

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391662** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.08.14**

(22) Дата подачи заявки  
**2023.07.03**

(51) Int. Cl. *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 13/20* (2006.01)  
*C12N 9/88* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ ESCHERICHIA COLI, ОБЛАДАЮЩИЙ СНИЖЕННОЙ ФУМАРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

(96) **2023000113 (RU) 2023.07.03**

(71) Заявитель:  
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
"БИОАМИД" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Воронин Сергей Петрович,  
Севрюгин Александр  
Владиславович, Синолицкий Максим  
Константинович, Синолицкая  
Стэлла Владимировна, Губанова  
Татьяна Александровна, Дербиков  
Денис Дмитриевич, Новиков Андрей  
Дмитриевич, Самарин Артем  
Андреевич, Яненко Александр  
Степанович (RU)**

(74) Представитель:

**Романова Н.В. (RU)**

(57) Группа изобретений относится к области биотехнологии. Сконструирован бесплазмидный рекомбинантный штамм *Escherichia coli* B-14502, депонированный во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов. Штамм обладает конститутивной аспартазной активностью и сниженной фумаразной активностью. Штамм получен путем замены собственного промотора гена *aspA* на промотор P<sub>J23119</sub> и делеции генов *fumA* и *fumC* в штамме *Escherichia coli* MG1655. Получение L-аспарагиновой кислоты заключается в биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе клеток штамма B-14502. При этом в качестве биокатализатора используют свободные или иммобилизованные клетки штамма. Группа изобретений обеспечивает более эффективное использование фумаровой кислоты при получении L-аспарагиновой кислоты без образования побочных продуктов в виде яблочной кислоты.

**A1**

**202391662**

**202391662**

**A1**

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ ESCHERICHIA COLI,  
ОБЛАДАЮЩИЙ СНИЖЕННОЙ ФУМАРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ  
И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Группа изобретений относится к области биотехнологии и касается рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, обладающего высокой аспартазной и сниженной фумаразной активностями, а также биокаталитического способа получения L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония с использованием клеток этого штамма в свободном или иммобилизованном виде.

L-аспарагиновая кислота находит применение в фармацевтической, пищевой, микробиологической промышленности, а также в производстве премиксов для кормопроизводства. В производстве премиксов также используются водные растворы аммонийной соли L-аспарагиновой кислоты.

**Уровень техники**

Известны способы получения L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония с использованием микроорганизмов, синтезирующих фермент аспартат-аммоний лиазу (аспартазу). В основном, в качестве биокатализатора применяют неразрушенные клетки микроорганизмов в иммобилизованной форме. Через реактор, заполненный иммобилизованными клетками, прокачивают водный раствор фумарата аммония, на выходе из реактора образуется раствор моноаммонийной соли аспарагиновой кислоты.

Известен штамм *Escherichia coli* (ВКПМ В-7188) и способ получения L-аспарагиновой кислоты с использованием данного штамма (см. патент РФ № 2174558 по кл. МПК C12P13/20, опуб. 10.10.2001). Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-7188 выращен на питательной среде, содержащей 0,0001-5% уксусной кислоты. Способ получения L-аспарагиновой кислоты заключается в биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-7188.

Однако данный способ является недостаточно эффективным из-за низкой аспартазной активности штамма.

Известны также штаммы *E.coli* PUaspE1 и *E.coli* PUaspE2 и способ получения L-аспарагиновой кислоты, описанные в патенте США № 6214589 по кл. МПК C12P13/20, опуб. 30.05 2017. В данном способе использовали биокатализатор на основе клеток рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, содержащего плазмиду pUC19 с вставкой гена аспартазы под лактозным промотором. Способ предусматривает пропускание раствора фумарата аммония через колонку, заполненную частицами биокатализатора, с последующим выделением L-аспарагиновой кислоты из реакционного раствора.

Недостатком способа является высокая стоимость дорогостоящего индуктора лактозного оперона, изопропил-1-тио-β-D-галактозида (ИПТГ). Необходимость добавки этого дорогостоящего вещества снижает экономическую эффективность процесса получения L-аспарагиновой кислоты.

Известен рекомбинантный штамм *Escherichia coli* (ВКПМ В-11745) и способ получения L-аспарагиновой кислоты с использованием данного штамма (см. евразийский патент на изобретение № 035353 по кл. МПК C12N 1/21, опуб. 01.06.2020). Штамм *Escherichia coli* (ВКПМ В-11745) содержит плазмиду pAsp 116-5, полученную на основе вектора pUC19. В процессе выделения штаммов-трансформантов был получен спонтанный мутант, поддерживающий относительно высокий уровень синтеза аспартазы в отсутствие индуктора лактозного оперона, изопропил-1-тио-β-D-галактозида (ИПТГ).

Способ получения L-аспарагиновой кислоты заключается в биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе клеток штамма *Escherichia coli* (ВКПМ В-11745). При этом, в качестве биокатализатора используют свободные или иммобилизованные клетки штамма *E. coli*.

Недостатком данного способа является не очень высокая аспартазная активность штамма, необходимость добавления антибиотика ампициллина в процессе культивирования и потребность в высокой концентрации дрожжевого экстракта при выращивании биомассы штамма. Кроме того, данный штамм продуцирует некоторое количество фермента фумаратгидратазы (фумаразы) и в получаемых после биотрансформации растворах аспарагината аммония есть примесь яблочной кислоты.

Фермент фумаратгидратаза является одним из важных ферментов в цикле трикарбоновых кислот, обеспечивающих его функционирование. Фумаратгидратаза катализирует реакцию превращения фумарата в L-малат. Проявление активности этого фермента в клетке приводит к нецелевому расходованию фумарата и появлению в растворе L-аспарагината аммония примеси L-малата.

Наиболее близким к заявляемой группе изобретений является рекомбинантный штамм *Escherichia coli* В-12466 и способ получения L-аспарагиновой кислоты с использованием данного штамма (см. патент РФ № 2620942 по кл. МПК C12N1/21, опуб. 30.05.2017). Штамм получен путем замены промотора гена *aspA*, кодирующего аспартазу, на промотор P<sub>G25</sub> из бактериофага T5. Способ получения L-аспарагиновой кислоты заключается в биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе клеток штамма *E. coli* В-12466.

Однако, несмотря на то, что этот штамм обладает высокой конститутивной аспартазной активностью, при биотрансформации фумарата аммония в аспарагинат

наблюдается накопление побочного продукта, яблочной кислоты, ухудшающей качество готового продукта.

### **Раскрытие изобретения**

Задачей настоящей группы изобретений является создание бесплазмидного штамма *E. coli* с конститутивной высокой аспартазной активностью и сниженной фумаразной активностью, а также разработка более эффективного биокаталитического способа получения L-аспарагиновой кислоты с использованием биокатализатора на основе клеток данного штамма.

Задача решается путем:

- конструирования рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцента аспартазы, полученного с использованием технологии  $\lambda$ -Red зависимой рекомбинации путем замены промотора гена *aspA* на промотор  $P_{J23119}$  и удаления генов *fumA* и *fumC* из хромосомы штамма *E. coli* MG1655;

- в некоторых вариантах изобретения задача решается путем получения рекомбинантного штамма, депонированного во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под номером *E. coli* В-14502;

- разработки способа получения L-аспарагиновой кислоты путем биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе клеток рекомбинантного штамма *E. coli*;

- в некоторых вариантах изобретения задача решается путем разработки способа получения L-аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализатора свободных или иммобилизованных клеток штамма *E. coli*;

В результате осуществления изобретения достигаются следующие технические результаты:

- получен новый бесплазмидный рекомбинантный конститутивный штамм *E. coli* В-14502, обладающий высокой аспартазной активностью и сниженной фумаразной активностью, с возможностью применения его в качестве биокатализатора при получении L-аспарагиновой кислоты;

- достигнуто увеличение аспартазной активности биокатализатора на основе рекомбинантного штамма *E. coli*;

- разработан способ получения L-аспарагиновой кислоты с помощью биокатализатора на основе свободных и иммобилизованных клеток *E. coli*;

- достигнуто снижение трудоемкости, упрощение и удешевление процесса получения L-аспарагиновой кислоты.

## Подробное описание изобретения

Предлагаемое изобретение направлено на повышение эффективности процесса получения L-аспарагиновой кислоты и водных растворов аспарагината аммония за счет снижения трудоемкости и удешевления процесса, связанного с применением более эффективного биокатализатора на основе нового рекомбинантного штамма *E.coli* B-14502.

Заявленный способ заключается в обеспечении высокой аспартазной активности биокатализатора на основе клеток нового рекомбинантного штамма *E.coli* B-14502 и низкой фумаразной активности.

При осуществлении изобретения штамм может быть использован как в свободном виде, так и иммобилизованном с использованием приемов, известных в данной области, например, в полиакриламидном геле, в каррагинане, в ковалентно сшитую глутаровым альдегидом матрицу полиэтиленimina и другими способами.

Способ осуществляют следующим образом.

*Производится конструирование рекомбинантного штамма.*

На первом этапе проводили удаление генов фумараз. В хромосоме клеток *E. coli* содержится три гена, контролирующих образование фумараз А, В и С, при этом два из них – *fumA* и *fumC* локализуются в одном локусе, образуя единую группу сцепления, а третий ген – *fumB* - локализуется в другом локусе хромосомы. В экспериментах было показано, что удаление гена *fumB* приводило к существенному замедлению скорости роста клеток. Штамм *E.coli* MG1655, на основе которого конструировали рекомбинантный штамм проявлял фумаразную активность на уровне 600 ед./г сухих клеток.

Удаление генов фумараз *fumA-fumC* проводили с помощью метода фаг лямбда-зависимой рекомбинации. Для этого вместо генов *fumA-fumC* в штамм *E. coli* MG1655 вводили конструкцию *cI-hok-neo* (последовательность олигонуклеотидов предствалена в Таблице 1). После проверки на наличие вставки конструкции и удалении генов фумараз А и С эту конструкцию заменяли на фрагмент, содержащий области гомологии с хромосомой в локусах *fumA-fumC*.

На втором этапе конструирования, в хромосоме полученного штамма таким же методом проводили замену фрагмента промоторной области гена аспартазы *aspA* на сильный конститутивный промотор  $P_{J23119}$ . Более подробно процесс конструирования рекомбинантного штамма представлен в примере 1.

Полученный штамм получил обозначение *E. coli* MG1655\_delta *fumAC*\_P<sub>J23119</sub>-*aspA* и содержал делеции генов *fumA-fumC*, после депонирования во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов штамм получил наименование *E. coli* B-14502.

Штамм *E.coli* В-1450 является производным штамма *E.coli* MG1655 (ВКМП В-6195) (Производный штамма *E. coli* К-12, применяющийся для конструирования, получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, ВКПМ) и обладает обычными для *E.coli* культурально-морфологическими признаками. Культура представлена грамотрицательными, факультативно анаэробными палочковидными клетками, со слегка закруглёнными концами, размером 0,4-0,8 x 1-3 мкм. Клетки хорошо растут на простых богатых питательных средах. Колонии на мясо-пептонном агаре (МПА) и среде Луриа-Бертани (LB) - беловатые блестящие, размером 2-3 мм, края ровные, спор не образуют. Реакция Фогес-Проскауэра - отрицательная, реакция с метиловым красным - положительная. Культура отрицательна по признакам образования  $H_2S$  и гидролиза мочевины. Штамм оксидазоотрицательный, каталазоположительный. Оптимальная температура роста 37°C, оптимальный pH 6,5-7,5.

Для получения биомассы клеток заявляемого штамма с аспартазной активностью штамм выращивают при 34-37°C в течение 20-24 часов на обычных для *E.coli* средах: полноценных (ЛБ, МПА) либо синтетических, содержащих в качестве источника углерода глюкозу, глицерин или ацетат в концентрациях 0.1-2%, а в качестве источника азота аммонийные, нитратные соли или дрожжевой экстракт в концентрациях 0.4-2%, а также соли магния в количестве от 0,05 до 0,1%.

Данный штамм при выращивании на ферментационной среде в ферментере способен продуцировать L-аспартат-аммоний лиазу в количестве до 200000 ед/мл. Удельная аспартазная активность клеток на стационарной фазе роста составляет до 9000 ед/мг клеток по сухому весу. При этом фумаразная активность не детектируется.

Аспартазную активность нативных клеток определяют по скорости синтеза L-аспарагиновой кислоты. Клетки активируют 1 М раствором фумарата аммония с добавлением хлорида магния и этилацетата. Суспензию выдерживают около 35-45 минут при 37° С при непрерывном перемешивании с целью активации фермента и увеличения проницаемости клетки. Далее проводят реакцию трансформации. Для этого к активированному раствору добавляют 1 М раствор фумарата аммония и выдерживают при 37° С, перемешивая в течение 5-10 минут. В качестве контроля используют образец, в котором к активированной клеточной суспензии добавлена дистиллированная вода. Реакцию останавливали разведением пробы в 100 раз в растворе 0,1 М дигидрофосфата калия с добавлением ортофосфорной кислоты до pH 3,0. Клетки отделяли центрифугированием при 14000 об/мин. В полученной надосадочной жидкости определяли содержание L-аспарагиновой кислоты с помощью ВЭЖХ или спектрофотометрическим методом. За единицу активности принимали образование 1

микромоля L-аспарагиновой кислоты за 1 час при 37С из 1М раствора фумарата аммония с добавлением 1мМ соли магния.

Фумаразную активность клеток определяли на активированных клетках, как указано выше. Для этого к активированному раствору добавляют 1 М раствор фумарата натрия и выдерживают при 37° С при непрерывном перемешивании в течение 4 часов. В качестве контроля используют образец, в котором к активированной клеточной суспензии добавлена дистиллированная вода. Далее, как при определении аспартазной активности. В полученной надосадочной жидкости определяли содержание L-яблочной кислоты с помощью ВЭЖХ. За единицу активности принимали образование 1 микромоля L-яблочной кислоты за 1 час при 37С из 1М раствора фумарата натрия.

Определение L-аспарагиновой и L-яблочной кислоты проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором (205нм) на колонке 150x2 мм, Gemini NX-C18 5 мкм (Phenomenex). Элюент - 0,25% ортофосфорная кислота.

Получение иммобилизованных клеток осуществляли, смешивая суспензию клеток с нейтрализованным раствором гомополимера полиэтиленimina (Polymin-P, BASF), после чего добавляли раствор глутарового альдегида, перемешивали и оставляли для завершения процессов сшивки.

Затем полученную массу измельчали до размеров рабочей фракции от 0,5 мм до 1,5 мм, промывали водой и выдерживали в растворе ацетата аммония с концентрацией от 200 до 250 г/л не менее 48 часов.

Клетки штамма, иммобилизованные как описано выше, позволяют получить биокатализатор с удельной аспартазной активностью до 300000 ед. на грамм влажного биокатализатора. Данный биокатализатор, помещенный в проточный реактор, обеспечивает при 25 С биотрансформацию раствора фумарата аммония с концентрацией 200 г/л (по фумаровой кислоте) со скоростью до 8 объемов раствора на объем биокатализатора, находящегося в реакторе с эффективностью 99,5%. В растворе аспарагината аммония не обнаруживается примесь яблочной кислоты.

Получение и культивирование штамма E.coli B-14502, получение иммобилизованных клеток штамма E.coli B-14502, проведение биотрансформации фумарата аммония и получение L-аспарагиновой кислоты с использованием иммобилизованных клеток штамма E.coli B-14502 подтверждены следующими примерами конкретного исполнения.

Следует понимать, что эти и все приведенные в материалах заявки примеры не являются ограничивающими и приведены только для иллюстрации настоящего изобретения.

### Пример 1. Конструирование штамма

Конструирование штамма *E. coli* B-14502 проводилось в 2 этапа. На первом этапе из хромосомы штамма удаляли гены *fumA* и *fumC*, на втором этапе изначальный промотор гена *aspA* заменяли на конститутивный промотор P<sub>J23119</sub>. Олигонуклеотиды, использованные в работе, представлены в Таблице 1.

Для удаления генов *fumA-fumC* в штамм *E. coli* MG1655 путем электропорации вводили вспомогательный плазмидный вектор pRedCmOcr. Трансформированные клетки отбирали на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C. Полученные клетки выращивали на среде LB до оптической плотности 0,3-0,4 единицы при длине волны 600 нм в кювете 1 см, после чего добавляли L-рамнозу до конечной концентрации 0,4%. Клетки растили еще 25 минут, после чего охлаждали и делали электрокомпетентными. Параллельно, с вектора pTmpKm получали ПЦР фрагмент, несущий конструкцию *cI-hok-neo* (фрагменты 1 и 2 в Таблице1) и предназначенный для встраивания вместо генов *fumA-fumC*. Путем электропорации фрагмент вводили в клетки *E. coli* и отбирали на среде с канамицином (50 мкг/мл). Наличие вставки фрагмента *cI-hok-neo* проверяли ПЦР. Проверенные клетки выращивали на среде LB до оптической плотности 0,3-0,4 единицы при длине волны 600 нм, после чего проводили индукцию  $\lambda$ -Red системы. Параллельно, путем ПЦР-сшивки олигонуклеотидов получали фрагмент, содержащий области гомологии с хромосомой в локусах *fumA-fumC* (фрагменты 5 и 6 в Таблице1). Полученный ПЦР конструктор путем электропорации вводили в клетки *E. coli* и после 16 часов качания высевали на среду LB с хлорамфениколом (200 мкг/мл). Полученные клоны проверялись секвенированием на отсутствие конструкции *cI-hok-neo* в хромосоме. Потерю вспомогательного вектора pRedCmOcr проводили на чашках LB с добавлением 1мМ ИПТГ. Полученный штамм получил обозначение *E. coli* MG1655\_delta *fumAC* и содержал делеции генов *fumA-fumC*.

Для замены изначального промотора гена *aspA* в полученный штамм *E. coli* MG1655\_delta *fumAC* путем электропорации вводили вспомогательный плазмидный вектор pRedCmOcr. Трансформированные клетки отбирали на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C. Полученные клетки выращивали на среде LB до оптической плотности 0,3-0,4 единицы при длине волны 600 нм, после чего проводили индукцию  $\lambda$ -Red системы путем добавления L-рамнозы до конечной концентрации 0,4%. Клетки растили еще 25 минут, после чего охлаждали и делали электрокомпетентными. Параллельно, с вектора pTmpKm получали ПЦР фрагмент, несущий конструкцию *cI-hok-neo* (фрагменты 7 и 8 в Таблице1) и предназначенный для встраивания вместо промотора



гена *aspA*. Путем электропорации фрагмент вводили в клетки *E. coli* и отбирали на среде с канамицином (50 мкг/мл). Наличие вставки фрагмента *cI-hok-neo* проверяли ПЦР. Проверенные клетки выращивали на среде LB до оптической плотности 0,3-0,4 единицы, после чего проводили индукцию  $\lambda$ -Red системы. Параллельно, путем ПЦР-сшивки олигонуклеотидов получали фрагмент, содержащий конструкцию промотора  $P_{J23119}$  (фрагменты 11-14 в Таблице1). Полученный ПЦР конструктор путем электропорации вводили в клетки *E. coli* и после 16 часов качания высевали на среду LB с хлорамфениколом (200 мкг/мл). Полученные клоны проверялись секвенированием на наличие вставки промотора  $P_{J23119}$ . Потерю вспомогательного вектора *pRedCmOsc* проводили на чашках LB с добавлением 1мМ ИПТГ. Полученный штамм получил обозначение *E. coli* MG1655\_delta *fumAC\_ P<sub>J23119</sub>-aspA* и содержал промотор  $P_{J23119}$  перед геном *aspA*. Указанный штам был депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов и получил наименование *E. coli* B-14502.

Пример 2. Культивирование штамма *E. coli* B-14502.

Штамм предварительно выращивали при 37С в течение ночи на агаризованной среде LB.

Свежую культуру пересевали с агаризованной среды бактериологической петлей в пробирки с 10мл жидкой среды LB и культивировали на термостатируемом шейкере при 37С, 200 об/мин, в течение 15-18 часов.

Полученный посевной материал пересевали в 5 качалочных колб объемом 0,75 л со 150 мл жидкой ферментационной среды следующего состава (г/л):  $KH_2PO_4$ - 13,3 г/л,  $(NH_4)_2HPO_4$  – 4 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, глюкоза - 10 г/л,  $MgSO_4$ - 0,5 г/л, pH 7,0 и культивировали в термостатируемом шейкере при 37С, 200 об/мин 15-18 часов. При культивировании штамма *E. coli* B-14502 в колбах продукция аспартазы составляла до 25000 ед/мл.

Четыре выросшие колбы использовали для засева ферментера объемом 100 л, содержащего 60 л питательной стерильной ферментационной среды следующего состава (г/л):  $KH_2PO_4$  13,3 г/л,  $(NH_4)_2HPO_4$  – 4 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, глюкоза - 15 г/л,  $MgSO_4$ - 1,0 г/л,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,52 мг/л,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,46 мг/л,  $H_3BO_3$  – 0,63 мг/л,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 2,9 мг/л,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 14,1 мг/л,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,7 мг/л,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 1,8 мкг/л, NaOH до pH 7,0

Ферментацию проводили при следующих условиях: температура 37°С, аэрация – 120 л/мин, перемешивание - 600 об/мин, pH 6,8. Уровень pH поддерживали в автоматическом режиме раствором аммиака 25%. На 6, 13 и 18 часов роста в ферментер добавляли по 3 кг 50%-ного стерильного раствора глюкозы. Время культивирования 26

часов. Оптическая плотность культуральной жидкости на сливе 80,0-90,0 ед. ОП. Удельная аспартазная активность 9000 Ед./мг клеток по сухому весу. Общая аспартазная активность - 215000 Ед./мл. Клетки отделяли центрифугированием и промывали 1% ным раствором хлорида натрия. Количество собранных влажных клеток в виде пасты составило 4,60 кг.

Пример 3. Получение иммобилизованного биокатализатора на основе штамма *E.coli* В-14502.

Биомассу клеток штамма *E.coli* В-14502 из примера 2 в количестве 1,96 кг помещали в пластиковое ведро на 10 л, добавляли обессоленную воду 1,44 кг и перемешивали до однородной суспензии. Затем, продолжая перемешивание, добавляли 840 г 20%-ного раствора гомополимера полиэтиленимина (Polymine-P, BASF), предварительно нейтрализованного соляной кислотой до рН 8,0-8,5. Приготовленную суспензию охлаждали до 5С. 1,04 кг суспензии переносили в стакан на 2 л и при непрерывном перемешивании добавляли 168 г 25%-ного раствора глутарового альдегида. Смесь начинала быстро отверждаться. Процесс повторяли 4 раза. Полученную массу оставляли на 30 минут для завершения протекающих реакций, после чего измельчали, отмывали водопроводной водой и помещали в 20%-ный раствор и оставляли не менее, чем на 48 часа при температуре 5С, заменяя раствор ацетата аммония на свежий.

Полученный биокатализатор имел удельную активность 600000 ед./ г влажного биокатализатора.

Пример 4. Непрерывная биотрансформация фумарата аммония иммобилизованными клетками.

Биокатализатором, полученным по примеру №3, в количестве 3 кг (по влажному весу) (около 5л) заполняли пластиковую колонку 10x70 см, объемом 5,5 л. Перистальтическим насосом прокачивали через слой биокатализатора раствор фумарата аммония с температурой 25°С, с концентрацией 200 г/л (по фумаровой кислоте), рН 8,5 и с добавлением 1 мМ MgSO<sub>4</sub>. Скорость подачи раствора 40 л/час. Раствор, выходящий из колонки, содержал менее 1,0 г/л фумарата аммония (в расчете на фумаровую кислоту) и не содержал примеси яблочной кислоты. Степень конверсии более 99%. Степень конверсии оставалась более 99% в продолжение непрерывного процесса биотрансформации фумарата аммония в течение трех месяцев и более.

Пример 5. Получение L-аспарагиновой кислоты из реакционных растворов после биотрансформации.

В химический стакан вносили 1000 мл реакционного раствора после биотрансформации по примеру 4 и при перемешивании, добавляли около 260 г водного раствора серной кислоты с концентрацией 30% до достижения рН в растворе 2.9 ед. Полученную суспензию охлаждают до 10С и выдерживают при этой температуре 1 час. Осадок отделяют фильтрованием, промывают 400 мл захоложенной воды и сушат при температуре 80С до постоянного веса. Количество полученной кристаллической L-аспарагиновой кислоты 209 г. Удельный угол вращения в 5 н НСl  $[\alpha]_D^{20} = 25,0$ .

Предлагаемый способ обеспечивает более эффективное получение L-аспарагиновой кислоты за счет удешевления и упрощения процесса. При этом исключается необходимость использования дорогостоящих питательных сред, больших объемов культивирования.

Таким образом, предлагаемый способ получения L-аспарагиновой кислоты позволяет обеспечить высокую аспартазную активность биокатализатора и полное подавление побочной фумаразной активности, существенно снизить трудоёмкость и стоимость технологического процесса.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

**Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые для получения штамма E. coli B-14502.**

<b>Номер фрагмента</b>	<b>Последовательность</b>	<b>Назначение</b>
1	GCCCGGCTTTCATACTGCCGACCATCTGTTCTG GCCGTACCCAGCTGTCATTTTCGAAAAAAGGCCTCCC	Вставка cI-hok-neo
2	AACACCCGCCAGAGCATAACCAAACCAGGCAG TAAGTGAGAGAACAATGCCATCTGGTATCACTTAAAGG	вместо fumA-fumC
3	GACAATGTGCAGCACCG	Проверка вставки cI-hok-neo
4	CTCGTTGACCCTGAGCAGGC	вместо fumA-fumC
5	GCAGCCGCTTCGTTTGATCATTCACGGCTGCACCTG TATGTTGCAGATTAACCATTGTTCTC	Удаление cI-hok-neo
6	AACGGAACACCCGCCAGAGCATAACCAAACCAGG CAGTAAGTGAGAGAACAATGGTTAATCTGCAACATACA	из локуса fumA-fumC
7	ACTTCCCTGGTACCCAACAGATCTTCTTCGATACGAAT GTTGTTTGACATTTTTCGAAAAAAGGCCTCCC	Вставка cI-hok-neo
8	AACTATTTTTGGTAGTAATCCCAAAGCGGTGATCTATTT CACAAATTAATCCATCTGGTATCACTTAAAGG	вместо промотора aspA
9	GTTTAGCTTATATTGTGGTC	Проверка вставки cI-hok-neo
10	GGTGAGATGACAGGAGATCC	вместо aspA
11	ACTTCCCTGGTACCCAACAGATCTTCTTCGATACGAAT GTTGTTTGACATCTAGTATTTCTCCTCTTC	Сборка промотора P <sub>J23119</sub>
12	CTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATG GATCCACCCGTTTTTTTTGGGTGCGACTACTAGAGAAAGAG GAGAAATACTAGATG	
13	GACTGAGCTAGCTGTCAATCTAGGGTTGCGCAA ACATCTTGAAATTTTGCTAATGACCACAATATAAGCTAAACG	

14

GGTTAACCCCGGCTACCTGAATGGGTTGCGAATC  
GCGTTTAGCTTATATTGTGGTC

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, обладающий конститутивной аспартазной активностью и сниженной фумаразной активностью, полученный путем замены собственного промотора гена *aspA* в штамме *Escherichia coli* MG1655 на конститутивный промотор  $P_{J23119}$  и удалением фумаразных генов *fumA* и *fumC*.

2. Штамм по п.1, депонированный во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под номером В-14502.

3. Способ получения L-аспарагиновой кислоты путем биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе клеток *E. coli*, отличающийся тем, что в качестве биокатализатора используют штамм *E. coli* по любому из пп.1 или 2.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве биокатализатора используют свободные или иммобилизованные клетки штамма *E. coli*.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202391662**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
C12N 1/21, 9/88, C12P 13/20, C12R 1/19

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2620942 C2 (ФГБУ "ГосНИИгенетика") 30.05.2017, формула, примеры 1,2	1-4
Y	ДЕРБИКОВ Д.Д. и др. Синтез аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализаторов штаммов <i>Escherichia coli</i> с удаленными генами фумараз. Биотехнология, 2016, т. 32, № 5, с.46 правая кол. абз.3 – с.47 левая кол. абз.1, таблица 3 [онлайн] [найдено 2023-11-02]. Найдено в <doi:10.1016/0234-2758-2016-32-5-38-48>	1-4
Y	CN 108060114 B (UNIV JIANGNAN) 01.03.2019, пример 2	1-4
A	RU 2546239 C1 (ФГБУ "ГосНИИгенетика") 10.04.2015	1-4
A	EA 35353 B1 (АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИОАМИД") 01.06.2020	1-4

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

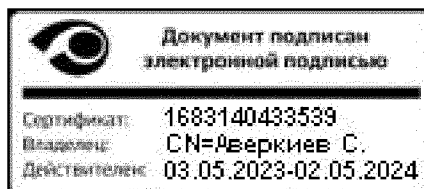
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 06 декабря 2023 (06.12.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202391662**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 13/20* (2006.01)  
*C12N 9/88* (2006.01)  
C12R 1/19 (2006.01)

СПК:

**C12N 1/205**  
**C12P 13/20**  
**C12Y 403/01001**  
**C12N 9/88**  
C12R 2001/19