

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201700163** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2018.08.31**

(51) Int. Cl. *C12P 13/20* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.02.28**

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

---

(96) **2017000013 (RU) 2017.02.28**

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

(72) Изобретатель:  
**Синолицкий Максим  
Константинович, Синолицкая  
Стэлла Владимировна, Воронин  
Сергей Петрович, Дебабов Владимир  
Георгиевич, Новиков Андрей  
Дмитриевич, Яненко Александр  
Степанович (RU)**

(74) Представитель:  
**Пустовалова М.Л., Котлов Д.В.,  
Черняев М.А., Яремчук А.А. (RU)**

(57) Группа изобретений относится к биотехнологии и касается способа получения L-аспарагиновой кислоты. Для этого сконструирован рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, продуцент аспартазы, путем введения в штамм *E. coli* ВКПМ 7188 рекомбинантной плазмиды, содержащей ген *aspA* под контролем лактозного промотора *lacUV5*. Получение L-аспарагиновой кислоты заключается в биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора, полученного на основе клеток рекомбинантного штамма *E. coli*, и выделения целевого продукта известными способами. В качестве биокатализатора используют свободные или иммобилизованные клетки штамма *E. coli*. Рекомбинантный штамм *E. coli* позволяет получать высокий уровень аспартазной активности без использования изопропилтиогалактозида в качестве индуктора в составе питательной среды.

**201700163**  
**A1**

**201700163**  
**A1**

## Способ получения L-аспарагиновой кислоты

### Область техники

Изобретение относится к биотехнологии и касается способа получения L-аспарагиновой кислоты, которая находит применение в фармацевтической, пищевой, микробиологической промышленности и в кормопроизводстве.

### Уровень техники

Известны способы получения L-аспарагиновой кислоты биокаталитической трансформацией фумарата аммония в L-аспарагинат аммония с использованием микроорганизмов, синтезирующих фермент аспартат-аммоний лиазу (аспартазу). Наиболее перспективным и технически легко осуществимым в процессе биотрансформации фумарата аммония в L-аспарагинат является использование иммобилизованных бактериальных клеток. Иммобилизованными клетками заполняется проточный реактор, и раствор фумарата аммония насосом прокачивают через слой биокатализатора, на выходе из реактора образуется раствор моноаммонийной соли аспарагиновой кислоты.

Используются природные (дикие), мутантные и рекомбинантные штаммы продуценты аспартазы, относящиеся к различным родам, например, роду *Escherichia* (SU659611). В указанном изобретении использован природный штамм. Основным недостатком данного способа – низкая активность аспартазы. В изобретении по патенту EP0110422 использованы мутантные штаммы. Основные недостатки данного способа - это высокий уровень побочной активности фумаратгидратазы и невысокая активность аспартазы. По роду *Serratia* (EP0111293) был получен рекомбинантный штамм. Основные недостатки данного способа - отсутствие селективирующего фактора при культивировании штамма и быстрая утеря плазмиды. Родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium* и др. (EP0752476), основные недостатки способа - трудоемкость, многостадийность и невысокая целевая активность.

Известен способ получения L-аспарагиновой кислоты с использованием природного штамма *Escherichia coli* (ВКПМ В-7188) (RU2174558). Однако данный способ является недостаточно эффективным из-за низкой аспартазной активности штамма.

Известен способ получения аспарагиновой кислоты, описанный в патенте US4692409. В нем описан рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TA-5004, с высокой аспартазной активностью и биокатализатор на основе биомассы клеток этого штамма включенных в гель полисахарида, каппа-каррагинана. Основные недостатки указанного способа - это отсутствие селективирующего фактора при культивировании штамма, быстрая утеря плазмиды, а также диффузионные ограничения матрицы геля каррагинана, которые

при увеличении удельной аспартазной активности клеток не позволяют существенно увеличить удельную активность биокатализатора.

Также известен способ получения аспарагиновой кислоты с использованием иммобилизованных клеток, обладающих аспартазной активностью на поверхности частиц ионообменных смол или неорганических материалов с помощью полиазетидина (US4436813). Известен способ получения аспарагиновой кислоты, в котором используют биокатализатор на основе клеток, обладающих аспартазной активностью, иммобилизованных на частицах вермикулита с помощью сшивающих агентов, в том числе глутарового альдегида в присутствии полиэтиленimina (US4504582). Недостатком данного способа является низкая эффективность получаемого биокатализатора.

Наиболее близким к заявленному способу является способ получения L-аспарагиновой кислоты, описанный в патенте US6214589. В данном способе использовали биокатализатор на основе клеток рекомбинантного штамма *Escherichia coli*. Штамм содержит 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. Биокатализатор получают иммобилизацией бактериальных клеток на ионообменной смоле с использованием полимеров, изменяющих растворимость в зависимости от величины pH среды.

Недостатком способа является высокая стоимость компонентов среды, в частности необходимость добавки дорогостоящего индуктора лактозного оперона, изопропил-1-тио-β-D-галактозида (ИПТГ), который индуцирует экспрессию аспартазы. Это соединение широко используется для индукции экспрессии рекомбинантных генов в экспрессионных векторах, сконструированных на основе промотора lac-оперона. Необходимость добавки этого дорогостоящего вещества снижает экономическую эффективность процесса культивирования клеток *E. coli*, получения биокатализатора и, как следствие, всего процесса получения L-аспарагиновой кислоты. Кроме того, недостатком данного способа является труднодоступность полимеров и использование сложного оборудования для иммобилизации.

### **Раскрытие изобретения**

Задачей настоящего изобретения является повышение эффективности процесса получения L-аспарагиновой кислоты за счет снижения трудоёмкости и удешевления процесса, связанного с применением более эффективного биокатализатора.

Задача решается путем:

- конструирования рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцента аспартазы, путем введения в штамм *E. coli* ВКПМ 7188 рекомбинантной плазмиды, содержащей ген *aspA* под контролем лактозного промотора *lacUV5*;

5 - в некоторых вариантах изобретения задача решается путем получения рекомбинантного штамма, депонированного во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под номером *E. coli* ВКПМ В-11745;

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

10 - 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*;

15 - в некоторых частных вариантах изобретения задача решается путем разработки способа иммобилизации клеток штамма *E. coli* в матрице полиэтиленимина, ковалентно сшитой глутаровым альдегидом.

- в некоторых частных вариантах изобретения задача решается путем разработки способа иммобилизации клеток штамма *E. coli* отличающегося тем, что весовое соотношение полиэтиленимина и глутарового альдегида составляет от 1:1 до 3:1.

20 - в некоторых частных вариантах изобретения задача решается путем разработки способа иммобилизации клеток штамма *E. coli* отличающегося тем, что, весовое соотношение компонентов полиэтиленимина и глутарового альдегида к биомассе *E. coli* составляет от 0,25:1 до 3:1.

25 В результате осуществления изобретения достигаются следующие технические результаты:

- получена рекомбинантная плаزمида *pAsp 116-5* для создания высокопродуктивных штаммов *E. coli*;

- получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, в том числе штамм *E. coli* ВКПМ В-11745, обладающие высокой аспартазной активностью;

30 - снижение трудоемкости, упрощение и удешевление процесса получения L-аспарагиновой кислоты;

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

35 - повышение ферментативной активности биокатализатора без внесения в среду дорогостоящего индуктора (ИПТГ);

- исключение необходимости использования дорогостоящих питательных сред, больших объемов культивирования и малодоступных компонентов для иммобилизации клеток;

- разработан способ иммобилизации клеток рекомбинантного штамма *E. coli*;

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

- разработан способ иммобилизации *E. coli* в матрице полиэтиленимина, ковалентно сшитой глутаровым альдегидом;

10 - разработан способ непрерывной биотрансформации фумарата аммония иммобилизованными клетками.

### Описание рисунков

Фиг 1. Схема плазмиды pAsp 116-5.

15 На рисунке: Amp<sup>r</sup> – ген устойчивости к ампициллину, гер (pMB1) - репликон, f1 (IG) – фрагмент ДНК профага f1, Asp – ген L-аспартат аммоний лиазы, пром – промоторная область LacUV5.

### Подробное описание изобретения

20 Предлагаемое изобретение направлено на повышение эффективности процесса получения L-аспарагиновой кислоты за счет снижения трудоемкости и удешевления процесса, связанного с применением более эффективного биокатализатора на основе нового рекомбинантного штамма *E. coli*, иммобилизованного с помощью полиэтиленимина сшитого глутаровым диальдегидом.

25 Заявленный способ заключается в обеспечении высокой аспартазной активности биокатализатора на основе клеток нового рекомбинантного штамма *E. coli* без использования дорогостоящего индуктора ИПТГ в процессе его культивирования и получении высокоэффективного биокатализатора на основе клеток штамма *E. coli*.

30 Предлагаемый способ получения L-аспарагиновой кислоты путем биотрансформации фумарата аммония в аспарагинат аммония с помощью биокатализатора на основе микробных клеток *E. coli*, с последующим выделением целевого продукта, предусматривает использование в процессе биотрансформации высокоактивного биокатализатора на основе нового рекомбинантного штамма *E. coli*, выращенного на питательной среде без добавления индуктора ИПТГ.

35 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 и другими способами, в частности

штамм может быть иммобилизован в ковалентно сшитую глутаровым альдегидом матрицу полиэтиленимина.

Полиэтиленимин и глутаровый альдегид являются доступными и хорошо изученными соединениями, широко применяемыми для иммобилизации ферментов (см., например, R. Bahulekar et al., Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts // Enzyme and Microb. Technol., 1991. - V.13(11) - P.858-868.; US4504582). Шиффовы основания, образуемые в процессе совместной сшивки аминогрупп бактериальных клеток и полиэтиленимина считаются не очень прочными соединениями. Однако в щелочных условиях функционирования аспартазы, а также в водных растворах с концентрацией солей выше 20%, данный тип соединений достаточно устойчив. Кроме того, образуемая полимерная матрица имеет достаточно широкие поры, чтобы не оказывать существенных диффузионных ограничений при размере частиц от 0,5 до 1,0 мм.

Способ осуществляют следующим образом.

Производится конструирование рекомбинантного штамма.

В одном из вариантов осуществления изобретения под рекомбинантным штаммом понимается линия микроорганизмов производных *Escherichia coli* ВКПМ В-11745, сохраняющих основные мутации и генно-инженерные модификации, обеспечивающие высокую продукцию фермента аспартазы. Рекомбинантный штамм *E.coli* ВКПМ В-11745 конструируется путем трансформации штамма *E.coli* ВКПМ В-7188 плазмидой рAsp 116-5. Выбор в качестве реципиента при конструировании заявляемого штамма именно штамма *E.coli* ВКПМ В-7188 связан с тем, что, несмотря на низкий уровень продукции аспартазы, он соответствует большинству требований, предъявляемых реципиентам для экспрессии, т.е. генетически маркирован, позволяет получить высокую эффективность при трансформации и не продуцирует токсичных метаболитов.

Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-7188 получается из дикого штамма посредством обработки мутагеном (нитрозогуанидином), с последующим отбором мутантов на аналоге глюкозы альфа-метил-D-глюкопиранозид (RU2174558).

Плазмида рAsp 116-5 получается на основе вектора рUC19 и содержит ген L-аспартат-аммоний лиазы из *E. coli* В-7188 под лактозным промотором lacUV5 и ген устойчивости к антибиотикам пенициллинового ряда. Схема плазмиды представлена на Фиг. 1, где: Amp – ген устойчивости к ампициллину, гер (рMB1) - репликон, f1 (IG) – фрагмент ДНК профага f1, Asp – ген L-аспартат аммоний лиазы, prom – промоторная область LacUV5.

Штамм *E.coli* ВКПМ В-11745 характеризуется всеми признаками, обычными для *E.coli*, включая, в том числе, культурально-морфологические признаки. 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 Лурия-Бертани (LB) - беловатые блестящие, размером 2-3 мм, края ровные, спор не образуют.

5 После трансформации клеток штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 - ДНК рAsp 116-5, в процессе выделения штаммов-трансформантов был получен спонтанный мутант, поддерживающий высокий уровень синтеза аспартазы в отсутствие индуктора ИПТГ. В таблице 1 представлено влияние добавления индуктора ИПТГ в количестве 1 мМ в ферментационную среду.

10 Таблица 1. Влияние индуктора ИПТГ на аспартазную активность.

Показатель	Без ИПТГ	ИПТГ 1 мМ
Удельная аспартазная активность ед/ ед.ОП	2570±120	2470±140
Общая аспартазная активность ед/ мл КЖ (культуральной жидкости)	53860±5200	47920±4300

15 Полученный штамм *E. coli* 7188 (рAsp116-5) депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный номер ВКПМ В-11745. Данный штамм при выращивании на ферментационной среде в ферментере способен продуцировать L-аспартат-аммоний лиаза в количестве не менее 40000 ед/мл.

20 Удельную аспартазную активность клеток определяли следующим образом. К 4,5 мл 1,5 М раствора фумарата аммония добавляли 0,5 мл суспензии предварительно активированных микробных клеток с оптической плотностью 5 ед. и инкубировали смесь при перемешивании один час при 30°C. Количество образовавшейся аспарагиновой кислоты определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). За единицу активности принято образование одного микромоля аспарагиновой кислоты за один час. Оптическую плотность клеточной суспензии определяли при длине волны 540 нм и оптическом пути 5 мм.

25 Получение иммобилизованных клеток осуществляли, смешивая суспензию клеток с раствором гомополимера полиэтиленимина (Polymin-P, BASF), после чего добавляли раствор глутарового альдегида, перемешивали и оставляли для завершения процессов сшивки. Количество раствора гомополимера полиэтиленимина выбирали таким образом, чтобы конечная концентрация полиэтиленимина составляла от 10 до 50% в расчете на 100% вещество. Количество раствора глутарового альдегида выбирали таким образом, чтобы конечная концентрация глутарового альдегида составляла от 5 до 30% в расчете на

30

100% вещество. Количество биомассы клеток *E.coli* выбирали таким образом, чтобы конечная концентрация биомассы клеток составляла от 25 до 65% в расчете сухой вес. Соотношение полиэтиленимина и глутарового альдегида составляет от 1:1 до 3:1. А весовое соотношение компонентов полиэтиленимина и глутарового альдегида к биомассе *E. coli* составляет от 0,25:1 до 3:1. Где полиэтиленимин и глутаровый альдегид в расчете на 100% вещество, а биомасса в расчете на сухой вес.

Затем полученную массу измельчали, подсушивали до остаточной влажности от 65 до 75%, отсеивали фракции менее 0,5 мм и более 1,5 мм, выдерживали в растворе ацетата аммония с концентрацией от 200 до 250 г/л не менее 24 часов.

Способ иммобилизации обеспечивает получение иммобилизованных клеток с удельной аспартазной активностью от 90000 до 210000 ед./ч 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 от 3 до 5 объемов/час биокатализатора, находящегося в реакторе с эффективностью 99%.

Получение и культивирование штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-11745, получение иммобилизованных клеток штамма *E.coli* ВКПМ В-11745, проведение биотрансформации фумарата аммония и получение L-аспарагиновой кислоты с использованием иммобилизованных клеток штамма *E.coli* ВКПМ В-11745 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. Получение плазмиды pAsp 116-5.**

Для получения плазмиды pAsp 116-5 использовали последовательность гена AspA из *Escherichia coli*, представляющую собой ген L-аспартат-аммоний лиазы без регуляторной промоторной области.

Последовательность aspA получали методом ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК, выделенную из штамма *E.coli* ВКПМ В-7188.

Геномную ДНК выделяли с помощью Набора для выделения геномной ДНК согласно рекомендациям изготовителя (Genomic DNA Purification Kit, # K0512, Thermo Fisher Scientific Biosciences Inc.).

ПЦР продукт получали с помощью следующей пары праймеров:

ttt gta taa gaa aat gag agg g (SEQ ID NO: 1) и

aaa gga tcc tgt acg att act gtt cgc ttt cat cag tat agc (SEQ ID NO: 2)



Фрагменты ДНК получали с использованием Pfu полимеразы.

В работе использовали праймеры-олигонуклеотиды, синтезированные ЦКП ФГУП "ГосНИИгенетика" и ферменты Thermo Fisher Scientific Biosciences Inc.

5 Для реакции амплификации использовали приблизительно 100 нмоль каждого праймера. Фрагмент амплифицированной ДНК после электрофореза в 1% агарозном геле очищали методом экстракции с помощью набора для выделения ДНК из геля согласно рекомендациям изготовителя (GeneJET Gel Extraction Kit, # K0691, Thermo Fisher Scientific Biosciences Inc.).

10 Очищенный фрагмент ДНК в количестве 0,5 мкг лигировали с 0,2 мкг ДНК плазмиды pUC19, расщепленной рестриктазой SmaI. Лигирование производили с помощью реактивов Thermo Fisher Scientific Biosciences Inc. согласно рекомендациям изготовителя. Полученную плазмиду трансформировали в *E.coli* XL1-Blue методом электропорации согласно методике, описанной в источнике (Sambrook et al., Molecular Cloning, second  
15 edition Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y., 1989). Клоны, содержащие искомую вставку ДНК, отбирали на чашках с агаризованной средой LB с ампициллином и стандартному тесту на отсутствие активности β-галактозидазы, как описано в вышеуказанном источнике. Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, проверяли методом ПЦР на наличие вставки, с использованием указанных выше  
20 праймеров. Клоны с подтвержденной вставкой проверяли на наличие аспартазной активности. В клонах с подтвержденной аспартазной активностью проверяли нуклеотидную последовательность гена методом секвенирования.

Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, подтвержденного размера, подтвержденной нуклеотидной последовательности, обеспечивающую экспрессию L-аспартат-аммоний лиазы в штамме *E.coli* XL1-Blue обозначали далее как pAsp 116-5.  
25

### **Пример 2. Получение штамма *E.coli* ВКПМ В-11745.**

Штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-7188 для трансформации использовали для приготовления электрокомпетентной культуры как описано в источнике (Sambrook et al.,  
30 Molecular Cloning, second edition Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y., 1989).

В качестве ДНК для трансформации штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-7188 использовали плазмидную ДНК pAsp 116-5, полученную в соответствии с описанием в примере 1.

Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде LB с ампициллином.  
35 Отобранные трансформанты проверяли на наличие аспартазной активности. Фенотип трансформантов поддерживали рассевом на той же среде.

Десять клонов, показавших наибольшую аспартазную активность, проверяли на наличие L-аспартат-аммоний лиазной активности в ацетатной ферментационной среде, как описано далее в примере 3.

По результатам культивирования отбирали наиболее активный клон. Отобранный  
5 клон, обладающий наибольшей аспартазной активностью, являющийся трансформантом *E.coli* ВКПМ В-7188 (pAsp 116-5) и при культивировании в пробирках позволяющий получать активность L-аспартат-аммоний лиазы не менее 10000 ед/мл, обозначали далее как *E.coli* ВКПМ В-11745.

### 10 **Пример 3. Культивирование штамма *E.coli* ВКПМ В-11745 в колбах.**

Штамм предварительно выращивали при 37°C в течение ночи на агаризованной среде LB с 100 мг/л ампициллина.

Свежую культуру пересевали с чашек бактериологической петлей в пробирки с 10мл жидкой среды LB с ампициллином и культивировали на термостатируемом шейкере при  
15 37°C, 300 об/мин, в течение не менее 15 часов.

Полученный посевной материал пересевали в пробирки с 10 мл жидкой среды LB с ампициллином, разбавляя в 100 раз (100 мкл культуры на 10 мл среды). Культивировали на термостатируемом шейкере при 37°C, 300 об/мин, в течение не менее 2 часов до ОП<sub>600</sub> ~ 0,6 – 0,8. Полученный посевной материал пересевали в колбы со 100 мл жидкой  
20 ферментационной среды следующего состава (г/л):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O - 15,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2,0; CH<sub>3</sub>COONa - 7; Дрожжевой экстракт - 20; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,25; pH - 6,5-7,0 с ампициллином - 100 мг/л и культивировали на термостатируемом шейкере при 37°C, 300 об/мин, в течение не менее 2 часов до ОП<sub>600</sub> ~ 0,6 – 0,8. После этого снижали температуру культивирования до 30 °C и культивировали  
25 еще не менее 7 часов до достижения максимальной активности культуры. При культивировании штамма *E.coli* ВКПМ В-11745 продукция аспартазы составляла не менее 10000 ед/мл.

### 30 **Пример 4. Культивирование штамма *E.coli* ВКПМ В-11745 в лабораторном ферментере.**

Штамм предварительно выращивали при 37°C в течение ночи на агаризованной среде LB с 100 мг/л ампициллина.

Свежую культуру пересевали с чашек бактериологической петлей в две колбы с 50 мл жидкой среды LB с ампициллином и культивировали на термостатируемом шейкере при  
35 37°C, 300 об/мин в течение не менее 15 часов.

Полученный посевной материал переносили в 3-х литровый ферментер, содержащий 2 л питательной ферментационной среды следующего состава (г/л):

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,0;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  - 13,8; Дрожжевой экстракт - 50;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,25; pH - 6,8-7,2, ампициллин - 100 мг/л. Условия культивирования: температура 30°C, аэрация - 2л/мин, перемешивание - 600 об/мин, pH 7.8. Система автоматического поддержания pH осуществляет дозировку раствора уксусной кислоты. Время культивирования 15-18 часов.

5 Оптическая плотность культуральной жидкости на сливе 30,0 ед. ОП. Удельная аспартазная активность 2400 Ед.акт./ед. ОП. Общая аспартазная активность - 72000 Ед.акт./мл. Клетки отделяли центрифугированием и промывали физиологическим раствором. Количество собранных влажных клеток в виде пасты составило 171 г.

#### 10 **Пример 5. Получение иммобилизованных клеток.**

Биомассу клеток штамма *E. coli* В-11745 из примера 4 в количестве 10 г помещали в стеклянный стакан, в который предварительно вносили 11 г 1% раствора хлористого натрия и перемешивали. Затем, продолжая перемешивание, добавляли 5 г 20%-ного раствора гомополимера полиэтиленимина (Polymin-P, BASF), предварительно  
15 нейтрализованного соляной кислотой до pH 7,5 и далее, продолжая перемешивание, добавляли 3 г 25% раствора глутарового альдегида (Panreac). Смесь начинала быстро отверждаться. Ее оставляли на 30 минут для завершения протекающих реакций, после чего измельчали и подсушивали до остаточной влажности 65-75%. Полученные  
20 иммобилизованные клетки просеивали через сито, оставляя фракцию 0,5-1,5 мм, которую помещали в 20%-ный раствор ацетата аммония и оставляли не менее, чем на 24 часа при температуре 5°C.

Полученный биокатализатор имел удельную активность 180900 ед./г влажного биокатализатора.

#### 25 **Пример 6. Непрерывная биотрансформация фумарата аммония иммобилизованными клетками.**

Биокатализатором, полученным по примеру 5, в количестве 5 г (по влажному весу) заполняли стеклянную колонку с рубашкой (1X12,7 см, 10 мл). В рубашку подавали теплоноситель с температурой 25°C. Перистальтическим насосом прокачивали через слой  
30 биокатализатора раствор фумарат аммония, с концентрацией 200 г/л (по фумаровой кислоте), pH 8,5 и с добавлением 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ . Скорость подачи раствора 50 мл/час. Раствор, выходящий из колонки, содержал менее 1,5 г/л фумарата аммония (в расчете на фумаровую кислоту), что соответствует конверсии более 99%. Степень конверсии оставалась более 99% в продолжение непрерывного процесса биотрансформации  
35 фумарата аммония в течение трех месяцев и более.

**Пример 7. Получение L-аспарагиновой кислоты из реакционных растворов после биотрансформации.**

В 2-х литровую колбу с обратным холодильником вносили 1600 мл реакционного раствора после биотрансформации по примеру 6. Колбу помещали на магнитную мешалку с нагревом и раствор нагревали при перемешивании до 90-98°C. Не прекращая перемешивание, в колбу вносили 150 г кристаллической фумаровой кислоты. Нагрев и поддержание температуры в пределах 90-95 °С продолжали еще 30 минут. Затем отключали нагрев и продолжали перемешивать суспензию выпадающих кристаллов аспарагиновой кислоты. Раствор охлаждали до 25°C, выдерживали при этой температуре 30 минут и кристаллы отделяли фильтрацией. Кристаллы промывали на фильтре обессоленной водой и сушили при 80°C. Было получено 269,8 г кристаллической L-аспарагиновой кислоты. Удельный угол вращения в 5 н HCl:  $[\alpha]_{D20}=+24,9$ . Примесь фумаровой кислоты 0,34%. Маточник и промывные воды упаривали под вакуумом до объема 1,3 л. К полученному концентрату добавляли 90 г фумаровой кислоты, 25%-ный водный аммиак до значения pH раствора 8,5 и обессоленную воду до объема 1,6 л. Полученный раствор вновь направляли на биотрансформацию.

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 и малодоступных компонентов для иммобилизации клеток.

Таким образом, предлагаемый способ получения L-аспарагиновой кислоты позволяет обеспечить высокую аспартазную активность биокатализатора, 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Акционерное общество "Биоамид"

<120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

<130> 000000300

<160> 2

<210> 1

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<400> 1

tttgtataag aaaatgagag gg

22

<210> 2

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<400> 2

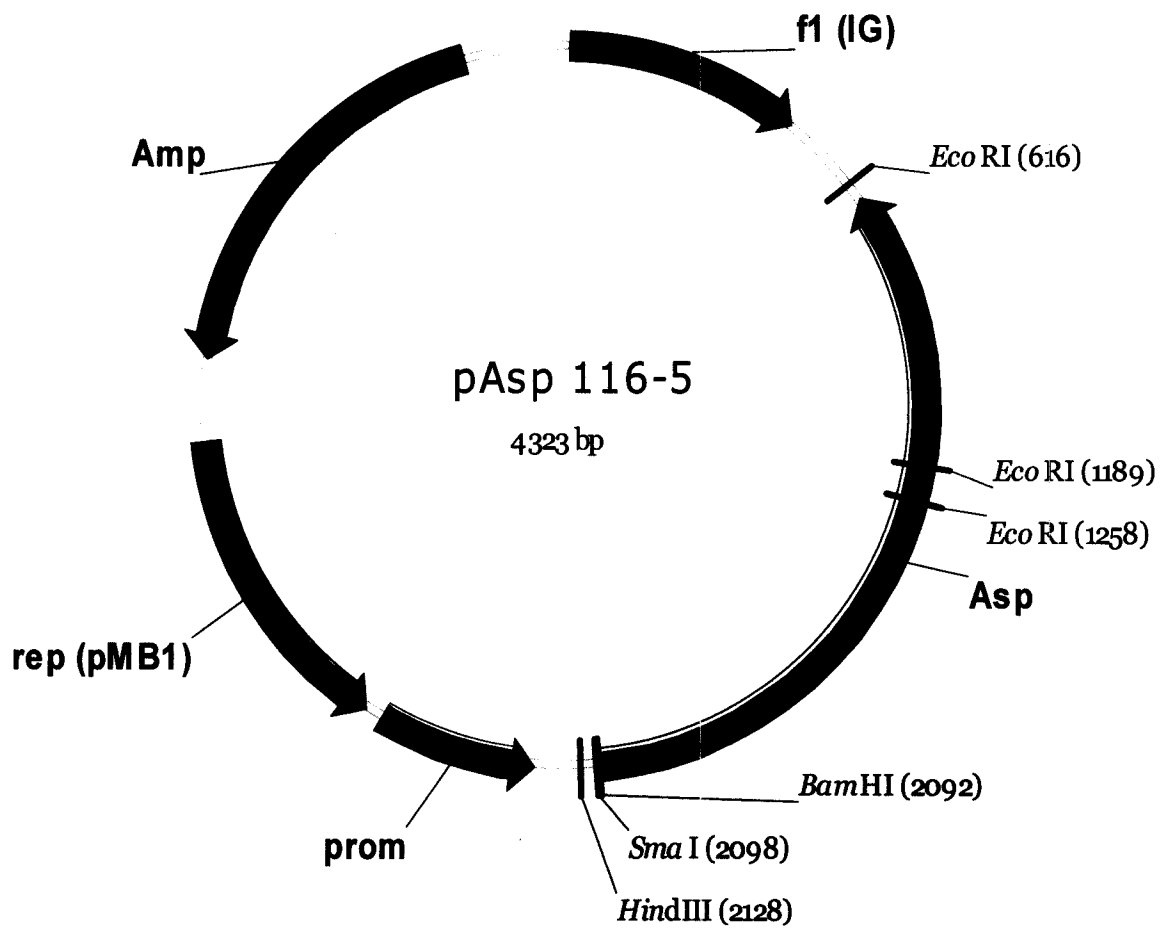
aaaggatcct gtacgattac tgttcgcttt catcagtata gc

42

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, продуцент аспартазы, полученный путем введения в штамм *E. coli* ВКПМ 7188 рекомбинантной плазмиды, содержащей ген *aspA* под контролем лактозного промотора *lacUV5*.  
5
2. Штамм по п.1, депонированный во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под номером ВКПМ В-11745.
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.  
10
4. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве биокатализатора используют свободные или иммобилизованные клетки штамма *E. coli*.
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что иммобилизацию клеток штамма *E. coli* осуществляют в матрице полиэтиленимина, ковалентно сшитой глутаровым альдегидом.  
15
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что весовое соотношение полиэтиленимина и глутарового альдегида составляет от 1:1 до 3:1.
7. Способ по п.5, отличающийся тем, что весовое соотношение компонентов полиэтиленимина и глутарового альдегида к биомассе *E. coli* составляет от 0,25:1 до 3:1.

20



Фиг. 1

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

Номер евразийской заявки:  
201700163

Дата подачи: 28 февраля 2017 (28.02.2017) | Дата испрашиваемого приоритета:

Название изобретения: Способ получения L-аспарагиновой кислоты

Заявитель: АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИОАМИД"

- Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)  
 Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: C12N 1/21 (2006.01)  
C12P 13/20 (2006.01)  
C12R 1/19 (2006.01)

Согласно международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)  
C12N 15/09, 1/21, C12P 13/20, C12R 1/19

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

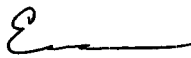
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2546239 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ" (ФГУП "ГОСНИИГЕНЕТИКА")) 10.04.2015, формула, примеры 1-5, с. 3, фиг. 1	1-7
Y	FULLER Forrest. A family of cloning vectors containing the lacUV5 promoter. Gene, 19 (1982) 43-54, реферат	1-7
Y	AKIN Cavit. Biocatalysis with immobilized cells. Biotechnology anf Genetic Engineering Reviews, Vol. 5, Septembers 1987, с. 319-320, 335, 358	5-7

последующие документы указаны в продолжении графы В  данные о патентах-аналогах указаны в приложении

- \* Особые категории ссылочных документов:  
"А" документ, определяющий общий уровень техники  
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета  
"D" документ, приведенный в евразийской заявке  
"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
"&" документ, являющийся патентом-аналогом  
"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 23 июня 2017 (23.06.2017)

Наименование и адрес Международного поискового органа: **Федеральный институт промышленной собственности**  
РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1.  
Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:  Е. Еськина  
Телефон № (495) 531-6481