(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035353 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.01

(21) Номер заявки
201700163

(22) Дата подачи заявки
2017.02.28

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

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ АСПАРТАЗЫ ESCHERICHIA COLI

(43) **2018.08.31**
(96) **2017000013 (RU) 2017.02.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
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)

(56) RU-C1-2546239
FULLER Forrest. A family of cloning vectors containing the lacUV5 promoter. Gene, 19 (1982) 43-54, реферат
AKIN Cavit. Biocatalysis with immobilized cells. Biotechnology anf Genetic Engineering Reviews, Vol. 5, Septembers 1987, с. 319-320, 335, 358

(57) Изобретение относится к биотехнологии и касается способа получения L-аспарагиновой кислоты. Для этого сконструирован рекомбинантный штамм Escherichia coli ВКПМ B-11745, 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 на основе клеток рекомбинантного штамма E. coli ВКПМ B-11745 и выделении 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.

035353 B1

035353 B1

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 (SU 659611). В указанном изобретении использован природный штамм. Основной недостаток данного способа - низкая активность аспартазы. В изобретении по патенту EP 0110422 использованы мутантные штаммы. Основные недостатки данного способа - это высокий уровень побочной активности фумаратгидратазы и невысокая активность аспартазы. По роду Serratia (EP 0111293) был получен рекомбинантный штамм. Основные недостатки данного способа - отсутствие селектирующего фактора при культивировании штамма и быстрая утеря плазмиды. Что касается родов Pseudomonas, Bacillus, Brevibacterium и др. (EP 0752476), основные недостатки способа - трудоемкость, многостадийность и невысокая целевая активность.

Известен способ получения L-аспарагиновой кислоты с использованием природного штамма Escherichia coli (ВКПМ B-7188) (RU 2174558). Однако данный способ является недостаточно эффективным из-за низкой аспартазной активности штамма.

Известен способ получения аспарагиновой кислоты, описанный в патенте US 4692409. 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 селектирующего 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 (US 4436813). 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 полиэтиленимина (US 4504582). Недостатком данного способа является низкая эффективность получаемого биокатализатора.

Наиболее близким к заявленному способу является способ получения L-аспарагиновой кислоты, описанный в патенте US 6214589. 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;

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

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 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.

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.

В результате осуществления изобретения достигаются следующие технические результаты:

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

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

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

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

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;

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;

разработан способ непрерывной биотрансформации фумарата аммония иммобилизованными клетками.

Описание рисунков

На рисунке - схема плазмиды pAsp 116-5.

На рисунке: Amp - ген устойчивости к ампициллину, rep (pMB1) - репликон, f1 (IG) - фрагмент ДНК профага f1, Asp - ген L-аспартат аммоний лиазы, prom - промоторная область LacUV5.

Подробное описание изобретения

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.

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.

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.

При осуществлении изобретения штамм может быть в 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.; US 4504582). 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 широ-

кие 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 B-11745, сохраняющих основные мутации и генно-инженерные модификации, обеспечивающие высокую продукцию фермента аспартазы. Рекомбинантный штамм E. coli ВКПМ B-11745 конструируется путем трансформации штамма E. coli ВКПМ B-7188 плазмидой pAsp 116-5. Выбор в качестве реципиента при конструировании заявляемого штамма именно штамма E. coli ВКПМ B-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 B-7188 получается из дикого штамма посредством обработки мутагеном (нитрозогуанидином), с последующим отбором мутантов на аналоге глюкозы альфа-метил-D-глюкопиранозид (RU2174558).

Плазмида pAsp 116-5 получается на основе вектора pUC19 и содержит ген L-аспартат-аммоний лиазы из E. coli B-7188 под лактозным промотором lacUV5 и ген устойчивости к антибиотикам пенициллинового ряда. Схема плазмиды представлена на рисунке, где Amp - ген устойчивости к ампициллину, rep (pMB1) - репликон, f1 (IG) - фрагмент ДНК профага f1, Asp - ген L-аспартат аммоний лиазы, prom - промоторная область LacUV5.

Штамм E.coli ВКПМ B-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 0,4-0,8×1-3 мкм. Клетки хорошо растут на простых богатых питательных средах. Колонии на мясопептонном агаре (МПА) и среде Лурия-Бертани (LB) - беловатые блестящие, размером 2-3 мм, края ровные, спор не образуют.

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

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 ЮЖ (культуральной жидкости)	53860±5200	47920±4300

Полученный штамм E. coli 7188 (pAsp116-5) депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный номер ВКПМ B-11745. Данный штамм при выращивании на ферментационной среде в ферментере способен продуцировать L-аспартат-аммоний лиазу в количестве не менее 40000 ед/мл.

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 1 ч при 30°С. Количество образовавшейся аспарагиновой кислоты определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). За единицу активности принято образование одного микромоля аспарагиновой кислоты за 1 ч. Оптическую плотность клеточной суспензии определяли при длине волны 540 нм и оптическом пути 5 мм.

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 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%, отсеи-

вали 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 ч.

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/ч 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.

Для реакции амплификации использовали приблизительно 100 нмолей 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.).

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 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 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.

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., 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. 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 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.

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

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

ампициллина.

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

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 ч до $ОП_{600}$ ~ 0,6-0,8. Полученный посевной материал пересевали в колбы со 100 мл жидкой ферментационной среды следующего состава (г/л): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 15,0; KH_2PO_4 - 2,0; CH_3COONa - 7; дрожжевой экстракт - 20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25; pH - 6,5-7,0, с ампициллином - 100 мг/л. Культивировали на термостатируемом шейкере при 37°C, 300 об/мин, в течение не менее 2 ч до $ОП_{600}$ ~ 0,6-0,8. После этого снижали температуру культивирования до 30°C и культивировали еще не менее 7 ч до достижения максимальной активности культуры. При культивировании штамма E.coli ВКПМ B-11745 продукция аспартазы составляла не менее 10000 ед/мл.

Пример 4. Культивирование штамма E.coli ВКПМ B-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 37°C, 300 об/мин в течение не менее 15 ч.

Полученный посевной материал переносили в трехлитровый ферментер, содержащий 2 л питательной ферментационной среды следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 2,0; CH_3COONa - 13,8; дрожжевой экстракт - 50; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25; pH - 6,8-7,2, ампициллин - 100 мг/л. Условия культивирования: температура 30°C, аэрация - 2 л/мин, перемешивание - 600 об/мин, pH 7.8. Система автоматического поддержания pH осуществляет дозировку раствора уксусной кислоты. Время культивирования 15-18 ч. 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.

Пример 5. Получение иммобилизованных клеток.

Биомассу клеток штамма E.coli B-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 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 мин для завершения протекающих реакций, после чего измельчали и подсушивали до остаточной влажности 65-75%. Полученные иммобилизованные клетки просеивали через сито, оставляя фракцию 0,5-1,5 мм, которую помещали в 20%-й раствор ацетата аммония и оставляли не менее, чем на 24 ч при температуре 5°C.

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

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 (1×12,7 см, 10 мл). В рубашку подавали теплоноситель с температурой 25°C. Перистальтическим насосом прокачивали через слой биокатализатора раствор фумарат аммония, с концентрацией 200 г/л (по фумаровой кислоте), pH 8,5 и с добавлением 1 мМ $MgSO_4$. Скорость подачи раствора 50 мл/ч. 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 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°C продолжали еще 30 мин. Затем отключали нагрев и продолжали перемешивать суспензию выпадающих кристаллов аспарагиновой кислоты. Раствор охлаждали до 25°C, выдерживали при этой температуре 30 мин 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%-й 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, предлагаемой 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.

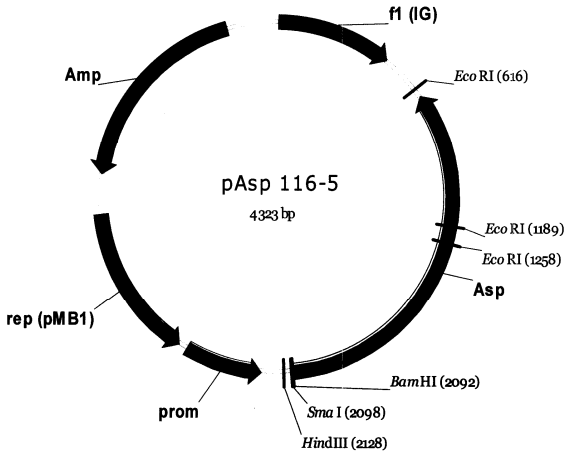
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный штамм Escherichia coli ВКПМ B-11745, продуцент аспартазы, полученный путем введения в штамм E. coli ВКПМ 7188 рекомбинантной плазмиды, содержащей ген aspA под контролем лактозного промотора lacUV5.

2. Способ получения L-аспарагиновой кислоты путем биотрансформации фумарата аммония с помощью биокатализатора на основе клеток E. coli по п.1.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что в качестве биокатализатора используют свободные или иммобилизованные клетки штамма E. coli.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что иммобилизацию клеток штамма E. coli осуществляют в матрице полиэтиленимина, ковалентно сшитой глутаровым альдегидом.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что весовое соотношение полиэтиленимина и глутарового альдегида составляет от 1:1 до 3:1.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что весовое соотношение суммы компонентов полиэтиленимина и глутарового альдегида к биомассе E. coli составляет от 0,25:1 до 3:1.