

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390301** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.06.13

(22) Дата подачи заявки
2021.06.28

(51) Int. Cl. *C12P 13/00* (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГУАНИДИНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ**

(31) **20184966.8**

(32) **2020.07.09**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/067647**

(87) **WO 2022/008276 2022.01.13**

(71) Заявитель:
**ЭВОНИК ОПЕРЕЙШЕНС ГМБХ
(DE)**

(72) Изобретатель:

**Шнайдер Франк, Янкович Франк
(DE)**

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к микроорганизму, трансформированному L-аргинин:глицинаминотрансферазой, и малатсинтазой со сниженной активностью, и глиоксилатаминотрансферазой для обеспечения способности продуцировать гуанидинуксусную кислоту (GAA), и к способу ферментативного получения GAA с применением такого микроорганизма. Настоящее изобретение также относится к способу ферментативного получения креатина.

202390301
A1

202390301

A1

СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГУАНИДИНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Настоящее изобретение относится к микроорганизму, трансформированному для обеспечения способности продуцировать гуанидинуксусную кислоту (GAA), и к способу ферментативного получения GAA с применением такого микроорганизма. Настоящее изобретение также относится к способу ферментативного получения креатина.

GAA представляет собой органическое соединение, применяемое в качестве кормовой добавки для животных (US2011257075 A1). GAA представляет собой естественный предшественник креатина (например, Humm et al., *Biochem. J.* (1997) 322, 771-776). Следовательно, добавление GAA обеспечивает оптимальное поступление креатина в организм.

Настоящее изобретение относится к способу получения GAA посредством ферментативного процесса с применением промышленного сырья (например, аммиака, аммониевых солей и субстратов, содержащих глюкозу или сахар) в качестве исходного материала. В биологических системах GAA и L-орнитин образуются из аргинина и глицина в качестве исходных материалов посредством каталитического действия L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT; EC 2.1.4.1), что представляет собой первую стадию биосинтеза креатина:



Guthmiller et al. (*J Biol Chem.* 1994 Jul 1;269(26):17556-60) определяли характеристики AGAT почки крысы путем клонирования и гетерологичной экспрессии фермента в *Escherichia coli* (*E. coli*). Muenchhoff et al. (*FEBS Journal* 277 (2010) 3844–3860) сообщают о первом определении характеристик AGAT из прокариот также путем клонирования и гетерологичной экспрессии фермента в *E. coli*. Sosio et al. (*Cell Chemical Biology* 25, 540–549, May 17, 2018) выяснили путь биосинтеза псевдоуридимуцина в *Streptomyces* sp. Они описывают в качестве промежуточной реакции образование GAA и L-орнитина посредством реакции L-

аргинина с глицином, катализируемой с помощью P_{umN}, L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT).

Из литературы также известно несколько подходов для увеличения получения одного из исходных материалов в синтезе ГАА, т.е. L-аргинина, в микроорганизмах, в частности бактериях. Обзор метаболической инженерии *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) для получения L-аргинина представлен Park et al. (NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms5618). Они предлагают случайный мутагенез и скрининг продуцентов L-аргинина из уже продуцирующих L-аргинин штаммов *C. glutamicum*, например, ATCC 21831 (Nakayama and Yoshida 1974, US3849250 A), и поэтапную рациональную метаболическую инженерию на основе общесистемного анализа результатов метаболизма при постепенном увеличении получения L-аргинина на всех стадиях конструирования штамма. Yim et al. (J Ind Microbiol Biotechnol (2011) 38:1911–1920) смогли показать, что инактивация *argR*, гена, кодирующего центральный репрессорный белок ArgR, контролирующей путь биосинтеза L-аргинина, путем разрушения хромосомного гена *argR* в *C. glutamicum* ведет к улучшенному продуцирующему аргинин штамму. Ginesy et al. (Microbial Cell Factories (2015) 14:29) сообщают об успешном конструировании *E. coli* для усиленного продуцирования аргинина. Среди прочего, они предложили делецию репрессорного гена *argR*.

О способе применения генетически рекомбинантного штамма, где ген, который подавляет экспрессию биосинтезирующего аргинин оперона, *argR*, был инактивирован, сообщали Suga et al. (US20070031946 A1). В частности, делеция в *argR*, который контролирует аргининовый оперон, рассматривалась как важный фактор в получении аргинина.

Fan Wenchaо раскрывает способ получения креатина путем ферментации непатогенных микроорганизмов, таких как *C. glutamicum* (CN106065411 A). Микроорганизмы характеризуются следующими функциями биотрансформации: превращение глюкозы в L-глутаминовую кислоту; превращение L-глутаминовой кислоты в N-ацетил-L-глутаминовую кислоту; превращение N-ацетил-L-глутаминовой кислоты в полуальдегид N-ацетил-L-глутаминовой кислоты; превращение полуальдегида N-ацетил-L-глутаминовой кислоты в N-ацетил-L-

орнитин; превращение N-ацетил-L-орнитина в L-орнитин; превращение L-орнитина в L-цитруллин; превращение L-цитруллина в аргинино-янтарную кислоту; превращение аргинино-янтарной кислоты в L-аргинин; превращение L-аргинина в гуанидинуксусную кислоту и, наконец, превращение гуанидинуксусной кислоты в креатин. Fan Wenchaо предполагает, что микроорганизм сверхэкспрессирует один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из N-ацетилглутаматсинтазы, N-ацетилорнитин- δ -аминотрансферазы, N-ацетилорнитиназы, орнитинкарбамоилтрансферазы, аргининосукцинатсинтетазы, глицинамидинотрансферазы (ЕС: 2.1. 4.1) и гуанидинацетат-N-метилтрансферазы (ЕС: 2.1.1.2). Микроорганизм сверхэкспрессирует предпочтительно глицинамидинотрансферазу (L-аргинин:глицинамидинотрансферазу) и гуанидинацетат-N-метилтрансферазу.

Что касается второго исходного материала в биосинтезе GAA, будет необходимым увеличение обеспечения глицином с целью улучшить биосинтез GAA у микроорганизмов, у которых в природе есть гомологичный ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT), или которые имели гетерологичный ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT).

Так называемый путь глиоксилатного шунта, встречающийся в природе у микроорганизмов, таких как *E. coli* или *C. glutamicum*, является побочной реакцией цикла трикарбоновых кислот (ТСА) (цикла Кребса) и включает образование глиоксилата и сукцината из изоцитрата посредством изоцитратлиазы и образование малата из глиоксилата и ацетил-СоА посредством малатсинтазы (Salusjärvi et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* (2019) 103:2525–2535).

Глиоксилат может применяться в качестве исходного материала для образования глицина в присутствии донора аминогруппы, такого как аминокислоты, и глиоксилаттрансаминазы.

В попытке улучшить получение гликолята в *C. glutamicum* Zahoor et al. (*Journal of Biotechnology* 192 (2014) 366–375) достигли повышения поступления предшественника глиоксилата среди прочего путем удаления гена малатсинтазы *aceB*.

Глиоксилаттрансаминазы катализируют перенос аминогруппы с аминокислоты на глиоксилат. Продукты этого переноса представляют собой глицин и соответствующую α -кетокислоту.

Известны несколько глиоксилатаминотрансфераз, и они отличаются субстратной специфичностью по отношению к донору аминогруппы (ср., например, Kameya et al. FEBS Journal 277 (2010) 1876–1885; Liepman and Olsen, Plant Physiol. Vol. 131, 2003, 215-227; Sakuraba et al., JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Aug. 2004, p. 5513–5518; Takada and Noguchi, Biochem. J. (1985) 231, 157-163). Поскольку большинство таких глиоксилатаминотрансфераз способны использовать разные аминокислоты в качестве доноров аминогруппы, они часто помечаются разными шифрами ЕС. Однако, общим для всех таких аминотрансфераз является то, что они используют глиоксилат в качестве акцепторной молекулы или, в случае обратной реакции, глицин в качестве донорной молекулы.

Примерами белка, обладающего функцией глиоксилатаминотрансферазы, являются следующие.

Глицинтрансаминаза (ЕС 2.6.1.4) катализирует реакцию:
L-глутамат + глиоксилат \rightleftharpoons альфа-кетоглутарат + глицин.

Глицин:оксалоацетаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.35) катализирует реакцию:
L-аспартат + глиоксилат \rightleftharpoons оксалоацетат + глицин.

Аланин:глиоксилаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.44) катализирует реакцию:
L-аланин + глиоксилат \rightleftharpoons пируват + глицин.

Серин:глиоксилаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.45) катализирует реакцию:
L-серин + глиоксилат \rightleftharpoons 3-гидроксипируват + глицин.

Метионин:глиоксилаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.73) катализирует реакцию:
L-метионин + глиоксилат \rightleftharpoons 4-(метилсульфанил)-2-кетобутаноат + глицин.

Ароматическая аминокислота:глиоксилаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.60) катализирует реакцию:

ароматическая аминокислота + глиоксилат \rightleftharpoons ароматическая кетокислота + глицин.

Кинуренин:глиоксилаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.63) катализирует реакцию:
кинуренин + глиоксилат \rightleftharpoons 4-(2-аминофенил)-2,4-дикетобутаноат + глицин.

(S)-Уреидоглицин:глиоксилаттрансаминаза (ЕС 2.6.1.112) катализирует реакцию:
(S)-уреидоглицин + глиоксилат \rightleftharpoons N-карбамоил-2-кетоглицин + глицин.

Задачей, лежащей в основе настоящего изобретения, является получение микроорганизма, трансформированного для обеспечения способности продуцировать гуанидинуксусную кислоту (GAA), в частности микроорганизма с улучшенной способностью обеспечивать глицин в качестве исходного материала в биосинтезе GAA, и способ ферментативного получения GAA с применением такого микроорганизма.

Задача решается с помощью микроорганизма, содержащего по меньшей мере один ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, и где активность белка, обладающего функцией малатсинтазы, снижена по сравнению с соответствующей активностью микроорганизма дикого типа.

Активность белка, обладающего функцией малатсинтазы, может быть понижена путем обеспечения мутации белка с получение белка, обладающего меньшей ферментативной активностью, чем белок дикого типа, путем ослабления экспрессии гена, кодирующего фермент, обладающий функцией малатсинтазы, по сравнению с экспрессией соответствующего гена у микроорганизма дикого типа, путем понижения эффективности трансляции, например путем изменения старт-кодона ATG на GTG, путем введения вторичных структур в 5'-нетранслируемую область мРНК или путем уменьшения частоты использования кодона или путем удаления гена, кодирующего фермент, обладающий функцией малатсинтазы.

Предпочтительно, в микроорганизме в соответствии с настоящим изобретением экспрессия гена, кодирующего белок, обладающий функцией малатсинтазы, ослаблена по сравнению с экспрессией соответствующего гена у микроорганизма дикого типа или ген кодирующий белок, обладающий функцией малатсинтазы, удален.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения микроорганизм по настоящему изобретению дополнительно предусматривает повышенную активность фермента, обладающего функцией глиоксилатаминотрансферазы, по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

Микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит по меньшей мере один ген кодирующий белок, обладающий ферментативной активностью глиоксилатаминотрансферазы.

В микроорганизме по настоящему изобретению по меньшей мере один ген, кодирующий белок, обладающий ферментативной активностью глиоксилатаминотрансферазы, является гомологичным или гетерологичным.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения в микроорганизме по настоящему изобретению по меньшей мере один ген, кодирующий белок, обладающий ферментативной активностью глиоксилатаминотрансферазы, является сверхэкспрессированным.

Предпочтительно, микроорганизм по настоящему изобретению характеризуется повышенной способностью продуцировать L-аргинин по сравнению со способностью микроорганизма дикого типа.

В контексте настоящего изобретения микроорганизм, обладающий повышенной способностью продуцировать L-аргинин, означает микроорганизм, продуцирующий L-аргинин, превышая собственную потребность. Примеры таких продуцирующих L-аргинин микроорганизмов представляют собой, например, ATCC 21831 *C. glutamicum* или таковые, раскрытые Park et al. (NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms5618) или Ginesy et al. (Microbial Cell Factories (2015) 14:29).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения микроорганизм характеризуется повышенными показателями активности фермента, обладающего функцией карбамоилфосфатсинтазы (ЕС 6.3.4.16), по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

Активность фермента, обладающего функцией аргининосукцинатлиазы (ЕС 4.3.2.1), у микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением может быть повышена по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

Кроме того, у микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением активность фермента, обладающего функцией орнитинкарбамоилтрансферазы (ЕС 2.1.3.3), может быть повышена по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

У микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением активность фермента, обладающего функцией аргининосукцинатсинтетазы (Е.С. 6.3.4.5), также может быть повышена по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

Повышенная ферментативная активность у микроорганизмов может достигаться, например, за счет мутации соответствующего эндогенного гена. Дополнительная мера повышения показателей ферментативной активности может быть предназначена для стабилизации мРНК, кодирующей ферменты. Повышенные показатели активности указанных выше ферментов могут также достигаться за счет сверхэкспрессии генов, кодирующих соответствующие ферменты.

Микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно также содержит по меньшей мере один или более сверхэкспрессируемых генов, выбранных из группы, состоящей из гена (например, *argF/argF2/argI*), кодирующего белок, обладающий функцией орнитинкарбамоилтрансферазы (ЕС 2.1.3.3), гена (например, *argG*), кодирующего белок, обладающий функцией аргининосукцинатсинтетазы (Е.С. 6.3.4.5), и гена (например, *argH*), кодирующего белок, обладающий функцией аргининосукцинатлиазы (Е.С. 4.3.2.1).

Кроме того, у микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением может обеспечиваться сверхэкспрессия аргининового оперона (*argCJBDFR*).

В качестве альтернативы у микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением ген *argR*, кодирующий чувствительный к аргинину репрессорный белок ArgR, может быть ослаблен или удален.

В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению и необязательно в дополнение к указанным выше модификациям по меньшей мере один или более генов, кодирующих фермент пути биосинтеза L-аргинина, включающих *gdh*, *argJ*, *argB*, *argC* и/или *argD*, кодирующие глутаматдегидрогеназу, орнитинацетилтрансферазу, ацетилглутаматкиназу, ацетилглутамилфосфатредуктазу и ацетилорнитинаминотрансферазу соответственно, сверхэкспрессируются в микроорганизме в соответствии с настоящим изобретением.

В таблице 1 показаны различные названия ферментов, участвующих в биосинтезе аргинина и способствующие биосинтезу аргинина в различных видах, т. е. *E. coli*, *C. glutamicum* и *Pseudomonas putida* (*P. putida*).

Таблица 1. Названия ферментов

Название фермента	Альтернативные названия	Шифр ЕС	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>P. putida</i>
глутаматдегидрогеназа	NADP-СПЕЦИФИЧНАЯ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА	1.4.1.4 (1.4.1.2 у <i>P. putida</i>)	gdhA	gdh	gdhA/ gdhB
N-ацетилглутамокиназа	АЦЕТИЛГЛУТАМАТКИНАЗА	2.7.2.8	argB	argB	argB
N-ацетилглутамилфосфатредуктаза	N-ацетил-гамма-глутамилфосфатредуктаза	1.2.1.38	argC	argC	argC
N-ацетилглутаминовая кислота-γ-полуальдегид дегидрогеназа	АЦЕТИЛОРНИТИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА (в е.с. бифункциональная ацетилорнитинаминотрансфераза/сукцинилдиаминопимелатаминотрансфераза)	2.6.1.11 / 2.6.1.17	argD	argD	aruC
ацетилорнитиндеацетилаза	бифункциональная ацетилорнитиндеацетилаза / ГЛУТАМАТ-N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗА	2.3.1.35 / 2.3.1.1		argJ	argJ
ацетилорнитиндеацетилаза		3.5.1.16	argE		argE
	ГЛУТАМАТ-N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗА	2.3.1.1	argA		argA
орнитинкарбамоилтрансфераза	орнитинкарбамоилтрансфераза 1	2.1.3.3	argI	argF/argF2	arcB/argF
Аргининосукцинатсинтаза	АРГИНИНОСУКЦИНАТСИНТАЗА	6.3.4.5	argG	argG	argG

Название фермента	Альтернативные названия	Шифр ЕС	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>P. putida</i>
Аргининосукцинатлиаза	АРГИНИНОСУКЦИНАТЛИАЗА	4.3.2.1	argH	argH	argH
карбамоилфосфатсинтаза	карбамоилфосфатсинтаза	6.3.5.5	carAB	carAB	carAB
карбаматкиназа	карбаматкиназа	2.7.2.2	ybcF /yqeA		arcC

Сверхэкспрессия гена, как правило, достигается путем повышения числа копий гена, и/или путем функционального связывания гена с сильным промотором, и/или путем усиления сайта связывания рибосомы, и/или оптимизации частоты использования старт-кодона, или целого гена, или комбинации, включающей отбор всех способов, указанных выше.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения микроорганизма по настоящему изобретению ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, является гетерологичным.

Гетерологичный ген означает, что ген вставляли в организм-хозяин, который в природе не имеет данного гена. Вставка гетерологичного гена в хозяина проводится с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Микроорганизмы, которые подвергались технологии рекомбинантных ДНК, называются трансгенными, генетически модифицированными или рекомбинантными.

Гетерологичный белок означает белок, который не встречается у микроорганизма в природе.

Гомологичный или эндогенный ген означает, что ген, в том числе его функция как таковая или нуклеотидная последовательность гена, встречается у микроорганизма в природе или является «природным» для микроорганизма.

Гомологичный или природный белок означает белок, который встречается у микроорганизма в природе.

Белки, обладающие функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT), относятся к семейству амидинотрансфераз. Семейство амидинотрансфераз включает

глицин (ЕС:2.1.4.1) и инозамин (ЕС:2.1.4.2) амидинотрансферазы, ферменты, участвующие в биосинтезе креатина и стрептомицина соответственно. Данное семейство также включает аргининдезимиразу, ЕС:3.5.3.6. Данные ферменты катализируют реакцию: аргинин + H₂O \rightleftharpoons цитруллин + NH₃. Также в этом семействе обнаружен противоопухолевый гликопротеин у *Streptococcus*. Также описывается, что ферменты или белки с активностью L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT) обладают консервативным доменом, который относится к семейству PFAM: Amidinotransf (PF02274) (: Marchler-Bauer A et al. (2017), «CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.», Nucleic Acids Res. 45(D1):D200-D203.), как описано также в следующих публикациях: Pissowotzki K et al., Mol Gen Genet 1991;231:113-123 (PUBMED:1661369 EPMC:1661369); D'Hooghe I et al., J Bacteriol 1997;179:7403-7409 (PUBMED:9393705 EPMC:9393705); Kanaoka M et al. , Jpn J Cancer Res 1987;78:1409-1414 (PUBMED:3123442 EPMC:3123442).

У микроорганизма по настоящему изобретению ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, может дополнительно сверхэкспрессироваться. Сверхэкспрессия гена, как правило, достигается путем повышения числа копий гена, и/или путем функционального связывания гена с сильным промотором, и/или путем усиления сайта связывания рибосомы, и/или оптимизации частоты использования старт-кодона, или целого гена, или комбинации, включающей отбор всех способов, указанных выше.

Белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы в микроорганизме по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% гомологичной, предпочтительно по меньшей мере 90% гомологичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11. В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению аминокислотная последовательность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы является идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения белок, обладающий ферментативной активностью глиоксилатаминотрансферазы, у микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотную

последовательность, которая является на по меньшей мере 80% гомологичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, под с SEQ ID NO: 5 или под SEQ ID NO: 8.

Микроорганизм по настоящему изобретению может относиться к роду *Corynebacterium*, предпочтительно *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), или к роду *Enterobacteriaceae*, предпочтительно *Escherichia coli* (*E. coli*), или к роду *Pseudomonas*, предпочтительно *Pseudomonas putida* (*P. putida*).

Повышенная ферментативная активность белка у микроорганизма, в частности у микроорганизма по настоящему изобретению, по сравнению с соответствующей активностью у микроорганизма дикого типа может быть достигнута, например, путем обеспечения мутации белка, в частности путем обеспечения мутации, придающей белку устойчивость по типу обратной связи, например, к продукту реакции, катализируемой ферментом, или путем повышения уровня экспрессии гена, кодирующего белок, обладающий ферментативной активностью, по сравнению с экспрессией соответствующего гена у микроорганизма дикого типа.

Повышенный уровень экспрессии или сверхэкспрессия гена у микроорганизма, в частности у микроорганизма по настоящему изобретению, по сравнению с соответствующей активностью у микроорганизма дикого типа может быть достигнута путем повышения числа копий гена, и/или усиления регуляторных факторов, например, путем функционального связывания гена с сильным промотором, и/или путем усиления сайта связывания рибосомы, и/или оптимизации частоты использования старт-кодона или целого гена. Усиление таких регуляторных факторов, которые положительно влияют на экспрессию генов, может, например, достигаться с помощью модифицирования промоторной последовательности, расположенной выше структурного гена, для увеличения эффективности промотора или путем полной замены указанного промотора на более эффективный или так называемый сильный промотор. Промоторы располагаются выше гена. Промотор представляет собой последовательность ДНК, состоящую из приблизительно 40-50 пар оснований, и которые составляют сайт связывания для холофермента РНК-полимеразы и стартовую точку транскрипции, в результате чего можно влиять на силу экспрессии контролируемого полинуклеотида или гена. Как правило, возможно достичь сверхэкспрессии или повысить экспрессию генов в бактериях путем отбора

сильных промоторов, например, путем замены первоначального промотора сильными нативными (первоначально относившимися к другим генам) промоторами или путем модификации определенных участков приведенных нативных промоторов (например, их так называемых участков -10 и -35) в сторону консенсусной последовательности, например, как изложено M. Patek et al. (Microbial Biotechnology 6 (2013), 103-117) для *C. glutamicum*. Примером «сильного» промотора является промотор супероксиддисмутазы (*sod*) («Psod»; Z. Wang et al., Eng. Life Sci. 2015, 15, 73–82). Выражение «функциональная связь» понимают в значении последовательное расположение промотора с геном, который приводит к транскрипции гена.

Генетический код является вырожденным, что означает, что определенная аминокислота может кодироваться несколькими различными триплетами. Термин «частота использования кодонов» относится к наблюдению того, что определенный организм, как правило, не будет использовать каждый возможный кодон для определенной аминокислоты с одной и той же частотой. Вместо этого организм, как правило, будет демонстрировать определенные предпочтения для конкретных кодонов, что означает, что данные кодоны обнаруживаются чаще в кодирующей последовательности транскрибируемых генов организма. Если определенный ген, чужеродный для своего будущего хозяина, т. е. из другого вида, должен быть экспрессирован в будущем организме-хозяине, то тогда кодирующая последовательность указанного гена должна быть скорректирована в соответствии с частотой использования кодонов указанного будущего организма-хозяина (т. е. оптимизация частоты использования кодонов).

Указанная выше задача дополнительно решается с помощью способа ферментативного получения гуанидинуксусной кислоты (GAA), включающего стадии: а) культивирования микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше, в подходящей среде в подходящих условиях и б) накопление GAA в среде для образования ферментационного бульона, содержащего GAA.

Способ по настоящему изобретению может дополнительно включать стадию выделения GAA из ферментационного бульона.

Способ в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно включать стадию высушивания и/или гранулирования ферментационного бульона, содержащего ГАА.

Настоящее изобретение дополнительно относится к микроорганизмам, определенным выше, дополнительно содержащим ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы (ЕС: 2.1.1.2). Предпочтительно ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы, свехэкспрессируется.

Настоящее изобретение также относится к способу ферментативного получения креатина, включающему стадии: а) культивирования микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением, содержащего ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы, в подходящей среде в подходящих условиях и б) накопления креатина в среде для образования ферментационного бульона, содержащего креатин.

Предпочтительно способ дополнительно включает выделение креатина из ферментационного бульона, содержащего креатин. Креатин можно экстрагировать из ферментационного бульона с помощью способа с применением изоэлектрической точки и/или способа ионного обмена. В качестве альтернативы креатин можно дополнительно очищать с помощью способа перекристаллизации в воде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

А) МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Химические вещества

Раствор канамицина из *Streptomyces kanamyceticus* приобретали у Sigma Aldrich (Сент-Луис, США, № по кат. K0254). IPTG (изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид) приобретали у Carl-Roth (Карлсруэ, Германия, № по кат. 2316.4). Если не указано иное, все остальные химические вещества приобретали как чистые для анализа у Merck (Дармштадт, Германия), Sigma Aldrich (Сент-Луис, США) или у Carl-Roth (Карлсруэ, Германия).

Культивирование для пролиферации клеток

Если не указано иное, все процедуры культивирования/инкубации выполняли, как описано в данном разделе ниже.

a. Бульон LB (MILLER) от Merck (Дармштадт, Германия; № по кат. 110285) применяли для культивирования штаммов *E. coli* в жидкой среде. Жидкие культуры (10 мл жидкой среды на колбу Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл) инкубировали в стандартном шейкере-инкубаторе Marine HT Multitron от Infors GmbH (Боттминген, Швейцария) при 30°C и 200 об./мин.

b. Агар LB (MILLER) от Merck (Дармштадт, Германия № по кат. 110283) применяли для культивирования штаммов *E. coli* на чашках с агаром. Чашки с агаром инкубировали при 30°C в мини-инкубаторе INCU-Line® от VWR (Раднор, США).

c. Бульон с сердечно-мозговым экстрактом (ВНІ) от Merck (Дармштадт, Германия; № по кат. 110493) применяли для культивирования штаммов *S. glutamicum* в жидкой среде. Жидкие культуры (10 мл жидкой среды на колбу Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл) инкубировали в стандартном шейкере-инкубаторе Infors HT Multitron от Infors GmbH (Боттминген, Швейцария) при 30°C и 200 об./мин.

d. Агар с сердечно-мозговым экстрактом (ВНІ-агар) от Merck (Дармштадт, Германия; № по кат. 113825) применяли для культивирования штаммов *S. glutamicum* на чашках с агаром. Чашки с агаром инкубировали при 30°C в термостате от Heraeus Instruments с контроллером температуры Kelvitron® (Ханау, Германия).

e. Для культивирования *S. glutamicum* после электропорации ВНІ-агар (Merck, Дармштадт, Германия, № по кат. 113825) дополняли 134 г/л сорбитола (Carl Roth GmbH + Co. KG, Карлсруэ, Германия), 2,5 г/л дрожжевого экстракта (Oxoid/ThermoFisher Scientific, Уолтем, США, № по кат. LP0021) и 25 мг/л канамицина. Чашки с агаром инкубировали при 30°C в термостате от Heraeus Instruments с контроллером температуры Kelvitron® (Ханау, Германия).

Определение оптической плотности бактериальных суспензий

a. Оптическую плотность бактериальных суспензий в культурах во встряхиваемых колбах определяли при 600 нм (OD600) с применением BioPhotometer от Eppendorf AG (Гамбург, Германия).

b. Оптическую плотность бактериальных суспензий, полученных в микроферментационной системе Wouter Duetz (WDS) (24-луночные планшеты), определяли при 660 нм (OD660) с помощью планшет-ридера GENios™ от Tecan Group AG (Меннедорф, Швейцария).

Центрифугирование

a. Центрифугировали бактериальные суспензии с максимальным объемом, составляющим 2 мл, в реакционных пробирках объемом 1,5 мл или 2 мл (например, пробирках Eppendorf® 3810X) с применением настольной центрифуги Eppendorf 5417 R (5 мин при 13000 об./мин).

b. Центрифугировали бактериальные суспензии с максимальным объемом, составляющим 50 мл, в реакционных пробирках объемом 15 мл или 50 мл (например, конических центрифужных пробирках Falcon™ объемом 50 мл) с применением настольной центрифуги Eppendorf 5810 R в течение 10 мин при 4000 об./мин.

Выделение ДНК

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* с применением набора QIAprep Spin Miniprep от Qiagen (Хильден, Германия, № по кат. 27106) в соответствии с инструкциями производителя.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР с полимеразой, устраняющей ошибки (высокоточной), применяли для амплификации требуемого сегмента ДНК для секвенирования по Сэнгеру или сборки ДНК. Наборы с полимеразой, не устраняющей ошибки, применяли для определения наличия или отсутствия требуемого фрагмента ДНК непосредственно в колониях *E. coli* или *C. glutamicum*.

a. Набор с высокоточной ДНК-полимеразой Phusion® (набор Phusion) от New England BioLabs Inc. (Ипсвич, США, № по кат. M0530) применяли для амплификации выбранных участков ДНК с внесением исправлений в матрицу в соответствии с инструкциями производителя (см. таблицу 2).

Таблица 2. Условия термоциклирования для ПЦР с применением набора с высокоточной ДНК-полимеразой Phusion® от New England BioLabs Inc.

Программа ПЦР			
Стадия	Время [мин:с]	Т [°C]	Описание
1	00:30	98	Стадия начальной денатурации
2	00:05	98	Стадия денатурации
3	00:30	60	Стадия отжига
4	00:xx	72	Стадия элонгации 1 мин на т. о. ДНК
			Повторение стадий 2-4: 35 x
5	05:00	72	Стадия конечной элонгации
6	Удержание	4	Стадия охлаждения

b. Taq PCR Core Kit (Taq Kit) от Qiagen (Хильден, Германия, № по кат. 201203) применяли для амплификации требуемого сегмента ДНК для подтверждения его наличия. Набор применяли в соответствии с инструкциями производителя (см. таблицу 3).

Таблица 3. Условия термоциклирования для ПЦР с применением набора Taq PCR Core Kit (Taq Kit) от Qiagen

Программа ПЦР			
Стадия	Время [мин:с]	Т [°C]	Описание
1	05:00	94	Стадия начальной денатурации
2	00:30	94	Стадия денатурации

3	00:30	52	Стадия отжига
4	01:20	72	Стадия элонгации: 1 мин. на т. о. ДНК
			Повторение стадий 2-4: 35 x
5	04:00	72	Стадия конечной элонгации
6	Удержание	4	Стадия охлаждения

с. Мастер-микс SapphireAmp® Fast PCR (микс Sapphire) от Takara Bio Inc (Takara Bio Europe S.A.S.; Сен-Жермен-ан-Ле, Франция; № по кат. RR350A/B) применяли в качестве альтернативы для подтверждения наличия требуемого сегмента ДНК в клетках, отобранных из колоний *E. coli* или *C. glutamicum*, в соответствии с инструкциями производителя (см. таблицу 4).

Таблица 4. Условия термоциклирования для ПЦР с применением мастер-микса SapphireAmp® Fast PCR (микс Sapphire) от Takara Bio Inc

Программа ПЦР			
Стадия	Время [мин:с]	T [°C]	Описание
1	01:00	94	Стадия начальной денатурации
2	00:05	98	Стадия денатурации
3	00:05	55	Стадия отжига
4	00:05	72	Стадия элонгации
			Повторение стадий 2-4: 30 x
5	04:00	72	Стадия конечной элонгации
6	Удержание	4	Стадия охлаждения

d. Все олигонуклеотидные праймеры синтезировали в Eurofins Genomics GmbH (Эберсберг, Германия) с применением фосфорамидитного способа, описанного McBride и Caruthers (1983).

e. В качестве матрицы для ПЦР применяли либо подходящим образом разбавленный раствор выделенной плазмидной ДНК или общей ДНК, выделенной из жидкой культуры, либо общую ДНК, содержащуюся в колонии бактерий (ПЦР для отбора колоний). Матрицу для указанной ПЦР для отбора колоний получали путем отбора клеточного материала с помощью зубочистки из колонии на чашке с агаром и помещения клеточного материала непосредственно в реакционную пробирку для ПЦР. Клеточный материал нагревали в течение 10 с при 800 Вт в микроволновой печи типа Mikrowave & Grill от SEVERIN Elektrogeräte GmbH (Зундерн, Германия), и затем к матрице в реакционной пробирке для ПЦР добавляли реагенты для ПЦР.

f. Все реакции ПЦР осуществляли в амплификаторах для ПЦР типа Mastercycler или Mastercycler Nexus Gradient от Eppendorf AG (Гамбург, Германия).

Расщепление ДНК рестрикционными ферментами

Для расщепления рестрикционными ферментами применяли либо «FastDigest restriction endonucleases (FD)» (ThermoFisher Scientific, Уолтем, США), либо рестрикционные эндонуклеазы от New England BioLabs Inc. (Ипсвич, США). Реакции осуществляли в соответствии с инструкциями из руководства от производителя.

Определение размеров фрагментов ДНК

a. Размеры небольших фрагментов ДНК (менее 1000 п. о.) обычно определяли с помощью автоматизированного капиллярного электрофореза с применением QIAxcel от Qiagen (Хильден, Германия).

b. Если фрагменты ДНК необходимо выделить или если фрагменты ДНК составляли более 1000 п. о., ДНК разделяли посредством электрофореза в агарозном геле с ТАЕ и окрашивали с помощью красителя для нуклеиновых кислот GelRed® (Biotium, Inc., Фермон, Канада). Окрашенную ДНК визуализировали при 302 нм.

Очистка ПЦР-амплификатов и рестрикционных фрагментов

ПЦР-амплификаты и рестрикционные фрагменты очищали с помощью набора для очистки продуктов ПЦР QIAquick от Qiagen (Хильден, Германия, № по кат. 28106) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК элюировали с 30 мкл 10 мМ Tris*HCl (pH 8,5).

Определение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК измеряли с применением спектрофотометра NanoDrop ND-1000 от PEQLAB Biotechnologie GmbH, с 2015 года торговой марки VWR (Эрланген, Германия).

Клонирование сборки

Плазмидные векторы подвергали сборке с применением «NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit», приобретенной у New England BioLabs Inc. (Ипсвич, США, № по кат. E5520). Реакционную смесь, содержащую линейный вектор и по меньшей мере одну вставку ДНК, инкубировали при 50°C в течение 60 мин. Для каждого эксперимента по трансформации применяли 0,5 мкл смеси для сборки.

Химическая трансформация *E. coli*

Для клонирования плазмид химически компетентные «NEB® Stable Competent *E. coli* (High Efficiency)» (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. C3040) трансформировали в соответствии с протоколом производителя. Успешно трансформированные клетки отбирали на агаре LB, дополненном 25 мг/л канамицина.

Трансформация *C. glutamicum*

Трансформацию *C. glutamicum* с помощью плазмидной ДНК проводили посредством электропорации с применением «Gene Pulser Xcell» (Bio-Rad Laboratories GmbH, Фельдкирхен, Германия), как описано Ruan *et al.* (2015). Электропорацию проводили в кюветах для электропорации объемом 1 мм (Bio-Rad Laboratories GmbH, Фельдкирхен, Германия) при 1,8 кВт, и фиксированную константу времени устанавливали равной 5 мс. Трансформированные клетки отбирали на агаре ВН1, содержащем 134 г/л сорбитола, 2,5 г/л дрожжевого экстракта и 25 мг/л канамицина.

Определение нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидные последовательности молекул ДНК определяли с помощью Eurofins Genomics GmbH (Эберсберг, Германия) с помощью циклического секвенирования с применением дидезоксинуклеотидного способа обрыва цепи по Сэнгеру и соавт. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74, 5463 – 5467, 1977). Для визуализации и оценивания последовательностей применяли программное обеспечение Clone Manager Professional 9 от Scientific & Educational Software (Денвер, США).

Исходные культуры штаммов *E. coli* и *C. glutamicum* в глицерине

Для длительного хранения получали исходные культуры штаммов *E. coli* и *C. glutamicum* в глицерине. Отобранные клоны *E. coli* культивировали в 10 мл среды LB, дополненной 2 г/л глюкозы. Отобранные клоны *C. glutamicum* культивировали в 10 мл среды ВНІ в двукратной концентрации, дополненной 2 г/л глюкозы. Среды для выращивания, содержащие плазмиды штаммов *E. coli* и *C. glutamicum* дополняли с помощью 25 мг/л канамицина. Среду помещали в колбы Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл. В колбу инокулировали с помощью петли клетки, взятые из колонии. Затем культуру инкубировали в течение 18 ч при 30°C и 200 об./мин. После указанного периода инкубации в культуру добавляли 1,2 мл 85% (об./об.) стерильного глицерина. Полученную клеточную суспензию, содержащую глицерин, затем разделяли на аликвоты в виде порций по 2 мл и хранили при –80°C.

Получение ГАА при культивированиях в миллилитровом объеме

Система культивирования в миллилитровом объеме в соответствии с Дуэтц (2007) применяли для оценки получения ГАА штаммов. С этой целью применяли микропланшеты с 24 глубокими лунками (24-луночные планшеты WDS) от EnzyScreen BV (Хемстеде, Нидерланды; № по кат. CR1424), заполненные 2,5 мл среды на лунку.

Предварительные культуры штаммов получали в 10 мл среды для посева (SM). Среду помещали в колбу Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл. Ее инокулировали 100 мкл исходной культуры в глицерине и культуру инкубировали в

течение 24 ч при 30°C и 200 об./мин. Состав среды для посева (SM) показан в таблице 5.

Таблица 5. Среда для посева (SM)

Компоненты	Концентрация (г/л)
Дрожжевой экстракт FM902 (Angel Yeast Co.,LTD, Хубэй, КНР)	10
Мочевина	1,5
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
Биотин	0,0001
Тиамин гидрохлорид	0,0001
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01
MnSO ₄ * H ₂ O	0,01
Глюкоза	20
Канамицин	0,025
pH = 7,0	

После указанного периода инкубации определяли значения оптической плотности OD₆₀₀ предварительных культур. Объем, необходимый для инокуляции 2,5 мл среды для получения (PM) до OD₆₀₀, составляющей 0,1, отбирали из предварительной культуры, центрифугировали (1 мин при 8000 г) и надосадочную жидкость удаляли. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл среды для получения.

Основные культуры начинали путем инокуляции в 24-луночный планшет WDS, содержащий лунки с 2,4 мл среды для получения (PM), каждые 100 мкл ресуспендированных клеток из предварительных культур. Состав среды для получения (PM) показан в таблице 6.

Таблица 6. Среда для получения (PM)

Компоненты	Концентрация (г/л)
-------------------	---------------------------

3-(N-Морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS)	40
Дрожжевой экстракт FM902 (Angel Yeast Co.,LTD, Хубэй, КНР)	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
NH ₄ Cl	15
Цитрат тринатрия * 2 H ₂ O	10
Мочевина	1
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
Ацетат аммония	7,7
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
Биотин	0,0001
Тиамин гидрохлорид	0,0001
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01
MnSO ₄ * H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,000015
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,0004
Пенегаситель XFO-1501 (Ivanhoe Industries Inc., Сион, США)	0,5
Глюкоза	40
IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид)	1 мМ
Канамицин	0,025
pH = 7,2	

Основные культуры инкубировали в течение 72 ч. при 30 °C и 300 об./мин в стандартном шейкере-инкубаторе Infors HT Multitron от Infors GmbH (Боттминген, Швейцария) до полного расхода глюкозы. Концентрацию глюкозы в суспензии анализировали с помощью глюкометра OneTouch Vita® от LifeScan (Johnson & Johnson Medical GmbH, Нойс, Германия).

После культивирования суспензии культур переносили в микропланшет с глубокими лунками. Для измерения OD₆₆₀ часть суспензии культуры подходящим образом

разбавляли. Другую часть культуры центрифугировали и концентрацию GAA в надосадочной жидкости анализировали, как описано ниже.

Определение содержания L-аргинина и глицина в дрожжевом пептоне FM902

Поскольку дрожжевой экстракт FM902 (Angel Yeast Co., LTD, Хубэй, КНР) содержит различные пептиды и аминокислоты, содержание в нем L-аргинина и глицина измеряли следующим образом.

Для измерения свободных аминокислот образцы получали с помощью растворения 1 г дрожжевого экстракта в 20 мл воды. Объем раствора довели водой до общего объема, составляющего 25 мл, тщательно перемешивали и фильтровали с применением 0,2 мкМ нейлонового шприцевого фильтра.

Для измерения общего количества аминокислот (свободные аминокислоты плюс аминокислоты, связанные в пептиды) образцы получали с помощью растворения 1 г дрожжевого экстракта в 10 мл 6 М HCl и инкубирования их в течение 24 ч при 110°C. Затем добавляли воду до общего объема, составляющего 25 мл. Раствор тщательно перемешивали и фильтровали с применением 0,2 мкМ нейлонового шприцевого фильтра.

Концентрации L-аргинина и глицина в образцах определяли с помощью ионообменной хроматографии с применением анализатора аминокислот SYKAM S433 от SYKAM Vertriebs GmbH (Фюрстенфельдбрук, Германия). В качестве твердой фазы применяли колонку со сферическими гранулами полистирольного катионообменника (PEEK LCA N04/Na, размер 150 x 4,6 мм) от SYKAM. В зависимости от L-аминокислоты разделение осуществлялось в изократическом режиме с применением смеси буферов А и В для элюирования или путем градиентного элюирования с применением указанных буферов. В качестве буфера А применяли водный раствор, содержащий в 20 л 263 г цитрата тринатрия, 120 г лимонной кислоты, 1100 мл метанола, 100 мл 37% HCl и 2 мл октановой кислоты (конечный показатель pH, составляющий 3,5). В качестве буфера В применяли водный раствор, содержащий в 20 л 392 г цитрата тринатрия, 100 г борной кислоты и 2 мл октановой кислоты (конечный показатель pH, составляющий 10,2). Свободные

аминокислоты окрашивали нингидрином посредством постколonoчной дериватизации и выявляли фотометрическим способом при 570 нм.

В таблице 7 показано содержание свободного и общего количества L-аргинина и глицина, определенного в дрожжевом экстракте FM902 (Angel Yeast Co.,LTD, Хубэй, КНР), а также полученные количества в среде для получения (PM).

Таблица 7. Содержание L-аргинина и глицина в дрожжевом экстракте (YE) FM902 и полученные концентрации в среде для получения (PM), содержащей 1,5 г/л YE.

Аминокислота	Свободная аминокислота в YE	Общее количество аминокислот в YE	Полученная свободная аминокислота в PM	Полученное общее количество аминокислот в PM
L-аргинин	15,1 г/кг	32,1 г/кг	22,7 мг/л	48,2 мг/л
глицин	6,9 г/кг	30,5 г/кг	10,4 мг/л	45,7 мг/л

Количественное определение ГАА

Образцы анализировали с помощью анализирующей системы от Agilent, состоящей из HPLC «Infinity 1260» в сочетании с масс-анализатор «Triple Quad 6420» (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США). Хроматографическое разделение выполняли на колонке Atlantis HILIC Silica, 4,6 x 250 мм, 5 мкм (Waters Corporation, Милфорд, США) при 35°C. Подвижная фаза А представляла собой воду с 10 мМ формиата аммония и 0,2% муравьиной кислоты. Подвижная фаза В представляла собой смесь 90% ацетонитрила и 10% воды, 10 мМ формиата аммония добавляли к смеси. Анализ в системе HPLC начинали со 100% В, затем следовал линейный градиент в течение 22 мин и постоянная скорость потока, составляющая 0,6 мл/мин, до 66% В. Масс-анализатор работал в режиме положительной ионизации ESI. Для выявления ГАА значения масса/заряд отслеживали с применением фрагментации MRM [M+H]⁺ + 118 – 76. Предел количественного определения (LOQ) для ГАА фиксировали на уровне 7 ppm.

В) РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**Пример 1. Клонирование гена GGT1, кодирующего глиоксилатаминотрансферазу из *Arabidopsis thaliana***

Ген GGT1 *Arabidopsis thaliana* (номер доступа в Genbank NM_102180, SEQ ID NO:1) кодирует глутамат:глиоксилатаминотрансферазу (номер доступа в Genbank NP_564192, SEQ ID NO:2). Было показано, что белок катализирует реакции: глиоксилат + L-аланин = глицин + пируват (EC 2.6.1.44), 2-оксоглутарат + L-аланин = L-глутамат + пируват (EC 2.6.1.2) и 2-оксоглутарат + глицин = глиоксилат + L-глутамат (EC 2.6.1.4; Liepman AH, Olsen LJ., Plant Physiol. 2003 Jan;131(1):215-27. doi: 10.1104/pp.011460).

С применением инструмента программного обеспечения «Codon Optimization Tool» (Integrated DNA Technologies Inc., Коралвилль, Айова, США) аминокислотную последовательность белка GGT1 подвергали обратной трансляции с получением последовательности ДНК, оптимизированной для частоты использования кодона *S. glutamicum*. Последовательность Шайна-Дальгарно добавляли непосредственно выше открытой рамки считывания (AGGAAAGGAGAGGATTG; Shi, 2018) и концы полученной последовательности удлиняли с помощью мотивов для последующего субклонирования. Заказывали синтез гена из полученной последовательности ДНК AtGGT1_opt_RBS (SEQ ID NO:3) у Eurofins Genomics GmbH (Эберсберг, Германия), и он был доставлен в виде части плазмиды для клонирования, придающей устойчивость к ампициллину (обозначенной как pEX-A258-AtGGT1_opt_RBS).

Пример 2. Клонирование гена GGT2, кодирующего глиоксилатаминотрансферазу из *Arabidopsis thaliana*

Ген AOAT2 (синоним: GGT2) *Arabidopsis thaliana* (номер доступа в Genbank NM_001036185, SEQ ID NO:4) кодирует аланин-2-оксоглутаратаминотрансферазу 2 (номер доступа в Genbank NP_001031262, SEQ ID NO:5). Было показано, что белок катализирует реакции: глиоксилат + L-аланин = глицин + пируват (EC 2.6.1.44), 2-оксоглутарат + L-аланин = L-глутамат + пируват (EC 2.6.1.2) и 2-оксоглутарат + глицин = глиоксилат + L-глутамат (EC 2.6.1.4; Liepman AH, Olsen LJ., Plant Physiol. 2003 Jan;131(1):215-27. doi: 10.1104/pp.011460).

С применением инструмента программного обеспечения «Codon Optimization Tool» (Integrated DNA Technologies Inc., Коралвилль, Айова, США) аминокислотную последовательность белка GGT2 подвергали обратной трансляции с получением последовательности ДНК, оптимизированной для частоты использования кодона *S. glutamicum*. Последовательность Шайна-Дальгарно добавляли непосредственно выше открытой рамки считывания (AGGAAAGGAGAGGATTG; Shi, 2018) и концы полученной последовательности удлиняли с помощью мотивов для последующего субклонирования. Заказывали синтез гена из полученной последовательности ДНК AtGGT2_opt_RBS (SEQ ID NO:6) у Eurofins Genomics GmbH (Эберсберг, Германия), и он был доставлен в виде части плазмиды для клонирования, придающей устойчивость к ампициллину (обозначенной как pEX-A258-AtGGT2_opt_RBS).

Пример 3. Клонирование гена *agt*, кодирующего глиоксилатаминотрансферазу из *Thermococcus litoralis*

Ген *agt Thermococcus litoralis* (номер доступа в Genbank AB033996, SEQ ID NO:7) кодирует аланин:глиоксилатаминотрансферазу (номер доступа в Genbank BAB40321, SEQ ID NO:8). Было показано, что белок катализирует реакции: глиоксилат + L-аланин = глицин + пируват (EC 2.6.1.44) и глиоксилат + L-серин = глицин + 3-гидроксипируват (EC 2.6.1.45; Sakuraba 2004).

С применением инструмента программного обеспечения «Codon Optimization Tool» (Integrated DNA Technologies Inc., Коралвилль, Айова, США) аминокислотную последовательность белка Agt подвергали обратной трансляции с получением последовательности ДНК, оптимизированной для частоты использования кодона *S. glutamicum*. Последовательность Шайна-Дальгарно добавляли непосредственно выше открытой рамки считывания (AGGAAAGGAGAGGATTG; Shi, 2018) и концы полученной последовательности удлиняли с помощью мотивов для последующего субклонирования. Заказывали синтез гена из полученной последовательности ДНК (SEQ ID NO:9) у Eurofins Genomics GmbH (Эберсберг, Германия), и он был доставлен в виде части плазмиды для клонирования, придающей устойчивость к ампициллину (обозначенной как pEX-A258-AGT_Tl_opt_RBS).

Пример 4. Клонирование гена AGAT_Mp, кодирующего L-аргинин:глицинамидинотрансферазу (AGAT, EC 2.1.4.1) из *Moorea producens*

Moorea producens представляет собой нитчатую цианобактерию. Геном штамма PAL-8-15-08-1 *Moorea producens* был опубликован Leao et al. (Leao T, Castelão G, Korobeynikov A, Monroe EA, Podell S, Glukhov E, Allen EE, Gerwick WH, Gerwick L, Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Mar 21;114(12):3198-3203. doi: 10.1073/pnas.1618556114; номер доступа в Genbank CP017599.1). Он содержит открытую рамку считывания, предположительно кодирующую L-аргинин:глицинамидинотрансферазу (AGAT, EC 2.1.4.1; метка локуса BJP34_00300, показанная в SEQ ID NO:10). Под SEQ ID NO:11 показана полученная аминокислотная последовательность (номер доступа в Genbank WP_070390602).

С применением инструмента программного обеспечения «Codon Optimization Tool» (Geneart/ThermoFisher Scientific, Уолтем, США) данную аминокислотную последовательность подвергали обратной трансляции с получением последовательности ДНК, оптимизированной для частоты использования кодона *S. glutamicum*. Ее концы удлиняли с помощью последовательностей для клонирования сборки и через 5 пар оснований выше открытой рамки считывания добавляли последовательность Шайна-Дальгарно (AGGA). Заказывали синтез гена из полученной последовательности ДНК (SEQ ID NO:12) Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), и он был доставлен в виде части плазмиды для клонирования (обозначенной как pMA-T_AGAT_Mp).

Пример 5. Клонирование AGAT_Mp в плазмиде для экспрессии pEC-XK99E

Шаттл-плазмиду *E. coli* - *S. glutamicum*pEC-XK99E (номер доступа в Genbank AY219682) расщепляли с применением рестрикционной эндонуклеазы SmaI. Терминальные фосфаты удаляли с применением «FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase» (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Затем ДНК очищали с помощью «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Плазмиду для клонирования pMA-T_AGAT_Mp расщепляли с помощью MluI + AatII и полученные фрагменты дефосфорилировали с применением «Fast DNA End Repair Kit» (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Их разделяли посредством электрофореза в агарозном геле (0,8% агарозы в буфере TAE) и полосу, соответствующую «AGAT_Mp» (1174 п. о.), вырезали. Ее ДНК очищали с применением «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Фрагмент AGAT_Mp и линеаризованную pEC-XK99E лигировали с применением «Ready-To-Go T4 DNA ligase» (GE Healthcare Europe GmbH, Фрайбург, Германия). Продукт лигирования трансформировали в «NEB Stable Competent *E. coli* (High Efficiency)» (New England Biolabs, Ипсвич, США) и клетки выращивали на агаре LB, содержащем 25 мг/л канамицина. Соответствующие клоны идентифицировали с помощью расщепления рестрикционным ферментом и секвенирования ДНК. Полученную плазмиду называли pEC-XK99E_AGAT_Mp.

Пример 6. Клонирование генов глиоксилатаминотрансферазы в плазмиде для экспрессии pEC-XK99E_AGAT_Mp

Плазмиду pEC-XK99E_AGAT_Mp расщепляли с применением рестрикционной эндонуклеазы BamHI и терминальные фосфаты удаляли с применением «FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase» (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Затем расщепленную ДНК очищали с применением «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Каждую из плазмид для клонирования pEX-A258-AtGGT1_opt_RBS, pEX-A258-AtGGT2_opt_RBS и pEX-A258-AGT_T1_opt_RBS расщепляли с помощью BamHI и BsaI. Разрезанные плазмиды очищали с применением «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Расщепленную pEC-XK99E_AGAT_Mp лигировали с каждой из расщепленных плазмид для клонирования с применением «Ready-To-Go T4 DNA ligase» (GE Healthcare Europe GmbH, Фрайбург, Германия). Продукты лигирования трансформировали в «NEB Stable Competent *E. coli* (High Efficiency)» (New England Biolabs, Ипсвич, США) и клетки выращивали на агаре LB, содержащем 25 мг/л канамицина. Соответствующие клоны идентифицировали с помощью расщепления рестрикционным ферментом и секвенирования ДНК.

Полученные плазмиды показаны в таблице 8. Они обеспечивают ген AGAT_Mp и соответствующую глиоксилатаминотрансферазу в опероноподобной структуре под регуляцией сильного IPTG-индуцибельного trc-промотора.

Таблица 8. Шаттл-плазмиды *E. coli* – *C. Glutamicum*, применяемые для экспрессии гена

Плазмида	Примечание
pEC-ХК99Е	«Пустая» шаттл-плазмида <i>E. coli</i> – <i>C. Glutamicum</i> (номер доступа в Genbank AY219682)
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>)
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_AtGGT1	Экспрессия AGAT_Mp и GGT1, кодирующих глутамат:глиоксилатаминотрансферазу <i>Arabidopsis thaliana</i> (номер доступа в Genbank NP_564192)
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_AtGGT2	Экспрессия AGAT_Mp и GGT2, кодирующих аланин-2-оксоглутаратаминотрансферазу 2 <i>Arabidopsis thaliana</i> (номер доступа в Genbank NP_001031262)
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_AGT_T1	Экспрессия AGAT_Mp и AGT_T1, кодирующих глутамат:глиоксилатаминотрансферазу <i>Thermococcus litoralis</i> (номер доступа в Genbank BAB40321)

Пример 7. Хромосомная вставка *sod*-промотора выше оперона *carAB* в ATCC13032

Для улучшения получения L-аргинина в геном ATCC13032 вставляли сильный *sod*-промотор выше оперона *carAB*. Следовательно, плазмиду pK18mobsacB_Psod-carAB конструировали следующим образом. pK18mobsacB (Schäfer, 1994) вырезали с применением EcoRI + HindIII и линеаризованную векторную ДНК (5670 п. о.) вырезали из агарозного геля. ДНК экстрагировали с применением «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Для конструирования вставки три фрагмента ДНК создавали посредством ПЦР с помощью следующих пар праймеров (геномная ДНК ATCC13032 в качестве матрицы):

PsodcarAB-LA-F (SEQ ID NO:13) +³⁰ PsodcarAB-LA-R (SEQ ID NO:14)
= левое гомологичное плечо (1025 п. о.);

PsodcarAB-F (SEQ ID NO:15) + PsodcarAB-R (SEQ ID NO:16)
= *sod*-промотор (250 п. о.);

PsodcarAB-RA-F (SEQ ID NO:17) + PsodcarAB-RA-R (SEQ ID NO:18)
= правое гомологичное плечо (944 п. о.).

ДНК-продукты очищали с применением «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия). Затем линейаризованную плазмиду и продукты ПЦР подвергали сборке с применением «NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit» (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. E5520). Подходящие плазмидные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного расщепления и секвенирования ДНК.

Затем полученную плазмиду pK18mobsacB_Psod-carAB трансформировали в ATCC13032 посредством электропорации. Хромосомную интеграцию (являющуюся результатом первого события рекомбинации) отбирали путем посева на агар ВНИ, дополненный 134 г/л сорбитола, 2,5 г/л дрожжевого экстракта и 25 мг/л канамицина. Чашки с агаром инкубировали в течение 48 ч при 33°C.

Отдельные колонии переносили на чашки со свежим агаром (с 25 мг/л канамицина) и инкубировали в течение 24 ч при 33°C. Жидкие культуры данных клонов культивировали в течение 24 ч при 33°C в 10 мл среды ВНИ, содержащейся в колбах Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл. Для выделения клонов, в которых имеет место второе событие рекомбинации, из каждой жидкой культуры отбирали аликвоту, подходящим образом разбавляли и высевали (как правило, 100-200 мкл) на агар ВНИ, дополненный 10% сахарозой. Данные чашки с агаром инкубировали в течение 48 ч при 33°C. Затем колонии, растущие на чашках с агаром, содержащим сахарозу, оценивали в отношении чувствительности к канамицину. Для осуществления этого применяли зубочистку для удаления клеточного материала из колонии и переноса его на агар ВНИ, содержащий 25 мг/л канамицина, и на агар ВНИ, содержащий 10% сахарозу. Чашки с агаром инкубировали в течение 60 ч при 33°C. Клоны, которые оказывались чувствительными к канамицину и устойчивыми к

сахарозе, изучали посредством ПЦР и секвенирования ДНК в отношении соответствующей интеграции *sod*-промотора. Полученный штамм называли ATCC13032_Psod-carAB.

Пример 8. Хромосомная делеция гена *aceB* (NCgl2247) у *C. glutamicum* ATCC13032.

Для снижения метаболического потока глиоксилата с образованием L-малата ген *aceB* (NCgl2247), кодирующий малатсинтазу (EC 2.3.3.9), удалили в штамме ATCC13032.

Следовательно, плазмиду pK18mobsacB_DaceB конструировали следующим образом. Плазмиду pK18mobsacB (Schäfer, 1994) разрезали с применением XbaI и линейаризованную векторную ДНК (5721 п. о.) очищали с применением «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Для конструирования вставки два фрагмента ДНК создавали посредством ПЦР с помощью следующих пар праймеров (геномная ДНК ATCC13032 в качестве матрицы):

1f-aceB-D2_vec (SEQ ID NO:19) + 1r-aceB-D2_aceB (SEQ ID NO:20)

= левое гомологичное плечо (1065 п. о.)

2f-aceB-D2_aceB (SEQ ID NO:21) + 2r-aceB_D2_Vec (SEQ ID NO:22)

= левое гомологичное плечо (1080 п. о.)

ДНК-продукты очищали с применением «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Затем линейаризованную плазмиду и продукты ПЦР подвергали сборке с применением «NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit» (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. E5520). Полученный вектор с делецией называли pK18mobsacB_DaceB. Его подтверждали посредством расщепления рестрикционным ферментом и секвенирования ДНК.

Для удаления гена *aceB* рK18mobsacB_DaceB трансформировали в ATCC13032 посредством электропорации. Хромосомную интеграцию (являющуюся результатом первого события рекомбинации) отбирали путем посева на агар ВНИ, дополненный 134 г/л сорбитола, 2,5 г/л дрожжевого экстракта и 25 мг/л канамицина. Чашки с агаром инкубировали в течение 48 ч при 33°C.

Отдельные колонии переносили на чашки со свежим агаром (с 25 мг/л канамицина) и инкубировали в течение 24 ч при 33°C. Жидкие культуры данных клонов культивировали в течение 24 ч при 33°C в 10 мл среды ВНИ, содержащейся в колбах Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл. Для выделения клонов, в которых имеет место второе событие рекомбинации, из каждой жидкой культуры отбирали аликвоту, подходящим образом разбавляли и высевали (как правило, 100-200 мкл) на агар ВНИ, дополненный 10% сахарозой. Данные чашки с агаром инкубировали в течение 48 ч при 33°C. Затем колонии, растущие на чашках с агаром, содержащим сахарозу, оценивали в отношении чувствительности к канамицину. Для осуществления этого применяли зубочистку для удаления клеточного материала из колонии и переноса его на агар ВНИ, содержащий 25 мг/л канамицина, и на агар ВНИ, содержащий 10% сахарозу. Чашки с агаром инкубировали в течение 60 ч при 33°C. Клоны, которые оказывались чувствительными к канамицину и устойчивыми к сахарозе, изучали посредством ПЦР и секвенирования ДНК в отношении соответствующей интеграции *sod*-промотора. Полученный штамм называли ATCC13032_DaceB.

Пример 9. Хромосомная делеция гена *aceB* (NCgl2247) у *C. glutamicum* ATCC13032_Psod-carAB.

Для снижения метаболического потока глиоксилата с образованием L-малата ген *aceB* (NCgl2247), кодирующий малатсинтазу (EC 2.3.3.9), подлежал удалению в штамме ATCC13032_Psod-carAB.

Для удаления гена *aceB* рK18mobsacB_DaceB трансформировали в ATCC13032_Psod-carAB посредством электропорации. Хромосомную интеграцию (являющуюся результатом первого события рекомбинации) отбирали путем посева на агар ВНИ, дополненный 134 г/л сорбитола, 2,5 г/л дрожжевого экстракта и 25 мг/л канамицина. Чашки с агаром инкубировали в течение 48 ч при 33°C.

Отдельные колонии переносили на чашки со свежим агаром (с 25 мг/л канамицина) и инкубировали в течение 24 ч при 33°C. Жидкие культуры данных клонов культивировали в течение 24 ч при 33°C в 10 мл среды ВНИ, содержащейся в колбах Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл. Для выделения клонов, в которых имеет место второе событие рекомбинации, из каждой жидкой культуры отбирали аликвоту, подходящим образом разбавляли и высевали (как правило, 100-200 мкл) на агар ВНИ, дополненный 10% сахарозой. Данные чашки с агаром инкубировали в течение 48 ч при 33°C. Затем колонии, растущие на чашках с агаром, содержащим сахарозу, оценивали в отношении чувствительности к канамицину. Для осуществления этого применяли зубочистку для удаления клеточного материала из колонии и переноса его на агар ВНИ, содержащий 25 мг/л канамицина, и на агар ВНИ, содержащий 10% сахарозу. Чашки с агаром инкубировали в течение 60 ч при 33°C. Клоны, которые оказывались чувствительными к канамицину и устойчивыми к сахарозе, изучали посредством ПЦР и секвенирования ДНК в отношении соответствующей интеграции *sod*-промотора. Полученный штамм называли ATCC13032_Psod-carAB_DaceB.

Таблица 9. Перечень штаммов

Штамм	Комментарий
<i>Escherichia coli</i>	
NEB® Stable	Коммерчески доступный штамм для клонирования (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	
ATCC13032	Штамм <i>Corynebacterium glutamicum</i> дикого типа (Kinoshita <i>et al.</i> , 1957*)
ATCC13032_DaceB	Сниженная активность малатсинтазы вследствие хромосомной делеции гена <i>aceB</i> у <i>C. glutamicum</i> ATCC13032
ATCC13032_Psod-carAB	Повышенная способность продуцировать L-аргинин вследствие хромосомной интеграции сильного <i>sod</i> -промотора выше <i>carAB</i> у <i>C. glutamicum</i> ATCC13032

ATCC13032_Psod-carAB_DaceB	Хромосомная делеция гена <i>aceB</i> и хромосомная интеграция сильного <i>sod</i> -промотора выше <i>carAB</i> у <i>C. glutamicum</i> ATCC13032
----------------------------	---

*) Kinoshita S, Udaka S, Shimono M., J. Gen. Appl. Microbiol. 1957; 3(3): 193-205.

Пример 10. Трансформация штаммов *C. glutamicum* различными плазмидами для экспрессии

Следующие штаммы *C. glutamicum* трансформировали плазмидами посредством электропорации (таблица 10). Клетки, содержащие плазмиду, отбирали с 25 мг/л канамицина.

C. glutamicum ATCC13032: обычно применяемый штамм дикого типа (Kinoshita *et al.*, J. Gen. Appl. Microbiol. 1957; 3(3): 193-205)

- *C. glutamicum* ATCC13032_DaceB: сниженная активность малатсинтазы вследствие хромосомной делеции гена *aceB* у ATCC13032
- *C. glutamicum* ATCC13032_Psod-carAB_DaceB: сниженная активность малатсинтазы вследствие хромосомной делеции гена *aceB* и повышенная способность продуцировать L-аргинин вследствие хромосомной интеграции сильного *sod*-промотора выше *carAB* в ATCC13032

Таблица 10. Перечень содержащих плазмиду штаммов *C. glutamicum*

Плазида	Реципиентный штамм	Полученный штамм
pEC-ХК99Е	ATCC13032	ATCC13032/pEC-ХК99Е
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	ATCC13032	ATCC13032/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	ATCC13032_DaceB	ATCC13032_DaceB/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_AtGGT1	ATCC13032_DaceB	ATCC13032_DaceB/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_AtGGT1

pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2	ATCC13032_Dace B	ATCC13032_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1	ATCC13032_Dace B	ATCC13032_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1
pEC-XK99E_AGAT_Mp	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1	ATCC13032_Dace B	ATCC13032_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2	ATCC13032_Dace B	ATCC13032_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1	ATCC13032_Dace B	ATCC13032_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2
pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB	ATCC13032_Psod- carAB_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1

Пример 11. Влияние сниженной активности малатсинтазы на получение GAA.

Для оценивания влияния сниженной ферментативной активности малатсинтазы на получение GAA штаммы ATCC13032/pEC-XK99E, ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp и ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp культивировали в системе Wouter Duetz и определяли значения титра полученной GAA. Среда для получения (PM) содержала 40 г/л D-глюкозы и 1,90 г/л L-аргинина, но без дополнительного глицина.

Таблица 11. Влияние сниженной активности малатсинтазы на получение GAA в присутствии 1,90 г/л L-аргинина.

Штамм	GAA
ATCC13032/pEC-XK99E	не выявлено
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp	122 мг/л
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp	155 мг/л

Как показано в таблице 11, штамм ATCC13032/pEC-XK99E не продуцировал выявляемое количество GAA.

Штамм ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp, содержащий полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, продуцировал 122 мг/л GAA.

Штамм ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp, содержащий полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, и делетированный ген aceB, продуцировал 155 мг/л GAA.

Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что в присутствии ферментативной активности AGAT снижение ферментативной активности малатсинтазы улучшает получение GAA.

Пример 12. Влияние сниженной активности малатсинтазы вместе с повышенной активностью глиоксилатаминотрансферазы на получение GAA.

Для оценивания влияния сниженной ферментативной активности малатсинтазы вместе с повышенной активностью глиоксилатаминотрансферазы на получение GAA штаммы ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1, ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2 и ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1 культивировали в системе Wouter Duetz и определяли

значения титра полученной GAA. Среда для получения (PM) содержала 40 г/л D-глюкозы и 1,90 г/л L-аргинина, но без дополнительного глицина.

Таблица 12. Влияние сниженной активности малатсинтазы и повышенной активности глиоксилатаминотрансферазы на получение GAA в присутствии 1,90 г/л L-аргинина.

Штамм	GAA
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp	155 мг/л
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1	236 мг/л
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2	242 мг/л
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1	180 мг/л

Как показано в таблице 12 штамм ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp, содержащий полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, и делетированный ген *aceB*, продуцировал 155 мг/л GAA.

Штаммы ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1, ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2 и ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1 также содержат полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, и делетированный ген *aceB*. Кроме того, каждый штамм содержит полинуклеотид, кодирующий глиоксилатаминотрансферазу. Такие штаммы продуцировали 236 мг/л, 242 мг/л и 180 мг/л GAA соответственно.

Авторы данного изобретения пришли к выводу, что в присутствии ферментативной активности AGAT комбинация сниженной активности малатсинтазы и повышенной активности глиоксилатаминотрансферазы улучшает получение GAA.

Пример 13. Влияние сниженной активности малатсинтазы вместе с повышенной способностью продуцировать L-аргинин на получение GAA.

Для оценивания влияния сниженной ферментативной активности малатсинтазы в комбинации с повышенной способностью продуцировать L-аргинина на получение GAA штаммы ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp и ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp культивировали в системе Wouter Duetz и определяли значения титра полученной GAA. Вследствие вставки сильного *sod*-промотора выше хромосомных генов *carA* и *carB* последний штамм обладал улучшенной способностью продуцировать L-аргинин. Среда для получения (PM) содержала 40 г/л D-глюкозы и 1,90 г/л L-аргинина, но без дополнительного глицина.

Таблица 13. Влияние сниженной активности малатсинтазы и повышенной способности продуцировать L-аргинин на получение GAA в присутствии 1,90 г/л L-аргинина.

Штамм	GAA
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp	155 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp	243 мг/л

Как показано в таблице 13 штамм ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp, содержащий полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, и делетированный ген *aceB*, продуцировал 155 мг/л GAA.

Штамм ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp также содержит полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, и делетированный ген *aceB*. Кроме того, он обладает повышенной способностью продуцировать L-аргинин. Данный штамм продуцировал 243 мг/л GAA.

Авторы данного изобретения пришли к выводу, что в присутствии ферментативной активности AGAT комбинация сниженной активности малатсинтазы и повышенной способности продуцировать L-аргинин улучшает получение GAA.

Пример 14. Совокупное влияние сниженной активности малатсинтазы, повышенной активности глиоксилатаминотрансферазы и повышенной способности продуцировать L-аргинин на получение GAA.

Для оценки совокупного влияния сниженной активности малатсинтазы, повышенной активности глиоксилатаминотрансферазы и повышенной способности продуцировать L-аргинин на получение GAA штаммы ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1, ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2, ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1, ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1, ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2 и ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1 культивировали в системе Wouter Duetz и определяли значения титра полученной GAA. Вследствие вставки сильного sod-промотора выше хромосомных генов carA и carB последние три штамма обладали улучшенной способностью продуцировать L-аргинин. Среда для получения (PM) содержала 40 г/л D-глюкозы и 1,90 г/л L-аргинина, но без дополнительного глицина.

Таблица 14. Совокупное влияние сниженной активности малатсинтазы, повышенной активности глиоксилатаминотрансферазы и повышенной способности продуцировать L-аргинин на получение GAA в присутствии 1,90 г/л L-аргинина.

Штамм	GAA
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1	236 мг/л
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2	242 мг/л
ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1	180 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1	362 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2	354 мг/л

ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC- XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1	331 мг/л
---	----------

Как показано в таблице 14 штаммы ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1, ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2 и ATCC13032_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1, содержащие полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, делетированный ген aceB и полинуклеотид, кодирующий глиоксилатаминотрансферазу, продуцировали 236 мг/л, 242 мг/л и 180 мг/л GAA соответственно.

Штаммы ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT1, ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AtGGT2 и ATCC13032_Psod-carAB_DaceB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_AGT_T1 также содержат полинуклеотид, кодирующий AGAT из *Moorea producens*, делетированный ген aceB и полинуклеотид, кодирующий глиоксилатаминотрансферазу. Кроме того, они обладают повышенной способностью продуцировать L-аргинин. Такие штаммы продуцировали 362 мг/л, 354 мг/л и 331 мг/л GAA соответственно.

Авторы данного изобретения пришли к выводу, что комбинация ферментативной активности AGAT, сниженной активности малатсинтазы, повышенной активности глиоксилатаминотрансферазы и повышенной способности продуцировать L-аргинин улучшает получение GAA.

Формула изобретения

1. Микроорганизм, содержащий по меньшей мере один ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинаминотрансферазы, и где активность белка, обладающего функцией малатсинтазы, снижена по сравнению с соответствующей активностью микроорганизма дикого типа.
2. Микроорганизм по п. 1, где экспрессия гена, кодирующего белок, обладающий функцией малатсинтазы, ослаблена по сравнению с экспрессией соответствующего гена у микроорганизма дикого типа, или где ген, кодирующий белок, обладающий функцией малатсинтазы, удален.
3. Микроорганизм по п. 1 или п. 2, дополнительно предусматривающий повышенную активность фермента, обладающего функцией глиоксилатаминотрансферазы по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.
4. Микроорганизм по любому из пп. 1-3, содержащий по меньшей мере один сверхэкспрессируемый ген, кодирующий белок, обладающий ферментативной активностью глиоксилатаминотрансферазы.
5. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, где микроорганизм характеризуется повышенной способностью продуцировать L-аргинин по сравнению со способностью микроорганизма дикого типа.
6. Микроорганизм по п. 5, где микроорганизм характеризуется повышенными показателями активности фермента, обладающего функцией карбамоилфосфатсинтазы, по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.
7. Микроорганизм по п. 5 или п. 6, где микроорганизм дополнительно содержит фермент, обладающий функцией аргининосукцинатлиазы, с повышенной активностью по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

8. Микроорганизм по любому из пп. 5-7, где микроорганизм дополнительно содержит фермент, обладающий функцией орнитинкарбамоилтрансферазы, с повышенной активностью по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.
9. Микроорганизм по любому из пп. 5-8, где микроорганизм дополнительно содержит фермент, обладающий функцией аргининосукцинатсинтетазы, с повышенной активностью по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.
10. Микроорганизм по любому из пп. 5-9, где повышенные показатели активности ферментов достигаются посредством обеспечения сверхэкспрессии генов, кодирующих соответствующие ферменты.
11. Микроорганизм по любому из пп. 5-10, где обеспечивается сверхэкспрессия аргининового оперона (*argCJBDFR*).
12. Микроорганизм по любому из пп. 5-10, где экспрессия гена *argR*, кодирующего чувствительный к аргинину репрессорный белок ArgR, ослаблена по сравнению с экспрессией гена *argR* у микроорганизма дикого типа, или где ген *argR* удален.
13. Микроорганизм по любому из пп. 5-10 или п. 12, где обеспечивается сверхэкспрессия по меньшей мере одного или более генов, кодирующих фермент пути биосинтеза L-аргинина, включающих *gdh*, *argJ*, *argB*, *argC* и/или *argD*, кодирующие глутаматдегидрогеназу, орнитинацетилтрансферазу, ацетилглутаматкиназу, ацетилглутамилфосфатредуктазу и ацетилорнитинаминотрансферазу соответственно.
14. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, где ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, является гетерологичным.
15. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, где обеспечивается сверхэкспрессия гена, кодирующего белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы.

16. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, где белок, обладающий ферментативной активностью глиоксилатаминотрансферазы, содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% гомологичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:2, под SEQ ID NO: 5 или под SEQ ID NO: 8.

17. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, где белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинаминотрансферазы, содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% гомологичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11.

18. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, где микроорганизм относится к роду *Corynebacterium*, к роду *Enterobacteriaceae* или к роду *Pseudomonas*.

19. Микроорганизм по п. 18, где микроорганизм представляет собой *Corynebacterium glutamicum*.

20. Микроорганизм по п. 18, где микроорганизм представляет собой *Escherichia coli*.

21. Микроорганизм по п. 18, где микроорганизм представляет собой *Pseudomonas putida*.

22. Способ ферментативного получения гуанидинуксусной кислоты (GAA), включающий стадии а) культивирования микроорганизма по любому из предыдущих пунктов в подходящей среде в подходящих условиях и б) накопления GAA в среде с образованием ферментационного бульона, содержащего GAA.

23. Способ по п. 22, дополнительно включающий выделение GAA из ферментационного бульона, содержащего GAA.

24. Способ по п. 22 или п. 23, дополнительно включающий высушивание и/или гранулирование ферментационного бульона, содержащего GAA.

25. Микроорганизм по любому из пп. 1-21, дополнительно содержащий ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы.

26. Микроорганизм по п. 27, где обеспечивается сверхэкспрессия гена, кодирующего фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы.

27. Способ ферментативного получения креатина, включающий стадии а) культивирования микроорганизма по п. 27 или п. 28 в подходящей среде в подходящих условиях и б) накопления креатина в среде с образованием ферментационного бульона, содержащего креатин.

28. Способ по п. 29, дополнительно включающий выделение креатина из ферментационного бульона, содержащего креатин.