикого типа, используемых в метаболической инженерии. Именно для этого штамма была впервые определена последовательность генома *E. coli*.

В штамм *Escherichia coli* MG1655 ВКПМ В-13106 введены следующие модификации:

- С целью улучшения ростовых свойств в штамме ВКПМ В-13106 исправлена природная мутация *grh-1* в гене *grh*.

- Для повышения продукции L-треонина в штамме оверэкспрессированы гены пути биосинтеза треонина *thrABC* под контролем промотора P_{H207} и терминатора транскрипции T_{grnB} . Для устранения ретро-ингибирования с продукта гена *thrA*, в

- последовательность гена введена десенсибилизирующая мутация *Gly433Arg*

- Биodeградация L-треонина в клетке снижена за счет удаления генов *tdcB*, *kbl-tdh*.

- Экспорт L-треонина в культуральную жидкость усилен путем экспрессии гена *rhtA*, кодирующего транспортер L-треонина, под контролем конститутивного промотора

P_{1077PR}

- Во избежание обратного транспорта аминокислоты внутрь клетки удалены гены *sstT*, *tdcC*.

- С целью расширения арсенала используемых селективных маркеров, которые в последствии могут облегчить конструирование продуцента, введен ряд мутаций *gprL*^{K43R},

- galK*^{Tyr38TAG}, *araB*^{Tyr57TAG}, *rhaB*^{Tyr163TAG}

- Увеличение продукции L-треонина достигнуто также путем снижения *ppGpp*-гидролазной активности в клетках за счет введения мутаций *T252ins(CATGAT) 253A*, *G520T*, *C1585T* в ген *spoT*

Большая часть указанных модификаций описана и успешно применена при конструировании штаммов-продуцентов аминокислот на основе *Escherichia coli* (Бирюкова И.В. и др. Генетика. - 2010. - Т. 46. - №. 3. - С. 349-355; Lee K.H. et al, Molecular systems biology. - 2007. - Т. 3. - №. 1; Livshits V.A. et al., Research in microbiology. - 2003. - Т. 154. - №. 2. - С. 123-135; Bubnov D.M. et al., Journal of microbiological methods. - 2018. - Т. 151. - С. 48-56; Sarubbi E. et al., Journal of Biological Chemistry. - 1989. - Т. 264. - №. 25. - С. 15074-15082; RU 2212448; RU 2288265; RU 2697219, EP 2628792 A1).

Сочетания модификаций, использованного в заявляемом изобретении, в источниках информации нами не обнаружено.

Изобретение проиллюстрировано следующими фигурами графического изображения:

Фиг. 1. Схема плазмиды *pSacB-Kan*, где *kan* - ген *kan* (из *Tn903*), кодирует аминогликозид-3'-фосфотрансферазу, обуславливает устойчивость к канамицину; *sacB* - ген *sacB*, кодирует левансуказу *Bacillus subtilis*; *rep* (*pMB1*) - репликон плазмиды *pMB1*.

Фиг. 2. Схема плазмиды *pKD46*, где *araC* - ген *araC* регулятор транскрипции генов катаболизма L-арабинозы; P_{araBAD} - промотор оперона *araBAD*, индуцируется L-арабинозой; *gam*, *bet*, *exo* - гены *gam*, *bet*, *exo* Red системы гомологичной рекомбинации фага λ , *repA101ts* - температурочувствительный репликон; *tL3* - терминатор транскрипции *tL3*; *bla* - ген *bla*, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину.

Фиг. 3. Схема плазмиды *pKD13*, где *kan* - ген *kan* (из *Tn5*) кодирует

неомицинфосфотрансферазу, обуславливающую устойчивость к канамицину; FRT site - сайты FLP-FRT системы сайт-специфической рекомбинации *S. cerevisiae*; tL3 - терминатор транскрипции tL3; R6K - репликон плазмиды pR6K; bla - ген bla, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину; TrnB - терминатор транскрипции.

Фиг. 4. Схема плазмиды pCP20, где flp - ген flp, кодирует FLP рекомбиназу сайт-специфической системы рекомбинации *S. cerevisiae*; cI857 - cI термочувствительный репрессор фага λ , cat - ген cat, кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу, обуславливает устойчивость к хлорамфениколу; bla - ген bla, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину; repA101ts - температурочувствительный репликон.

Фиг. 5. Схема плазмиды pITA, где attL, attR - attL (левый) и attR (правый) сайты унаваания сайт-специфической рекомбинации фага λ ; sacB - ген sacB, кодирует левансуказу *Bacillus subtilis*; cat - ген cat, кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу, обуславливает устойчивость к хлорамфениколу, герA - репликон; bla - ген bla, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину.

Фиг. 6. Схема плазмиды pDL14 где rhaS, rhaR - гены rhaS, rhaR кодируют активаторы транскрипции оперона rhaBAD; t0 - терминатор транскрипции; P_{rhaBAD} - промотор оперона rhaBAD, индуцируется L-рамнозой; gam, bet, exo - гены gam, bet, exo Red системы гомологичной рекомбинации фага λ ; mutS - ген mutS *Salmonella enterica*, кодирует основной фермент системы репарации неканонических пар нуклеотидов, несет замену Lys622Ala; TrnB - терминатор транскрипции; lacI^Q - мутантный аллель репрессора LacI, T5/lac - сильный промотор T5 с lac оператором; RNAI, RNAII - короткие транскрипты RNAI, RNAII (pBR322) контролирующие число копии плазмиды плазмиды; bla - ген bla, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину.

Фиг. 7. Схема плазмиды pKK-up-SC-dw-thrABC-433 где Ptac - промотор Ptac; thrA - ген thrA треонинового оперона, кодирует аспартаткиназу / гомосериндегидрогеназу, несет мутацию Gly433Arg(G1297A); thrB - ген thrB треонинового оперона, кодирует гомосеринкиназу; thrC - ген thrC треонинового оперона, кодирует треонинсинтазу; TrnB - терминатор транскрипции; up / down-thr-homology - фрагменты ДНК, гомологичные послетовальностям на хромосоме *E. coli* выше и ниже треонинового оперона; гер (pMB1) - репликон плазмиды pMB1; attL, attR - attL (левый) и attR (правый) сайты унаваания сайт-специфической рекомбинации фага λ ; sacB - ген sacB, кодирует левансуказу *Bacillus subtilis*; cat - ген cat, кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу, обуславливает устойчивость к хлорамфениколу, герA - репликон; bla - ген bla, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину.

Фиг. 8. Схема плазмиды pDL17, где rhaS, rhaR - гены rhaS, rhaR кодируют активаторы транскрипции оперона rhaBAD; t0 - терминатор транскрипции; P_{rhaBAD} - промотор оперона rhaBAD, индуцируется L-рамнозой; gam, bet, exo - гены gam, bet, exo Red системы гомологичной рекомбинации фага λ ; tL3 - терминатор транскрипции; TrnB - терминатор транскрипции; lacI^Q - мутантный аллель репрессора LacI, T5/lac - сильный промотор T5 с lac оператором; RNAI, RNAII - короткие транскрипты RNAI, RNAII (pBR322) контролирующие число копии плазмиды плазмиды; bla - ген bla, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину.

Фиг. 9. Схема плазмиды pLtet14 где P_{LtetO-1} - регулируемый промотор, индуцируется ангидротераклином; P_{N25} - промотор; terR - репрессор; T_{soxR} - терминатор транскрипции; colE1 - репликон colE1; t0 - терминатор транскрипции; sacB - ген sacB,

кодирует левансуказу *Bacillus subtilis*; *cat* - ген *cat*, кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу, обуславливает устойчивость к хлорамфениколу.

Фиг. 10. Схема плазмиды pPRC, где P_{gpsL} - промотор гена *gpcL*; *gpcL* - ген *gpcL* кодирует S12 белок рибосомной субчастицы 30S, мутация в гене *gpcL* приводит к рецессивному фенотипу устойчивости к стрептомицину; *cat* - ген *cat*, кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу, обуславливает устойчивость к хлорамфениколу; *t0* - терминатор транскрипции; *repA101ts* - репликон; *bla* - ген *bla*, кодирует бета-лактамазу, обуславливающую устойчивость к ампициллину.

Изобретение подтверждено следующими примерами.

Пример 1. Конструирование заявляемого штамма

1.1 Удаление мутации *gph-1* в гене *gph*

Имеющуюся в штамме *Escherichia coli* MG1655 ВКПМ В-13106 мутацию *gph-1* ранее рассматривали как несущественную. Однако впоследствии выяснилось, что она негативно влияет на рост бактерий в определенных условиях. Удаление мутации *gph-1* в гене *gph* (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3: 3815863...3816549) в штамме MG1655 выполняют в два этапа.

На первом этапе заменяют последовательность мутантного гена на последовательность, несущую два маркера прямой и обратной селекции, ген устойчивости к канамицину и левансуказу, кодируемую *sacB*. На втором - после подтверждения генотипа замещают указанную последовательность диким геном *gph*.

Конструкцию для введения в локус *gph* гена устойчивости к канамицину и маркера негативной селекции *sacB* получают методом ПЦР, в качестве матрицы используют плазмиду pSacB-Kan (RU 2546237), представленную на фиг. 1. Амплификацию проводят по праймерам:

```

insrphF AAAGGTAAGCAGGGTGGACGCACAATGGAAATCCAGCGTCTGATCC
AGGGTTTTCCCAGTCACGA,

insrphR CTCGCGAATCGCCGTTCCGGCGGTGATCACATCATCTACCAGATGTT
GTGT GGAATTGTGAGC,

```

содержащим последовательности, гомологичные участкам в локусе *gph* длиной 45 и 43 нуклеотида соответственно, и последовательности, гомологичные участкам плазмиды, фланкирующим гены *kan* и *sacB* длиной 20 и 21 нуклеотид соответственно.

Введение амплифицированной кассеты в мутантный ген *gph* штамма MG1655 осуществляют по методике основанной на Red-зависимой рекомбинации фага λ (Datsenko K.A., Wanner B.L., Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2000. - Т. 97. - №. 12. - С. 6640-6645.). Согласно методике для интеграции фрагмента ДНК в хромосому штамма MG1655 трансформируют плазмидой pKD46 (фиг. 2). Плазмида pKD46 необходима для интеграции продукта ПЦР в хромосому штамма MG1655. Электрокомпетентные клетки штамма MG1655, несущего плазмиду pKD46, наращивают при 30°C в среде SOB (% мас, объем: триптон - 2; дрожжевой экстракт - 0,5; NaCl - 0,0585; MgSO₄·7H₂O - 0,246) с добавлением 1 mM L-арабинозы. Клетки трансформируют методом электропорации. Трансформанты отбирают на чашках с L-агаром (% мас, объем: триптон - 1; дрожжевой экстракт - 0,5; NaCl - 1, агар-агар - 2, вода - остальное) по устойчивости к канамицину (100 мкг/мл). Генотип полученных трансформантов подтверждают методом ПЦР с использованием синтетических олигонуклеотидов

rphwF CGCTTCCTGAAAGGTCAGG,

Km-ins-R CTCAGATAGCCCAGTAGCTGAC.

С хромосомы штамма E. coli DH10B амплифицируют последовательность дикого гена rph, используя синтетические олигонуклеотиды

rphwF CGCTTCCTGAAAGGTCAGG и

rphwR GGCCTGAATAATCTCCATCG.

Полученным ПЦР-продуктом длиной 1063 п.н. трансформируют компетентные клетки штамма MG1655 Δ rph::Km^R-sacB, несущего плазмиду pKD46 (фиг. 2). Трансформанты отбирают на чашках со средой SuLA (% мас, объем: триптон - 1; дрожжевой экстракт - 0,5; сахароза - 6; агар-агар - 2; вода - остальное). Трансформанты проверяют методом ПЦР на корректность встройки. Один из полученных клонов с подтвержденным генотипом обозначают, как MG1655thp^{wt}.

1.2 Деления генов tdcBCDE

Гены tdcBCDE (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3: 3266028...3260124) входят в состав оперона, отвечающего за транспорт L-треонина внутрь клетки, а также за деградацию L-треонина в анаэробных условиях. Инактивацию гена выполняют по коротким гомологичным участкам с использованием системы, основанной на Red-зависимой рекомбинации фага λ . Селективный маркер, ген устойчивости к канамицину, фланкированный FRT-сайтами, амплифицируют методом ПЦР, в качестве матрицы для синтеза используют плазмиду pKD13 (Datsenko K., et al, Proc natl Acad Sci, 2000), представленную на фиг. 2. Для специфической амплификации используют олигонуклеотиды:

tdckan-f TCAGAGCGCCTGGGTAAAGGTACGTGAAATAACATCCTGTTGCTGG
TGTAGGCTGGAGCTGCTTC,

tdckan-r ATGCATATTACATACGATCTGCCGGTTGCTATTGATGACATTATTAT
TCCGGGGATCCGTCGACC,

содержащие участки по 40 н.о, гомологичные участкам, расположенным выше и ниже генов tdcB и tdcE. Полученный ПЦР продукт размером 1394 п.н. содержит ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами FRT рекомбиназы и гомологичными участками длиной 40 п. о выше и ниже генов tdcB и tdcE.

Штамм MG1655rph^{wt}, трансформируют плазмидой pKD46 (фиг. 2). Трансформанты отбирают на чашках с L-агаром с добавлением ампициллина 250 мкг/мл. Из одного трансформанта наращивают компетентные клетки при 30°C в среде SOB с добавкой 15 мМ арабинозы. Компетентные клетки трансформируют методом электропорации очищенным ПЦР продуктом для инактивации генов tdcBCDE. Трансформанты отбирают на чашках с L-агаром с добавлением канамицина (100 мкг/мл) и проверяют на наличие мутации по генам tdcBCDE методом ПЦР с использованием праймеров

tdcchr-f GCCTGATCTTGCACATCAGC,

tdcchr-r CGAGTTTGTGCTGGTAGCC.

В результате получен штамм с генотипом rph^{wt}, Δ tdcBCDE::FRT-Km^R-FRT.

Маркер устойчивости к канамицину удаляют путем применения сайт-специфической рекомбинации с использованием рекомбиназы Flp. Для этой цели штамм с генотипом

rph^{wt}, ΔtdcBCDE::FRT-Km^R-FRT трансформируют плазмидой pCP20 (Cherepanov P.P., et. Al., Gene, 1995), схема которой представлена на фиг. 4. Трансформанты отбирают при 30°C на чашках с L-агаром с добавлением 250 мкг/мл ампициллина. Для элиминации плазмиды pCP20, которая несет термочувствительный репликон штамм культивируют при температуре 37°C. Отсутствие маркера подтверждают по отсутствию устойчивости к канамицину и по наличию ПЦР продукта размером 819 п.о. по праймерам

tdcchrF GCCTGATCTTGCACATCAGC,

tdcchrR CGAGTTTGTGCTGGTAGCC.

В результате отбирают один из клонов с подтвержденным генотипом rph^{wt}, ΔtdcBCDE, штамм обозначают как MG-THR1.2

1.3 Деления генов kbl-tdh

Инактивацию генов kbl-tdh, находящихся в хромосоме E. coli в одном опероне (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3:3790320...3792551) проводят путем замены нуклеотидной последовательности генов на кассету attR-cat-sacB-attL, содержащую селективные маркеры устойчивости к хлорамфениколу и левансуказу. Кассету амплифицируют методом ПЦР с плазмиды, pMW-attL-SacB-Cm-attR (RU 2546237) (далее pITA, фиг. 5) по праймерам

kbl-up AAGTTTGGGTAATATGTGCTGGAATTTGCCCTGTCTGGAGAATCGCAA
TGATGTTGTGTGGAATTGTGAGC,

tdh-dw AAGGGCTGGAATACCAGCCCTTGTTTCGTGTTAATCCCAGCTCAGAAT
AACTCAGGGTTTTCCCAGTCACG.

ПЦР продукт размером 3944 п.о. очищают методом экстракции из агарозного геля и далее используют для трансформации штамма MG-THR1.2, который предварительно трансформируют плазмидой pKD46 (фиг. 2). Отбор трансформантов, несущих делецию в генов kbl-tdh проводят на чашках с L-агаром с добавлением хлорамфеникола (25 мкг/мл). Отобранные клоны далее проверяют методом ПЦР на наличие инсерции в локусе kbl-tdh, используя олигонуклеотиды

kblseqF CCTTTCAAGAAAATAGGTTTCCCT,

tdhseqR ACGGAATAATAACACTAAGTTTATTGG.

Для вырезания маркеров из локуса kbl-tdh хромосомы штамма MG1655 амплифицируют два фрагмента размером 243 п.о. и 245 п.о. по двум парам праймеров kblupF и kblupR, а также tdhdwR и tdhdwF:

kblupF GCTTTGGCATCATTTTTTC,

kblupR TAATCCCAGCTCAGAATAACTCATT GCGATTCTCCAGACAG,

tdhdwR TTACAGGCTTTGTATTAAGAAAC,

tdhdwF CTGTCTGGAGAATCGCAATGAGTTATTCTGAGCTGGGATTA.

Оба полученных ПЦР-продукта используют в качестве матрицы в следующей ПЦР по праймерам kblupF и tdhdwR. Полученным продуктом 447 п.о. трансформируют штамм с делецией Δkbl-tdh::attR-cat-sacB-attL, содержащий плазмиду pKD46.

Трансформанты отбирают на среде с SuLA при 37°C. Вырезание маркера подтверждают методом ПЦР по праймерам tdhseqR ACGGAATAATAACACTAAGTTTATTGG и kblupF. Потерю плазмиду pKD46 регистрируют по отсутствию роста на L-агаре с ампициллином 250

мкг/мл. В результате отобран штамм MG-THR1.3 с rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$.

1.4. Делеция гена *sstT*

Делецию гена *sstT* (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3: 3266028...326) проводят путем замены нуклеотидной последовательности гена на кассету *attR-cat-sacB-attL*, содержащую селективные маркеры устойчивости к хлорамфениколу и левансуказу. Кассету размером 3946 п.о. амплифицируют методом ПЦР с плазмиды pITA (фиг. 5) по праймерам:

sstT-up

ACAGAACGCACCAGGGATGTGCGACAACACAATGAAAGGATCGAAAAATGACAGG
GTTTTCCAGTCACGA,

sstT-dw

TTCCGCCGTAGACGAAAGGGGTAAACAATTAATTACGCAGGGCGCTATTTGATGTT
GTGTGGAATTGTGAGC. Штамм MG-THR1.3 трансформируют плазмидой pKD46

(фиг. 2). Из полученных трансформантов наращивают компетентные клетки при 30°C с индукцией арабинозой. Компетентные клетки трансформируют кассетой для инактивации гена *sstT*, трансформанты отбирают на чашках с L-агаром с добавлением хлорамфеникола (25 мкг/мл) и проверяют методом ПЦР на наличие целевой вставки. Для амплификации фрагмента используют следующие олигонуклеотиды

sst-seq-F ATGCTGGCCTGTTCCCCTCAC,

sac-sec-3 GCTGAACAAAACCTGGCCTTG.

В результате получают штамм с генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT::attR-cat-sacB-attL$.

Для вырезания маркеров из локуса *sstT* полученный штамм с делецией $\Delta sstT::attR-cat-sacB-attL$, несущий плазмиду pKD46 (фиг. 2) трансформируют ПЦР продуктом *sstT-up-down* размером 522 п.о. Для получения такого продукта, используя хромосому штамма MG1655, амплифицируют два фрагмента размерами 245 п.о. и 243 п.о. по двум парам праймеров *sstTupR*, *sstTupF* и *sstTdwF*, *sstTdwR*, соответственно.

sstTupR ACGCAGGGCGCTATTTGTCAATTTTCGATCCTTTCAT

sstTupF ATGTTGTCA TCAGTCTGGAAGC

sstTdwF ATGAAAGGATCGAAAAATGACAAATAGCGCCC TGCGT

sstTdwR CTGCGTAATGTGGTTTTCAA.

Оба полученных ПЦР-продукта используют в качестве матрицы в следующей ПЦР по праймерам *sstTupF* и *sstTdwR* для получения продукта *sstT-up-down*. После трансформации клетки переносят в пробирку объемом 20 мл с 2 мл рабочего раствора среды SOB. Пробирки инкубируют на качалке при 37°C со скоростью перемешивания 200 об/мин в течение 24 часов. После инкубирования различные разведения культуральной жидкости высевают на чашки с L-агаром. Чашки инкубируют в течение 20 часов при 37°C. Полученные клоны засевают на чашки с L-агаром, содержащим хлорамфеникол (25 мкг/мл), с добавлением ампициллина (250 мкг/мл) или без добавления антибиотиков. После инкубирования в течение 20 часов при 37°C отбирают клоны с отсутствием устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу. Отобранные клоны далее проверяют методом ПЦР на наличие делеции по гену *sstT*. Для амплификации фрагмента

используют следующие олигонуклеотиды sst-seq-F и sstTseqR. Отбирают один клон с подтвержденным генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$. Штамм обозначают как MG-THR1.4.

1.5 Получение мутаций $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$

Полученный штамм MG-THR1.4, трансформируют плазмидой pDL14 (Bubnov D.M. et al, Journal of microbiological methods. - 2018. - Т. 151. - С. 48-56.), схема которой представлена на Фиг. 6. Трансформантов отбирают на L-агаре по устойчивости к ампициллину (250 мкг/мл). Из одного трансформанта наращивают компетентные клетки, которые трансформируют смесью олигонуклеотидов

rpsL150-R

GAACACGGCATACTTTACGCAGCGCGGAGTTCGGTTTTCTAGGAGTGGTAGT

ATATACACGAGTACATAC,

2461-galKTyr38TAG

CTGGCCGCGTGAATTGATTGGTGAACACACCGACTAGAACGACGGTTTCGTT

CTGCCCTGCGCGATTGATTA,

araBTyr57

TAGCCCCGAATAACCAGTTCCGTCATCATCCGCGTGACTAGATTGAGTCAAT

GGAAGCGGCACTGAAAACCGTGCT.

Трансформанты отбирают на среде Эндо (производства Himedia, Индия, кат. номер M029) с добавлением 2 г/л галактозы, 2 г/л арабинозы и 250 мкг/мл стрептомицина.

Рекомбинанты отбирают по соответствующей окраске. Наличие мутаций во всех трех генах подтверждают секвенированием. Плазмиду pDL14 удаляют из штамма путем двойного посева до отдельной колонии на чашках с L-агром с добавлением 1 мМ ИПТГ (Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид). В результате отобран штамм с генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$.

Затем в полученный штамм вводят мутацию $rhaB^{Y163Am}$. Для этого его предварительно трансформируют плазмидой pDL14 (фиг. 6). Электрокомпетентные клетки, несущие плазмиду DL14, трансформируют олигонуклеотидом

rhaBTyr163TAG

TTCCACACATTGCTCACGCTCTGCTGATGCCGGATTAGTTCAGTTATCGCCTGACCGG

CAAGATGAACTGGGA.

Трансформанты отбирают на среде Эндо (производства Himedia, Индия, кат. номер M029) с добавлением 2 г/л рамнозы. Наличие мутации подтверждают секвенированием.

Плазмиду pDL14 удаляют посевом на L-агаре с 1 мМ ИПТГ. Полученный штамм с генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$ обозначают как MG-THR1.5.

1.6 Экспрессия оперона thrABC с десенсибилизирующей мутацией в гене thrA под регуляцией промотора P_{H-207}

Экспрессию генов треонинового оперона с десенсибилизирующей мутацией в штамме MG-THR1.5 проводят в два этапа. На первом этапе в хромосому в локус thrABC (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3: 377...5020) интегрируют конструкцию, которая заменяет нативный промотор оперона thrABC на

фаговый промотор P_{tac} , удаляет последовательность регуляторного пептида ThrL и вводит точечную мутацию, вызывающую замену Gly433Arg в аминокислотной последовательности ThrA, природный терминатор оперона заменяют терминатором TrnB. На втором этапе вырезают селективные маркеры из хромосомы и заменяют промотор P_{tac} на промотор P_{H207} .

Интегративную конструкцию получают путем рестрикции по Eco72I плазмиды pKK-up-SC-dw-thrABC-433 (RU 2546237), схема которой представлена на фиг. 7. Полученный после рестрикции фрагмент несет в своем составе модифицированный треониновый оперон, селективные маркеры cat и sacB, а также области гомологии к хромосоме выше и ниже thrABC. Полученным фрагментом ДНК размером 9882 п.о. трансформируют компетентные клетки штамма MG-THR1.5, несущего плазмиду pDL17 (Bubnov D.M. et al, Journal of microbiological methods. - 2018. - Т. 151. - С. 48-56.) (фиг. 8). Трансформанты отбирают на чашках с L-агаром в присутствии хлорамфеникола (25 мкг/мл). Плазмиду pDL17 удаляют путем культивирования штамма на чашках с L-агаром, содержащим 1 mM ИПТГ. Наличие модификации в нужном локусе подтверждают по наличию ПЦР-продукта размером 1096 п.о. по праймерам

thr-out-F GGCTGACGTTCTTACTGGTG,

catnew GTGTTACGGTGAAAACCTGG.

Один из полученных таким образом штаммов имеет генотип rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbltdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $attSC-P_{tac}-thrA^{433}BC-T_{trnB}$.

Для того чтобы удалить селективные маркеры, отобранный штамм повторно трансформируют плазмидой pDL17, как описано выше. Затем наращивают компетентные клетки и трансформируют фрагментом 718 п.о., полученным после ПЦР по праймерам

thr-out-F GGCTGACGTTCTTACTGGTG,

seqthr1r TCCAGAATATCGGCAACACG

В качестве матрицы ПЦР используют хромосому штамма Escherichia coli ВКПМ В-13207 (RU 2697499), несущего промотор P_{H207} перед треониновым опероном. Плазмиду pDL17 удаляют путем культивирования на L-агаре с 1 mM ИПТГ. Один из полученных таким образом штаммов с генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbltdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $P_{H207}-thrA^{433}BC-T_{trnB}$ обозначен как MG-THR1.6.

1.7 Экспрессия гена rhtA под регуляцией промотора P_{1107PR}

Экспрессию гена rhtA (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3: 849210...850097) под промотором P_{1107PR} проводят в два этапа:

1) заменяют нативный промотор P_{rhtA} кассетой, несущей маркеры cat, sacB, репрессор tetR и промотор $P_{LtetO-1}$; 2) вырезают маркеры из хромосомы, заменяя регулируемый промотор $P_{LtetO-1}$ на конститутивный P_{1107PR} .

Компетентные клетки Штамма MG-THR1.6, трансформируют плазмидой pDL17 (фиг. 8). Трансформанты отбирают на L-агаре с ампициллином 250 мкг/мл, и трансформируют ПЦР продуктом 4531 п.о. полученным амплификацией с плазмиды pLtet14, представленной на фиг. 9 (Выборная Т.В. и др., Биотехнология. - 2019. - Т. 35. - №. 4. - С. 42-54.) по праймерам

rhtA-Ltet-F

5'-CCAGCATTGGGTATATCCAGTACACTCCACGCTTTACTTAAGTC

TAGATACTAGTGCTTGGATTCTCACC

rhtA-Ltet-R2

5'-AATATGACTATTGGTAACCAGACCGGCATTTTACGTAATGAA

CCAGGCATACAACCTCCTTAGTACATGCTGATGTGCTCAGTATC.

Трансформанты отбирают на L-агаре с добавлением хлорамфеникола (25 мкг/мл). Плазмиду pDL17 удаляют путем культивирования на L-агаре с 1 мМ ИПТГ. Наличие модификации в нужном локусе подтверждают по наличию ПЦР-продукта размером 839 п.о. по праймерам:

rhtBamF2 TGGATCCGGGAAACTCTTCGCGATTTGTGAT

catnew GTGTTACGGTGAAAACCTGG.

Последовательности гена *rhtA* и промотора $P_{LtetO-1}$ были подтверждают полностью методом секвенирования. Один из клонов с подтвержденным генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $P_{H207-thrA}^{433}BC-T_{rrnB}$, $SC-tetR-P_{LtetO-1}-rhtA$ используют для дальнейшей работы.

Отобранный штамм повторно трансформируют плазмидой pDL17 (фиг. 8), затем компетентные клетки, несущие pDL17, трансформируют фрагментом 803 п.о., полученным после ПЦР по праймерам

rhtBamF2 TGGATCCGGGAAACTCTTCGCGATTTGTGAT,

rhtAseqR TGTAATAGCCCAACAAGCCC

В качестве матрицы ПЦР используют хромосому штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-13207 (RU 2697499), несущего промотор P_{1107PR} перед геном *rhtA*. Трансформантов отбирают на чашках со средой SuLA и проверяют методом секвенирования на наличие последовательности промотора P_{1107PR} перед геном *rhtA*. Один из отобранных трансформантов обозначен MG-THR1.7, он имеет генотип rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $P_{H207-thrA}^{433}BC-T_{rrnB}$, $P_{1077PR}-rhtA$

1.8 Получение мутаций $spoT^{T252ins(CATGAT)253A; G520T; G1585T}$

Штамм продуцент L-треонина *E. coli* ВКПМ В-3996 несет в геноме мутантный ген *spoT* (номер последовательности по базе данных GenBank NC_000913.3 U00096.3: 3822400...3824508): инсерция CATGAT с. 252_253, замена Cys176Gly, замена Phe531Leu. Известно, что указанные мутации увеличивают продукцию аминокислот в штаммах *E. coli*. Перенос мутаций из ВКПМ В-3996 в разрабатываемый штамм продуцент осуществляют в несколько стадий: внесение маркеров прямой и обратной селекции выше гена *spoT* в штамме ВКПМ В-3996; амплификация кассеты с полученного штамма, включая маркеры и ген мутантный ген *spoT*; трансформация полученной кассетой штамма MG-THR1.7 с последующим удалением маркеров.

Штамм ВКПМ В-3996 трансформируют плазмидой pDL17 (фиг. 8), отбирают трансформанты на L-агаре с добавлением ампициллина (250 мкг/мл.) Компетентные

клетки штамма ВКПМ В-3996, несущего pDL17 трансформируют ПЦР продуктом, полученным в результате амплификации по праймерам

gmK-Up aggcaaatgcggaagcagctacgcaaaacgcaacaactttgcgcaaaaagatgttggtggaattgtgagc,

gmK-Dw tacgagcttattatacacggcgcgccatgtgacgtagcccttgctcacacagggttttcccagtcacga.

В качестве матрицы используют плазмиду pPRC (фиг. 10). В своем составе плазида несет два маркера прямой и обратной селекции: ген *cat*, обуславливающий устойчивость к хлорамфениколу, и ген *gprL*, мутация в котором обуславливает устойчивость к стрептомицину. В результате трансформации отбирают клоны, устойчивые к хлорамфениколу. Один из клонов с подтвержденным генотипом *gprL-cat-gmK-spoT^{mut}* используют в качестве матрицы при амплификации продукта по праймерам:

gmK-outF3 catcgctcccactgttttatttg,

spot-outR1 CGTTATGAGGTTTGTGGACC.

Амплифицированным продуктом размером 5134 п.о. трансформируют компетентные клетки штамма MG-THR1.7, несущие плазмиду pDL17. Трансформанты отбирают по устойчивости к хлорамфениколу. Наличие целевой вставки подтверждают амплификацией по специфическим праймерам, наличие мутаций подтверждают методом секвенирования. В результате отбирают один клон с подтвержденным генотипом. Не теряя плазмиду pDL17, культуру клеток трансформируют ПЦР продуктом для вырезания селективных маркеров. Для удаления маркеров амплифицируют фрагмент ДНК с хромосомы MG1655 по праймерам

gmK-outF3 catcgctcccactgttttatttg,

gmK-outR2 ATGTTACCGTGGACTTCAC.

Трансформанты отбирают на чашках с L-агаром с добавлением стрептомицина (250 мкг/мл). Элиминацию плазмиды pDL17 проводят пересевом отобранных трансформантов на среде с добавлением 1 мМ ИПТГ. В результате работы отбирают 8 клонов с генотипом *rph^{wt}*, $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, *rpsL^{K43R}*, *galK^{Tyr38TAG}*, *araB^{Tyr57TAG}*, *rhaB^{Tyr163TAG}*, *P_{H207-thrA}⁴³³BC-T_{trnB}*, *P_{1077PR-rhtA}*, *spoT^{T252ins(CATGAT) 253A}*; G520T; C1585T.

Пример 2. Синтез L-треонина заявляемым штаммом в пробирках

Для оценки биотехнологического потенциала клонов, полученных на этапе 1.7, проводят ферментацию в пробирках. В качестве контрольного штамма используют штамм MG-THR1.6, полученный на этапе 1.6 и базовый штамм MG1655.

Штаммы выращивают на чашках с L-агаром в течение 24 часов при 37°C. Для приготовления инокулята используют посевную среду следующего состава (мас. %)

Дрожжевой экстракт	3,5
Глюкоза	0,25
NaCl	0,25
KH ₂ PO ₄	0,25
Вода	остальное

В пробирки объемом 50 мл с рабочим объемом 5 мл посевной среды вносят биомассу клеток до стартового значения оптической плотности равной ОП_{660нм} 0,1 ед. Пробирки инкубируют на роторной качалке в течение 5 часов при 37°C и скорости перемешивания 220 об/мин. Для основного процесса ферментации используют среду следующего состава

(мас. %):

	Глюкоза	4,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
5	Кукурузный экстракт	1,0
	KH ₂ PO ₄	0,25
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
	Лимонная кислота	0,0192
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,003
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0021
10	Бис-трис	5,0
	Вода	остальное

Растворы глюкозы, сульфата марганца и сульфата магния стерилизуют отдельно автоклавированием при 121°C в течение 40 мин. Навески CaCO₃ по 40 мг стерилизуют в стеклянных пробирках автоклавированием при 121°C в течение 20 мин. рН доводят до значения 7,0. Раствор сульфата железа стерилизуют фильтрованием через мембрану диаметром пор 22 мкм.

Полученный инокулят вносят в пробирки объемом 50 мл с рабочим объемом 2 мл ферментационной среды до стартовой оптической плотности ОП₆₆₀ нм 0,1 ед. Клетки культивируют в течение 24 часов при 37°C на роторной качалке - 220 об/мин.

После выращивания количество накопленного в среде L-треонина определяют с методом ВЭЖХ (Waters 2695, Alliance). Результаты ферментации восьми клонов приведены в табл. 1.

Таблица 1.

25	Штамм-продуцент <i>Escherichia coli</i>	Продукция треонина, г/л
	клон 1	8,26
30	клон 2	8,57
	клон 3	8,50
	клон 4	8,39
35	клон 5	8,12
	клон 6	8,44
	клон 7	8,27
40	клон 8	7,77
	MG-THR1.6 (повторность 1)	6,46
	MG-THR1.6 (повторность 2)	6,56
45	MG1655 (повторность 1)	<1,0
	MG1655 (повторность 2)	<1,0

Как видно из табл. 1, клон 2, накапливает большее количество L-треонина по сравнению с родительским штаммом MG-THR1.6 и базовым штаммом MG1655. Отобранный клон 2 депонирован в Биоресурсном центре Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» -

5 ГосНИИГенетика как *Escherichia coli* ВКПМ В-13427.

Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-13427 характеризуется следующими признаками:

Культурально-морфологические характеристики заявляемого штамма

10 Грамм-отрицательная бактерия. Суточная культура в жидкой LB представлена слабо подвижными клетками округлой формы 1 мкм в диаметре. При культивировании на L-агаре в течение 18-24 часов при 37°C образует круглые, беловатый, полупрозрачные на свет колонии колонии 1 - 2 мм, поверхность колонии гладкая, края ровные или слегка волнистые, центр колоний приподнят, структура однородная, консистенция пастообразная, легко эмульгируется. При культивировании на агаризованной среде Эндо при 37°C образуются колонии, круглой формы с ровным четко очерченным краем

15 малиново-красного цвета с металлическим блеском. Диаметр колоний 0,5-1,5 мм. При культивировании на тетразолиевом агаре с добавлением одного из сахаров: арабинозы, галактозы, рамнозы образуются красно-вишневые колонии.

Физиолого-биохимические характеристики

20 Факультативный анаэроб. Сахара не сбраживает. Ассимилирует: D-глюкозу, D-маннитол, D-ксилозу. Не ассимилирует: галактозу, лактозу, арабинозу и рамнозу. Отсутствует способность к гидролизу крахмала. Заявляемый штамм продуцирует L-треонин. Оптимальное значение pH для роста 7,2-7,4. Не растет при температурах выше 45°C. Оптимальная температура роста 37°C. Штамм не патогенен.

Таким образом, сконструирован штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-13427, обладающий

25 следующим генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $P_{H207-thrA}^{433}BC-T_{trnB}$, $P_{1077PR-rhtA}$, $spoT^{T252ins(CATGAT)253A}$; $G520T$; $C1585TAG$, способный синтезировать до 8,6 г/л L-треонина при культивировании в пробирках. Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-13427 получен из штамма дикого типа

30 MG1655 путем введения направленных модификаций и не несет неизвестных мутаций. Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-13427 характеризуется высокой скоростью роста и скоростью синтеза L-треонина.

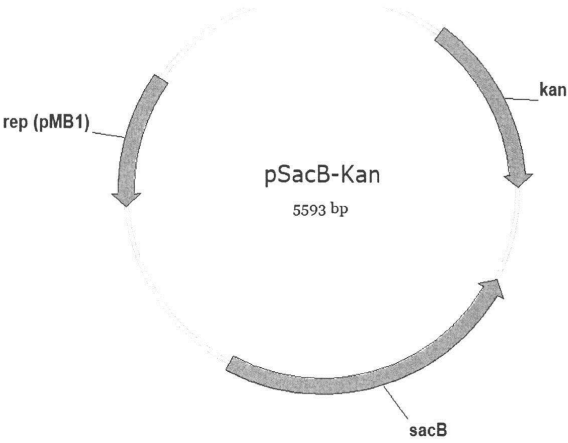
(57) Формула изобретения

35 Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-13427 с генотипом rph^{wt} , $\Delta tdcBCDE$, $\Delta kbl-tdh$, $\Delta sstT$, $rpsL^{K43R}$, $galK^{Tyr38TAG}$, $araB^{Tyr57TAG}$, $rhaB^{Tyr163TAG}$, $P_{H207-thrA}^{433}BC-T_{trnB}$, $P_{1077PR-rhtA}$, $spoT^{T252ins(CATGAT)253A}$; $G520T$; $C1585T$ - продуцент L-треонина.

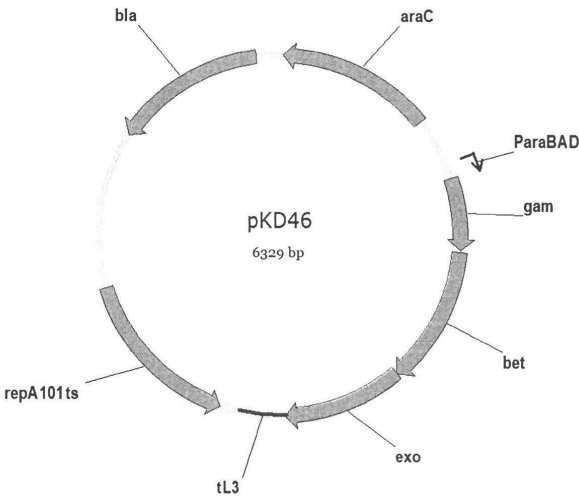
40

45

1

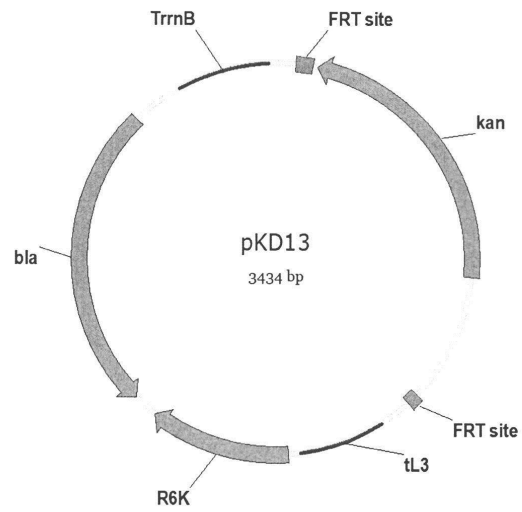


Фиг. 1

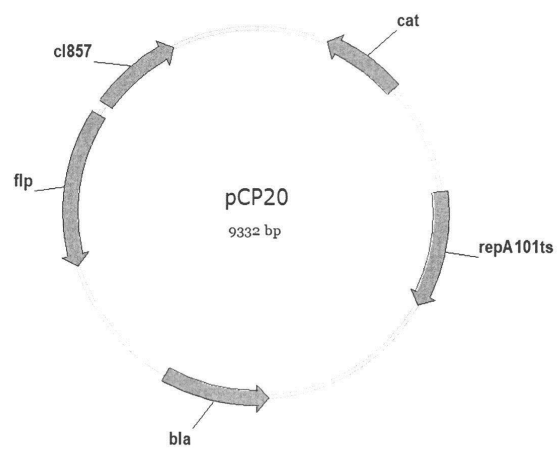


Фиг. 2

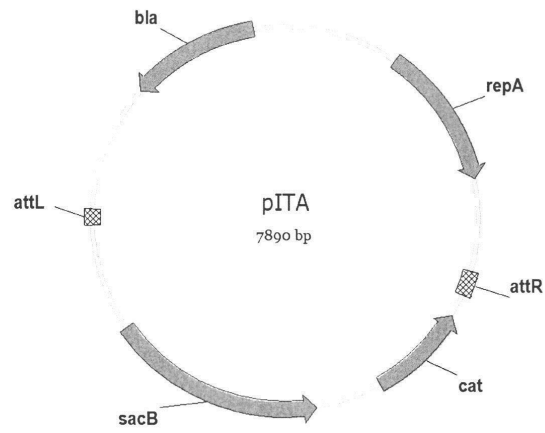
2



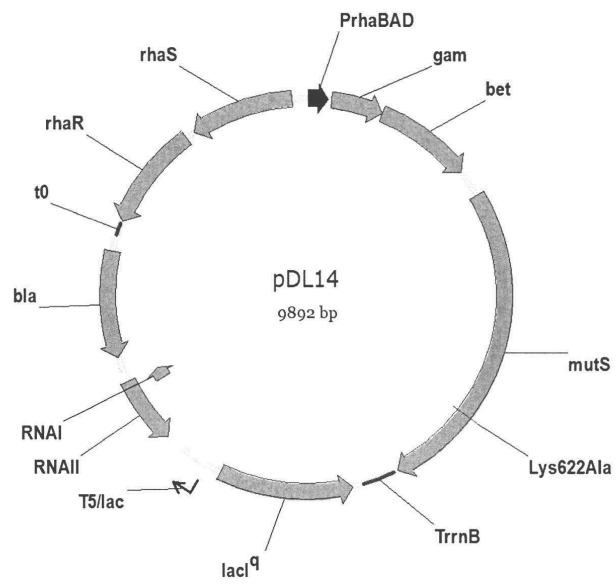
Фиг. 3



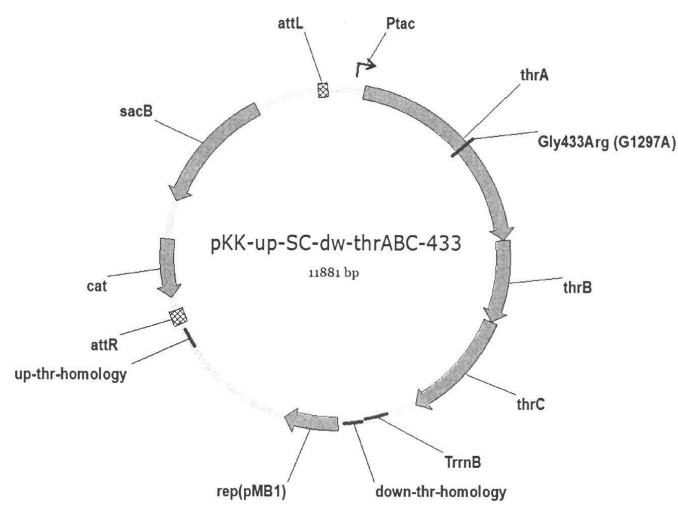
Фиг. 4



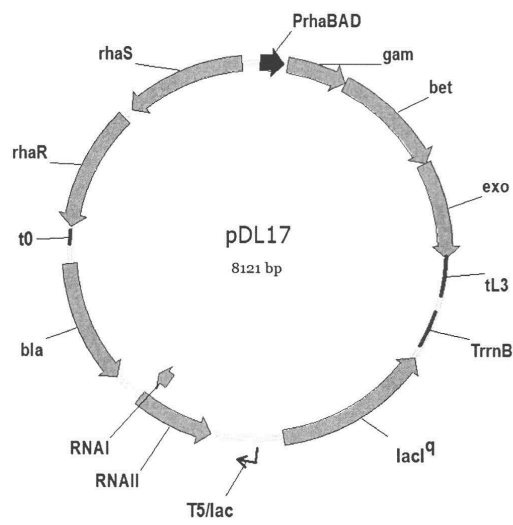
Фиг. 5



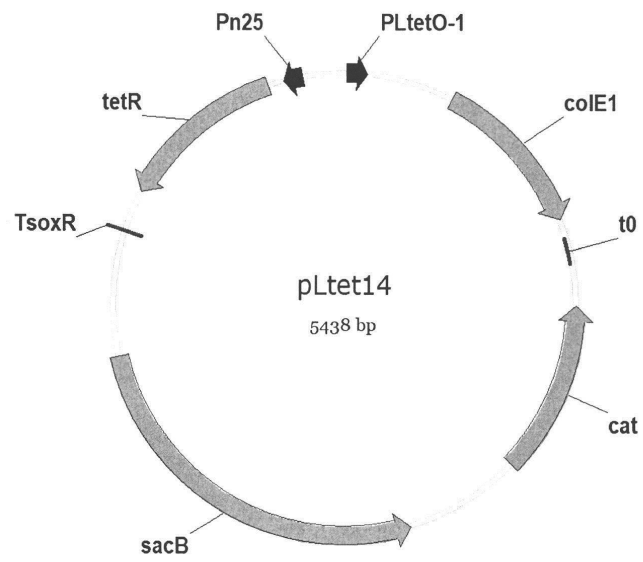
Фиг. 6.



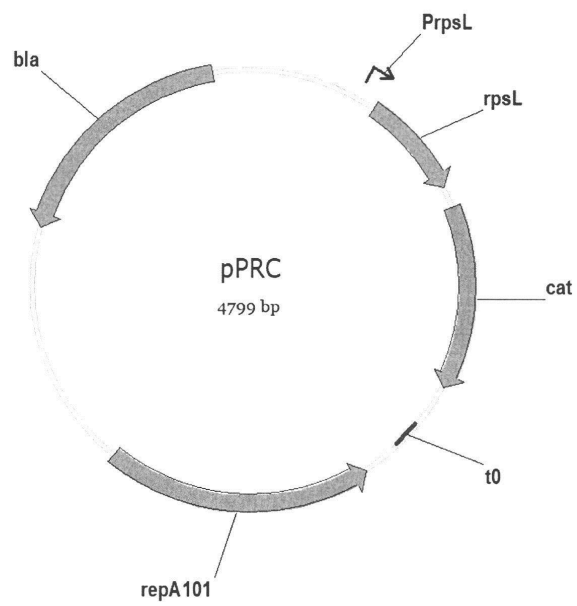
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10