

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291918 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.30

(51) Int. Cl. C12P 7/40 (2006.01)
C12P 13/10 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.14

(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГУАНИДИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

(31) 19218204.6

(32) 2019.12.19

(33) EP

(86) PCT/EP2020/085882

(87) WO 2021/122400 2021.06.24

(71) Заявитель:
ЭВОНИК ОПЕРЕЙШЕНС ГМБХ
(DE)

(72) Изобретатель:
Шнайдер Франк, Янкович Франк
(DE)

(74) Представитель:
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к микроорганизмам, трансформированным для способности продуцировать гуанидиноуксусную кислоту (GAA) за счет повышенной экспрессии L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, карбамоилфосфатсинтазы и argF, argG и argH аргининового оперона, и к способу ферментативного получения GAA с применением такого микроорганизма. Настоящее изобретение также относится к способу ферментативного получения креатина.

A1

202291918

202291918

A1

СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГУАНИДИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Настоящее изобретение относится к микроорганизму, трансформированному так, чтобы он был способен продуцировать гуанидиноуксусную 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 (WO2005120246 A1/ US2011257075 A1). GAA представляет собой естественный предшественник креатина (например, Humm et al., Biochem. J. (1997) 322, 771-776). Следовательно, добавка GAA обеспечивает оптимальное поступление креатина в организм.

Настоящее изобретение относится к способу получения GAA посредством ферментативного способа с применением промышленного сырья (например, аммиака, аммониевых солей и субстратов, содержащих глюкозу или сахар) в качестве исходного материала. В биологических системах GAA и 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 (US 20060200870 A1):



Guthmiller et al. (J Biol Chem. 1994 Jul 1;269(26):17556-60) характеризовали AGAT почки крысы путем клонирования и гетерологичной экспрессии фермента в *E. coli*. Muenchhoff et al. (FEBS Journal 277 (2010) 3844–3860) сообщают о первой характеристике 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) объяснили путь биосинтеза для псевдоуридимина в *Streptomyces* sp. Они описывают в качестве промежуточной реакции образование GAA и L-орнитина посредством реакции L-аргинина с глицином, катализированной с помощью PumN, L-аргинин:глицинамидинотрансфераза (AGAT). Humm et al. экспрессировали рекомбинантный ген, кодирующий AGAT человека в *Escherichia coli*, и идентифицировали цистеин-407 в качестве остатка активного сайта AGAT (Biochem. J. (1997) 322, 771-776).

Mijts et al. (WO 2018079687 A1) раскрывают в контексте получения целевых веществ в микроорганизмах, например, ванилина или ванилиновой кислоты, что креатин можно получать из L-аргинина и глицина. Авторы дополнительно предполагают, что можно достичь этого посредством применения ферментов биосинтеза L-аргинина, ферментов биосинтеза глицина и ферментов, которые катализируют превращение L-аргинина и глицина в креатин. L-аргинин и глицин можно комбинировать для образования гуанидинацетата (GAA) и орнитина посредством действия AGAT (EC 2.1.4.1) и что GAA можно метилировать для образования креатина посредством действия гуанидинацетат-N-метилтрансферазы (GAMT, EC 2.1. 1.2), с применением S-аденозилметионина (SAM) в качестве донора метильной группы. Авторы упоминают в контексте получения полиаминов, что примерами ферментов биосинтеза L-аргинина могут также включать хорошо известные ферменты биосинтеза L-орнитина, а также ферменты, которые хорошо известны из так называемого L-орнитинового цикла, т. е. карбамоилфосфатсинтаза (*carAB*), орнитинкарбамоилтрансфераза (*argH*, *argI*), аргининосукцинатсинтаза (*argG*), аргининосукцинатлиаза (*argH*) (см. Marc et al., Eur. J. Biochem. 267, 5217-5226, 200).

Однако из литературы также известно несколько более конкретных подходов для увеличения получения одного из исходных материалов в синтезе GAA, т. е. L-аргинина, в микроорганизмах, в частности бактериях. Обзор конструирования пути обмена веществ *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 и Yoshida 1974, US3849250 A), и поэтапное рациональное конструирование пути обмена веществ на основе общесистемного анализа результатов метаболизма в 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, контролирующий 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 получения аргинина. Среди прочего, они предложили делецию репрессорного гена *argR*.

Kurahashi et al. (EP1057893 A1) сообщают о способах повышения способности микроорганизма продуцировать L-аргинин путем усиления ферментов биосинтеза L-аргинина с применением технологий рекомбинантных ДНК, например, путем применения микроорганизма, относящегося к роду *Corynebacterium* или *Brevibacterium*, который создан для содержания рекомбинантной ДНК, содержащей векторную ДНК и фрагмент ДНК, содержащий гены ацетилорнитиндеацетилазы, N-ацетилглутаминовой кислоты-γ-полуальдегид дегидрогеназы, N-ацетилглутамокиназы и аргининосукциназы, полученных из микроорганизма, относящегося к роду *Escherichia*. Для улучшенного получения L-аргинина авторы дополнительно предлагают микроорганизм, у которого усилена активность внутриклеточной глутаматдегидрогеназы (GDH) и который характеризуется способностью продуцировать L-аргинин.

О способе применения генетически рекомбинантного штамма, где ген, который подавляет экспрессию биосинтезирующего аргинин оперона, *argR*, был инактивирован, сообщали Suga et al. (US7160705 B2). В частности, делеция в *argR*, который контролирует аргининовый оперон, рассматривалась как важный фактор в получении аргинина.

У микроорганизма рода *Corynebacterium* ген *argCJBDFR*, который участвует в биосинтезе аргинина, состоит в форме оперона и подвергается ингибированию конечным продуктом посредством внутриклеточного аргинина (Sakanyan et al., Microbiology, 142:9-108, 1996), таким образом вводя ограничение на его получение L-аргинина с высоким выходом.

Однако Bae et al. (EP3153573 A1) в попытке увеличить выход L-аргинина в *C. glutamicum*, обнаружили, что L-аргинин можно получать в более высоком выходе по сравнению с родительским штаммом, продуцирующим L-аргинин, путем усиления активности аргининового оперона и орнитинкарбамоилтрансферазы (ArgF, ArgF2) без какой-либо делеции в репрессоре аргинина (*argR*).

Аргининовый оперон представляет собой оперон, состоящий из генов, кодирующих ферменты, участвующие в механизме биосинтеза L-аргинина, и, в частности, аргининовый оперон состоит из генов, кодирующих ферменты, составляющие циклические стадии биосинтеза L-аргинина. В частности, аргининовый оперон состоит из N-ацетилглутамилфосфатредуктазы (ArgC), глутамат-N-ацетилтрансферазы (ArgJ), N-ацетилглутаматкиназы (ArgB), ацетилорнитинаминотрансферазы (ArgD), орнитинкарбамоилтрансферазы (ArgF) и репрессора аргинина (ArgR). Данные ферменты участвуют в непрерывных ферментативных реакциях биосинтеза L-аргинина и контролируются посредством репрессора аргинина, кодируемого *argR* (WO 2006/057450 A1).

Fan Wenchao раскрывает способ получения креатина путем ферментации непатогенных микроорганизмов, таких как *Corynebacterium 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 N-ацетил-L-глутаминовый полуальдегид; превращение N-ацетил-L-глутаминового полуальдегида 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 гуанидиноуксусную кислоту и наконец превращение гуанидиноуксусной кислоты в креатин. Fan Wenchao предлагает, что микроорганизм сверхэкспрессирует один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из N-ацетилглутаматсинтазы, N-ацетилорнитин- δ -аминотрансферазы, N-ацетилорнитазы, орнитинкарбамоилтрансферазы, аргининосукцинатсинтетазы, глицинамидинотрансферазы (EC: 2.1.4.1) и гуанидинацетат-N-метилтрансферазы (EC: 2.1.1.2). Микроорганизм сверхэкспрессирует предпочтительно глицинаминотрансферазу (L-аргинин:глицинамидинотрансферазу) и гуанидинацетат-N-метилтрансферазу.

До настоящего времени сообщалось о микроорганизмах, подходящих для увеличенного получения GAA по сравнению с их формами дикого типа, и соответственном способе получения GAA с применением таких микроорганизмов.

Следовательно, проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, представляет собой микроорганизм, трансформированный для способности продуцировать гуанидиноуксусную кислоту (GAA), и к способу ферментативного получения GAA с применением такого микроорганизма.

Проблема решается с помощью микроорганизма, характеризующегося повышенной активностью фермента, обладающего функцией карбамоилфосфатсинтазы (EC 6.3.4.16), по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа, и содержащего по меньшей мере один гетерологичный ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT).

Гетерологичный ген означает, что ген вставляли в организм-хозяин, который естественным образом 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. Таким образом, микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением является рекомбинантным.

Повышенная активность фермента, обладающего функцией карбамоилфосфатсинтазы, может достигаться за счет мутации и/или сверхэкспрессии гена, кодирующего фермент, обладающий функцией карбамоилфосфатсинтазы.

Активность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы может также быть повышена за счет мутации и/или сверхэкспрессии гена, кодирующего L-аргинин:глицинамидинотрансферазу.

Белки, обладающие функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT), относятся к семейству амидинотрансфераз. Семейство амидинотрансфераз включает глицин-амидинотрансферазу (EC:2.1.4.1) и инозамин-амидинотрансферазу (EC:2.1.4.2), ферменты, участвующие в биосинтезе креатина и стрептомицина соответственно. Данное семейство также включает аргининдезимиразу, EC:3.5.3.6. Данные ферменты катализируют реакцию: $\text{аргинин} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{цитруллин} + \text{NH}_3$. Также в этом семействе обнаружен противоопухолевый гликопротеин 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). Конкретные примеры

AGAT представляют собой таковые из *Moorea producens*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Galeopterus variegatus* и из *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением идеально характеризуется улучшенной способностью продуцировать L-аргинин по сравнению со способностью микроорганизма дикого типа. Данное свойство можно достичь путем отбора микроорганизмов, которые являются естественными продуцентами L-аргинина или могут приобретать способность продуцировать L-аргинин за счет мутации.

Микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением и обладающий улучшенной способностью продуцировать L-аргинин по сравнению со способностью микроорганизма дикого типа, может характеризоваться повышенной активностью фермента, обладающего функцией аргининосукцинатлиазы (Е.С. 4.3.2.1) 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 ферментативных активностей может быть стабилизацией мРНК, кодирующей ферменты.

Повышенные активности указанных выше ферментов могут также достигаться за счет сверхэкспрессии геном, кодирующих соответствующие ферменты.

Другими словами, проблема предпочтительно решается с помощью микроорганизма, обладающего улучшенной способностью продуцировать L-аргинин по сравнению со способностью организма дикого типа и/или обладающего по меньшей мере одним или несколькими сверхэкспрессируемыми генами (например, *carA*, *carB*), кодирующими белок, обладающий функцией карбамоилфосфатсинтазы (ЕС 6.3.4.16), и дополнительно содержащий ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT, например, ЕС 2.1.4.1).

Микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно также содержит по меньшей мере один или более сверхэкспрессируемых генов (например, *argF/argF2/argI*), кодирующих белок, обладающий функцией орнитинкарбамоилтрансферазы (ЕС 2.1.3.3), ген (например, *argG*), кодирующий белок, обладающий функцией аргининосукцинатсинтазы (Е.С. 6.3.4.5), и ген (например, *argH*), кодирующий белок, обладающий функцией аргининосукцинатлиазы (Е.С. 4.3.2.1).

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

В контексте настоящего изобретения микроорганизм, обладающий улучшенной 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 одном варианте осуществления микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением аргининовый оперон (*argCJBDFR*) может сверхэкспрессироваться.

В качестве альтернативы у микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением ген *argR*, кодирующий репрессорный белок, отвечающий на аргинин, 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, включающий *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*).

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

Таблица 1. Названия ферментов

Название фермента	Альтернативные названия	Шифр КФ	<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>gdhA</i>	<i>gdh</i>	<i>gdhA/gdhB</i>

Название фермента	Альтернативные названия	Шифр КФ	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>P. putida</i>
		P. putida)			
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	2.1.3.3	argI	argF/argF2	arcB/argF

Название фермента	Альтернативные названия	Шифр КФ	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>P. putida</i>
илтрансфераза	сфераза-1				
Аргининосукцинатсинтетаз	аргининосукцинатсинтаза	6.3.4.5	argG	argG	argG
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

Белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT), в микроорганизме по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% гомологичной, предпочтительно на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% гомологичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2 или с SEQ ID NO: 4 (“AGAT_Mp” *Moorea producens*). В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению аминокислотная последовательность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы является идентичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2 или с SEQ ID NO: 4 (см. база данных UniProt, 15 февраля 2017 г., “глицинаминотрансфераза”, XP055706853, номер доступа EBI UNIPROT: A0A1D8TKD3). Последовательность ДНК дикого типа, кодирующая AGAT *Moorea producens*, представляет собой SEQ ID NO: 1, последовательность соответствующей ДНК, которая является кодон-оптимизированной для *C. glutamicum*, представляет собой SEQ ID NO: 3. Последовательность

соответствующей ДНК для гена AGAT *Moorea producens*, которая является кодон-оптимизированной для *P. putida*, представляет собой SEQ ID NO: 33.

Белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, в микроорганизме по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% гомологичной, предпочтительно на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% гомологичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO:26 (“AGAT_cygA” *Cylindrospermopsis raciborskii* ATW205). В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению аминокислотная последовательность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы является идентичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16 или с SEQ ID NO:26. Последовательность ДНК дикого типа, кодирующая AGAT *Cylindrospermopsis raciborskii*, представляет собой SEQ ID NO: 15, последовательность соответствующей ДНК, которая является кодон-оптимизированной для *C. glutamicum*., представляет собой SEQ ID NO: 25.

Белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, в микроорганизме по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% гомологичной, предпочтительно на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% гомологичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 23 (“AGAT_Gv” *Galeopterus variegatus*), предпочтительно с SEQ ID NO: 24 или с SEQ ID NO:32. В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению аминокислотная последовательность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы является идентичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 24 или с SEQ ID NO:32. Последовательность соответствующей ДНК AGAT *Galeopterus variegatus*, которая является кодон-оптимизированной для *C. glutamicum*., представляет собой SEQ ID NO: 31.

Белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, в микроорганизме по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% гомологичной, предпочтительно на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% гомологичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO:18 (“AGAT_Hs” *homo sapiens*), предпочтительно с SEQ ID NO: 20 или с SEQ ID NO:28, например, аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21, или с SEQ ID NO: 22, или с SEQ ID NO:30 (каждая “AGAT Rn” *Rattus norvegicus*; соответствующая ДНК, кодон-оптимизированная для *C. glutamicum*, представляет собой SEQ ID NO: 29). В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению аминокислотная последовательность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы является идентичной аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18. Последовательность ДНК дикого типа, кодирующая AGAT *Homo sapiens*, представляет собой SEQ ID NO: 17, последовательность соответствующей ДНК, которая является кодон-оптимизированной для *C. glutamicum*, представляет собой SEQ ID NO: 27.

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*).

Как правило, повышенная ферментативная активность у микроорганизмов может достигаться, например, за счет мутации соответствующего эндогенного гена. Ферментативные активности также можно усилить посредством сверхэкспрессии соответствующего гена.

Как правило, сверхэкспрессия гена в соответствии с настоящим изобретением достигается путем повышения количества 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 иницирующего 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 отправную 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 М. Patek et al. (Microbial Biotechnology 6 (2013), 103-117) для *C. glutamicum*.

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 обычно не будет использовать каждый возможный кодон для определенной аминокислоты с одной и той же частотой. Вместо этого организм обычно 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 проблема дополнительно решается с помощью способа ферментативного получения гуанидиноуксусной кислоты (GAA), включающего стадии а) культивирования микроорганизма в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше, в подходящей среде в подходящих условиях и b) накопление GAA в среде с образованием ферментационного бульона, содержащего GAA.

Способ в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно включать добавление глицина, и/или добавление L-аргинина, и/или добавление L-орнитина к среде. Предпочтительно среду дополняют глицином в концентрации в диапазоне от 0,1 до 300 г глицина/л среды, предпочтительно 0,82 г глицина/л среды, и/или L-аргинином для получения концентрации в диапазоне от 0,1 до 200 г L-аргинина/л среды, предпочтительно 1,9 г L-аргинина/л среды.

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 GAA.

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

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 b) накопления креатина в среде с образованием ферментационного бульона, содержащего креатин.

Предпочтительно способ дополнительно включает выделение креатина из ферментационного бульона, содержащего креатин. Креатин можно экстрагировать из ферментационного бульона с помощью способа изoeлектрической 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-тиогалактопиранозид) приобретали у Carl-Roth (Карлсруэ, Германия, № по кат. 2316.4). Если не указано иное, все остальные химические вещества приобретали чистыми 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:

а. 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 Infors 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-термостате INCU-Line® от VWR (Раднор, США).
- c. Бульон с сердечно-мозговым экстрактом (BHI) от Merck (Дармштадт, Германия; № по кат. 110493) применяли для культивирования штаммов *C. 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 (BHI-агар) от Merck (Дармштадт, Германия; № по кат. 113825) использовали для культивирования штаммов *C. 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 *C. glutamicum* после электропорации BHI-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

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

В. Центрифугировали бактериальные суспензии с максимальным объемом, составляющим 50 мл, в реакционных пробирках объемом 15 мл или 50 мл (например, 50 мл конических центрифужных пробирок Falcon™) 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, исправляющей ошибки (высокоточной), применяли для амплификации требуемого сегмента ДНК для секвенирования по Сэнгеру или сборки ДНК. Наборы с полимеразой, не исправляющей ошибки, применяли для определения наличия или отсутствия требуемого фрагмента ДНК непосредственно в колониях *E. coli* или *C. glutamicum*.

а. Набор Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Kit (Phusion Kit) 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 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Kit от New England BioLabs Inc.

Программа ПЦР			
Стадия	Время [мин.:сек.]	T [°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: 35x
5	05:00	72	Стадия конечной элонгации
6	Удержание	4	Стадия охлаждения

б. Таq 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.:сек.]	T [°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: 35х
5	04:00	72	Стадия конечной элонгации
6	Удержание	4	Стадия охлаждения

с. Мастер-микс SapphireAmp® Fast PCR (Sapphire Mix) 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 (Sapphire Mix) от Takara Bio Inc

Программа ПЦР			
Стадия	Время [мин.:сек.]	Т [°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: 30х
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 соответствующим 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), а затем к матрице в реакционной пробирке для ПЦР добавляли реагенты для ПЦР.
- f. Все реакции ПЦР осуществлялись в амплификаторах для ПЦР типа Mastercycler или Mastercycler Nexus Gradient от Eppendorf AG (Гамбург, Германия).

Расщепление ДНК рестрикционными ферментами

Для расщепления рестрикционным ферментом применяли либо „FastDigest restriction endonucleases (FD)“ (ThermoFisher Scientific, Уолтем, США), либо рестрикционными эндонуклеазами 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 (<1000 п. н.) обычно определяли с помощью автоматизированного капиллярного электрофореза с применением QIAxcel от Qiagen (Хильден, Германия).

б. Если фрагменты ДНК необходимо выделить или если фрагменты ДНК составляли >1000 п. н., ДНК разделяли посредством электрофореза в агарозном геле ТАЕ и окрашивали краситель для нуклеиновых кислот GelRed® (Biotium, Inc., Фермон, Канада). Окрашенные ДНК визуализировали при 302 нм.

Очистка ПЦР-амплификатов и рестрикционных фрагментов

ПЦР-амплификаты и рестрикционные фрагменты очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit от Qiagen (Хильден, Германия, № по кат. 28106) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК не 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 от 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*

Трансформация *C. glutamicum* с помощью плазмидной ДНК осуществлялась посредством электропорации с применением „Gene Pulser Xcell“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, Фельдкирхен, Германия), как описано Ruan *et al.* (2015). Электропорацию проводили в 1 мм кюветах для электропорации (Bio-Rad Laboratories GmbH, Фельдкирхен, Германия) при 1,8 кВт, и фиксированную константу времени устанавливают равной 5 мс. Трансформированные клетки отбирали на ВНИ-агаре, 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 Sanger и соавт. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74, 5463–5467, 1977) на анализаторах ДНК 3730xl от Applied Biosystems® (Карлсбад, Калифорния, США). Для визуализации и оценки 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 ВНИ в двукратной концентрации, дополненной 2 г/л глюкозы. Культуры содержащих плазмиды штаммов *E. coli*- и *C. glutamicum* дополняли 25 мг/л канамицина. Среду помещали в колбы Эрленмейера с 3 перегородками объемом 100 мл. В нее инокулировали с помощью петли клетки, отобранные 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 GAA в культивированиях в миллилитровом объеме

Систему культивирования в миллилитровом объеме в соответствии с Duetz (2007) применяли для оценки получения GAA 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. Композиция среды для посева (SM) показана 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_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	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
pH=7,0	

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

Основные культуры начинали путем инокуляции 2,4 мл среды для продуцирования (PM), содержащей лунки 24-луночного планшета WDS с каждым 100 мкл ресуспендированных клеток из предварительных культур. Композиция среды для продуцирования (PM) показана в таблице 6.

Таблица 6. Среда для продуцирования (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
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
Противовспениватель XFO-1501 (Ivanhoe Industries Inc., Сион, США)	0,5
Глюкоза	40
IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид)	0,3 мМ
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 OD600 часть суспензии культуры соответствующим 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. Раствор заполняли водой до общего объема, составляющего 25 мл, тщательно перемешивали и фильтровали с применением 0,2 мкм нейлонового шприцевого фильтра.

Для измерения общего количества аминокислот (свободных аминокислот, связанных в пептиды) образцы получали с помощью растворения 1 г дрожжевого экстракта в 10 мл 6М HCl и инкубации 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 ионнообменной 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 осуществляли 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 постколоночной 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 продуцирования (PM).

Таблица 7. Содержание L-аргинина и глицина в дрожжевом экстракте (YE) FM902 и полученные концентрации в среде для продуцирования (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 г/кг	48,2 г/кг
глицин	6,9 г/кг	30,5 г/кг	10,4 г/кг	45,7 г/кг

Количественное определение GAA

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, 4,6X250 мм, 5 мкм (Waters Corporation, Милфорд, США) при 35°C. Подвижная фаза А представляла

собой воду с 10 mM формиата аммония и 0,2% муравьиной кислоты. Подвижная фаза В представляла собой смесь 90% ацетонитрила и 10% воды, 10 mM формиата аммония добавляли к смеси. Систему 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 GAA значения масса/заряд отслеживали с применением фрагментации MRM [M+H]⁺ + 118–76. Предел количественного определения (LOQ) для GAA фиксировали на уровне 7 ppm.

В) РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Пример 1. Синтез генов, кодирующих L-аргинин:глицинамидинотрансферазы (AGAT, EC 2.1.4.1) из различных микроорганизмов

Moorea producens представляет собой нитевидную цианобактерию. Геном штамма *Moorea producens* PAL-8-15-08-1 был опубликован Leao et al. (Leao T, Castela 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 CP017599.1). Он содержит открытую рамку считывания, предположительно кодирующую L-аргинин:глицинамидинотрансферазу (AGAT, EC 2.1.4.1, номер доступа BJP34_00300, SEQ ID NO:1). SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO: 4 демонстрируют полученную аминокислотную последовательность (номер доступа WP_070390602), которую обозначали как AGAT_Mp.

Ген *cyrA* из AWT205 *Cylindrospermopsis raciborskii* (номер доступа EU140798.1) кодирует L-аргинин:глицинамидинотрансферазу (Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J, Barrow KD, Neilan BA (2008) “Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis.”, Appl Environ Microbiol., 74(3):716-22, doi: 10.1128/AEM.01988-07; SEQ ID NO:15). SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:26 демонстрируют полученную аминокислотную последовательность (номер доступа ABX60160), которую обозначали как AGAT_cyrA.

Последовательность кДНК L-аргинин:глицинамидинотрансферазы человека описывали Humm *et al.*, 1994 (Humm A, Huber R, Mann K (1994) „The amino acid sequences of human and pig l-arginine:glycine amidinotransferase.”, FEBS Letters, Vol. 339 (1–2), 101-107, DOI: 10.1016/0014-5793(94)80394-3; номер доступа NM_001482.3, SEQ ID NO:17). Полученные аминокислотные последовательности (номер доступа NP_001473.1, SEQ ID NO:18) начинаются с митохондриального транзитного пептида (аминокислоты 1-37), который отсутствует в зрелом ферменте. Было обнаружено, что укороченный фермент, начинающийся с аминокислоты 56, является активным при экспрессии в *E. coli* (Humm A, Fritsche E, Mann K, Göhl M, Huber R (1997) “Recombinant expression and isolation of human L-arginine : glycine amidinotransferase and identification of its active-site cysteine residue.” Biochem. J. 322, 771-776, DOI: 10.1042/bj3220771). Было продемонстрировано, что N-концевое слияние 7 маркера аминокислоты (SEQ ID NO:19) улучшает экспрессию белка в *E. coli* (Hansted JG, Pietikäinen L, Hög F, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK (2011) “Expressivity tag: A novel tool for increased expression in Escherichia coli.” Journal of Biotechnology 155 (2011) 275– 283, DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.07.013). Соответственно, разрабатывали слитый белок, состоящий из маркера и укороченной AGAT и его обозначали как AGAT_Hs (SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:28).

Аминокислотная последовательность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы от *Rattus norvegicus* (номер доступа NP_112293.1, SEQ ID NO:21) является крайне сходной с ферментом человека. Как описано для фермента человека, последовательность применяли для разработки слитого белка, состоящего из N-концевого маркера экспрессии и укороченной последовательности фермента. Полученный слитый белок обозначали как AGAT_Rn (SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:30).

Зондский летающий лемур *Galeopterus variegatus* обладает предсказанной L-аргинин:глицинамидинотрансферазой (номер доступа NP_112293.1, , SEQ ID NO:23). Как описано для фермента человека, его аминокислотную последовательность применяли для разработки слитого белка, состоящего из N-

концевого маркера экспрессии и укороченной последовательности фермента. Полученный слитый белок обозначали как AGAT_Rn (SEQ ID NO:24 и SEQ ID NO:32).

С применением инструмента программного обеспечения „GeneOptimizer“ (Geneart/ ThermoFisher Scientific, Уолтем, США) аминокислотные последовательности AGAT_Mp, AGAT_cyrA, AGAT_Hs, AGAT_Rn и AGAT_Gv восстанавливали до последовательностей ДНК и оптимизировали для частоты использования кодона *C. glutamicum*. Их концы расширяли последовательностями для клонирования сборки и последовательности Шайна-Дальгарно добавляли выше открытых рамок считывания. Полученные последовательности ДНК представляли собой SEQ ID NO:3 (кодирующая AGAT_Mp), SEQ ID NO:25 (кодирующая AGAT_cyrA), SEQ ID NO:27 (кодирующая AGAT_Hs), SEQ ID NO:29 (кодирующая AGAT_Rn) и SEQ ID NO:31 (кодирующая AGAT_Gv). Их заказывали для синтеза генов от Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Синтетические гены доставляли в качестве частей клонирующих плазмид, которые обозначались как pMA-T_AGAT_Mp, pMA-T_AGAT_cyrA, pMA-T_AGAT_Hs, pMA-T_AGAT_Rn и pMA-T_AGAT_Gv.

Пример 2. Клонирование AGAT_Mp в плазмиде для экспрессии pEC-XK99E

Шаттл-плазмиду *E. coli*-*C. glutamicum* pEC-XK99E 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).

Клонирующую плазмиду pMA-T_AGAT_Mp расщепляли с помощью MluI + AatII и полученные фрагменты затупляли 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 линейаризованную 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 2.1. Клонирование AGAT_Mp и AGAT_cyrA в плазмиде для экспрессии pEKEx2

Шаттл-плазмиду *E. coli*-*C. glutamicum* pEKEx2 (Eikmanns, 1991) расщепляли с применением рестрикционной эндонуклеазы PstI. Полученные фрагменты затупляли с применением „Fast DNA End Repair Kit“ (Thermo Fisher Scientific) и терминальные фосфаты удаляли с помощью „FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Затем ДНК очищали с помощью „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Клонировующие плазмиды pMA-T_AGAT_Mp и pMA-T_AGAT_cyrA расщепляли с помощью MluI + AatII и полученные фрагменты затупляли 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 полосы, соответствующие AGAT_Mp (1174 п. о.) и AGAT_cyrA (1204 п. о.), вырезали. ДНК очищали с применением „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Каждый фрагмент AGAT лигировали с помощью линейаризованного pEKEx2 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 называли pEKEx2_AGAT_Mp и pEKEx2_AGAT_cytA.

Пример 2.2. Клонирование AGAT_Hs, AGAT_Rn и AGAT_Gv в плазмиде для экспрессии pEKEx2

Клонирующие плазмиды pMA-T_AGAT_Hs, pMA-T_AGAT_Rn и pMA-T_AGAT_Gv расщепляли с помощью Eco31I и продукты очищали с применением „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Шаттл-плазмиды *E. coli*-*C. glutamicum* pEKEx2 (Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H (1991) „A family of Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing.“, Gene. 1991 Jun 15;102(1):93-8) расщепляли с применением рестрикционных эндонуклеаз SbfI и BamHI. ДНК очищали с помощью „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия).

Каждый из фрагментов AGAT был собран с расщепленной pEKEx2 с применением “NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit” (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. E5520). Продукты сборки 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 обозначали как pEKEx2_AGAT_Hs, pEKEx2_AGAT_Rn и pEKEx2_AGAT_Gv соответственно.

Пример 3. Клонирование гена *argF* в плазмиде pCR-Blunt II-TOPO

Ген *argF* амплифицировали с помощью ПЦР с помощью набора Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США) с

применением геномной ДНК ATCC13032 *C. glutamicum* и праймера-олигонуклеотида argF_1.p (SEQ ID NO:5) и argF_2.p (SEQ ID NO:6).

Полученный продукт ПЦР клонировали в плазмиде pCR-Blunt II-TOPO (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, Уолтем, США) и надлежащий плазмидный клон идентифицировали с помощью расщепления рестрикционным ферментом и секвенирования ДНК. Данную плазмиду называли pCRII-argF.

Пример 4. Клонирование генов *argG* и *argH* в плазмиде pCR-Blunt II-TOPO

Гены *argG* и *argH* амплифицировали с помощью ПЦР с помощью набора Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США) с применением геномной ДНК ATCC13032 *C. glutamicum* и праймера-олигонуклеотида argG_1.p (SEQ ID NO:7) и argH_2.p (SEQ ID NO:8).

Полученный продукт ПЦР клонировали в плазмиде pCR-Blunt II-TOPO (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, Уолтем, США) и надлежащий плазмидный клон идентифицировали с помощью расщепления рестрикционным ферментом и секвенирования ДНК. Плазмиду называли pCRII-argGH.

Пример 5. Клонирование генов *argG* и *argH* в плазмиде pCRII-argF

pCRII-argGH вырезали с применением HpaI + AvrII и рестрикционный фрагмент из 2773 п. н. выделяли из агарозного геля. pCRII-argF вырезали с применением SspI + AvrII и рестрикционный фрагмент из 4526 п. н. выделяли из агарозного геля. Оба фрагмента лигировали и затем трансформировали в *E. coli*.

Надлежащие плазмидные клоны идентифицировали с помощью расщепления рестрикционным ферментом и секвенирования ДНК. Полученную плазмиду называли pCRII-argFGH.

Пример 6. Клонирование генов *argF*, *argG* и *argH* в плазмиду для экспрессии pEC-ХК99Е

pCRII-argFGH вырезали с применением HpaI + AvrII и рестрикционный фрагмент из 2773 п. н. выделяли из агарозного геля. Плазмиду pEC-ХК99Е вырезали с применением Ecl136II + XbaI. Рестрикционный фрагмент из

6999 п. н. выделяли из агарозного геля. Оба фрагмента лигировали и затем трансформировали в *E. coli*. Надлежащие плазмидные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного расщепления и секвенирования ДНК. Полученная плазмида pEC-XK99E_argFGH содержит гены *argF*, *argG* и *argH* из *C. glutamicum*.

Пример 7. Клонирование генов *argF*, *argG* и *argH* в плазмиду для экспрессии pEC-XK99E_AGAT_Mp

pCRII-argFGH вырезали с применением XbaI + SpeI и рестрикционный фрагмент из 3868 п. н. выделяли из агарозного геля. Плазмиду pEC-XK99E_AGAT_Mp вырезали с применением XbaI. Рестрикционный фрагмент из 8188 п. н. выделяли из агарозного геля. Оба фрагмента лигировали и затем трансформировали в *E. coli*. Надлежащие плазмидные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного расщепления и секвенирования ДНК. Полученная плазмида pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH содержит гены *argF*, *argG* и *argH* из *C. glutamicum* в комбинации с AGAT_Mp.

Пример 8. Клонирование генов *argF* в плазмиду для экспрессии pEC-XK99E_AGAT_Mp

pCRII-argF вырезали с применением KpnI + XbaI + AseI и ДНК очищали с помощью „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия). Плазмиду pEC-XK99E_AGAT_Mp вырезали с применением KpnI + XbaI и ДНК очищали с помощью „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия). Оба элюата перемешивали, фрагменты ДНК лигировали и продукт применяли для трансформации *E. coli*. Надлежащие плазмидные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного расщепления и секвенирования ДНК. Полученная плазмида pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF содержит ген *argF* из *C. glutamicum* в комбинации с AGAT_Mp.

Пример 9. Клонирование гена *argG* в плазмиду для экспрессии pEC-XK99E_AGAT_Mp

pCRII-argGH вырезали с применением XbaI + SalI и рестрикционный фрагмент из 1798 п. н. выделяли из агарозного геля. Плазмиду pEC-XK99E_AGAT_Mp вырезали с применением XbaI + SalI и ДНК очищали с помощью „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen GmbH, Хильден, Германия). Фрагменты ДНК лигировали и продукт применяли для трансформации *E. coli*. Надлежащие плазмидные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного расщепления и секвенирования ДНК. Полученная плазида pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG содержит ген *argG* из *C. glutamicum* в комбинации с AGAT_Mp.

Пример 10. Хромосомная вставка *sod*-промотора выше оперона *carAB* в ATCC13032

Ферментативная активность карбамоилфосфатсинтетазы была повышена посредством геномной вставки сильного *sod*-промотора выше оперона *carAB* в ATCC13032. Следовательно, плазмиду pK18mobsacB_Psod-carAB конструировали следующим образом. Плазмиду pK18mobsacB вырезали с применением EcoRI + HindIII и линейаризованную векторную ДНК (5670 п. н.) вырезали из агарозного геля. ДНК экстрагировали с применением „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN GmbH, Хильден, Германия).

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

PsodcarAB-LA-F (SEQ ID NO:9) + PsodcarAB-LA-R (SEQ ID NO:10)
= левое гомологичное плечо (1025 п. н.)

PsodcarAB-F (SEQ ID NO:11) + PsodcarAB-R (SEQ ID NO:12)
= *sod*-промотор (250 п. н.)

PsodcarAB-RA-F SEQ ID NO:13) + PsodcarAB-RA-R (SEQ ID NO:14)
= правое гомологичное плечо (944 п. н.)

ДНК продукта 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). Надлежащие плазмидные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного расщепления и секвенирования ДНК.

pK18mobsacB_Psod-carAB применяли для интеграции сильного *sod*-промотора выше генов *carAB* в геном ATCC13032 *C. glutamicum*. Плазмиду трансформировали в ATCC13032 посредством электропорации. Хромосомную интеграцию (являющуюся результатом первого события рекомбинации) выбирали 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, соответствующим образом разбавляли и высевали (обычно 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.

Таблица 8. Перечень штаммов

Штамм	Комментарий
<i>Escherichia coli</i>	
NEB® Stable	Коммерчески доступный штамм для клонирования (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США)
MG1655	Эталонный штамм <i>E. Coli</i> (Blattner <i>et al.</i> , 1997*))
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	
ATCC13032	Штамм <i>Corynebacterium glutamicum</i> дикого типа (Kinoshita <i>et al.</i> , 1957**))
ATCC21831	Вариант <i>C. glutamicum</i> ., продуцирующий L-аргинин (Park <i>et al.</i> , 2014***))
ATCC13032__ <i>Psod-carAB</i>	Хромосомная интеграция сильного <i>sod</i> -промотора выше <i>carAB</i> в ATCC13032 <i>C. glutamicum</i>

*) Blattner *et al.*, 1997: Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y, Science. 1997 Sep 5;277(5331):1453-62. (doi: 10.1126/science.277.5331.1453)

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

***) Park *et al.*, 2014: Park SH, Kim HU, Kim TY, Park JS, Kim SS, Lee, Nat Commun. 2014 Aug 5; 5:4618. (doi: 10.1038/ncomms5618)

Таблица 9. Перечень плазмид

Плазмида	Комментарий
pMA-T_AGAT_Mp	Синтез гена и клонирующий вектор для AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>); запатентованная плазмида Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США)
pMA-T_AGAT_cyrA	Синтез гена и клонирующий вектор для AGAT_cyrA (AWT205 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>); запатентованная плазмида Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США)
pMA-T_AGAT_Hs	Синтез гена и клонирующий вектор для AGAT_Hs (<i>Homo sapiens</i>); запатентованная плазмида Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США)
pMA-T_AGAT_Rn	Синтез гена и клонирующий вектор для AGAT_Rn (<i>Rattus norvegicus</i>); запатентованная плазмида Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США)
pMA-T_AGAT_Gv	Синтез гена и клонирующий вектор для AGAT_Gv (<i>Galeopterus variegatus</i>); запатентованная плазмида Invitrogen/Geneart (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США)
pEKEx2	Пустая шаттл-плазмида <i>E. coli</i> – <i>C. glutamicum</i>
pEKEx2_AGAT_Mp	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>)

Плазмида	Комментарий
pEKEx2_AGAT_cyrA	Экспрессия AGAT_cyrA (AWT205 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>)
pEKEx2_AGAT_Hs	Экспрессия AGAT_Hs (<i>Homo sapiens</i>)
pEKEx2_AGAT_Rn	Экспрессия AGAT_Rn (<i>Rattus norvegicus</i>)
pEKEx2_AGAT_Gv	Экспрессия AGAT_Gv (<i>Galeopterus variegatus</i>)
pEC-ХК99Е	Пустая шаттл-плазмида <i>E. coli</i> <i>C. glutamicum</i>
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>)
pCR-Blunt II-TOPO	Пустая плазмида для клонирования продуктов ПЦР (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, Уолтем, США)
pCRII-argF	pCR-Blunt II-TOPO, содержащая клонированный ген <i>argF</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pCRII-argGH	pCR-Blunt II-TOPO, содержащая клонированные гены <i>argG</i> , <i>argH</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pCRII-argFGH	pCR-Blunt II-TOPO, содержащая клонированные гены <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pEC-ХК99Е_argFGH	Экспрессия <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_argF GH	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>), <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pEC-ХК99Е_AGAT_Mp_arg	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>), <i>argF</i> , <i>argH</i> (<i>C. glutamicum</i>)

Плазмида	Комментарий
GH	
pEC- XK99E_AGAT_Mp_argF	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>), <i>argF</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pEC- XK99E_AGAT_Mp_arg G	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>), <i>argG</i> (<i>C. glutamicum</i>)
pK18mobsacB	Пустая плазмида для геномной модификации <i>C. glutamicum</i>
pK18mobsacB_Psod- carAB	Плазмида для хромосомной интеграции сильного <i>sod</i> -промотора выше <i>carAB</i> в <i>C. glutamicum</i>

Пример 11. Трансформация штаммов *C. glutamicum* различными плазмидами для экспрессии

Следующие штаммы *C. glutamicum* трансформировали различными плазмидами:

- ATCC13032 *C. glutamicum* (Kinoshita *et al.*, J. Gen. Appl. Microbiol. 1957; 3(3): 193-205) является обычно используемым штаммом дикого типа.
- Штамм ATCC21831 *C. glutamicum* (Park *et al.*, Nat Commun. 2014 Aug 5; 5:4618) синтезирует L-аргинин из первичных субстратов, таких как аммиак и глюкоза.
- ATCC13032__Psod-carAB представляет собой вариант ATCC13032 с сильным *sod*-промотором выше генов *carAB*.

Штаммы трансформировали посредством электропорации с различными плазмидами (как показано в таблице 10). Плазмиду, содержащую клетки, отбирали с 25 мг/л канамицина.

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

Плазмида	Клонированный ген	Реципиентный штамм	Полученный штамм
pEKEx2	отсутствует	ATCC21831	ATCC21831/pEKEx2
pEKEx2_AGAT_Mp	AGAT_Mp	ATCC21831	ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Mp
pEKEx2_AGAT_Hs	AGAT_Hs	ATCC21831	ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Hs
pEKEx2_AGAT_Rn	AGAT_Rn	ATCC21831	ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Rn
pEKEx2_AGAT_Gv	AGAT_Gv	ATCC21831	ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Gv
pEKEx2_AGAT_cyrA	AGAT_cyrA	ATCC21831	ATCC21831/pEKEx2_AGAT_cyrA
pEC-XK99E	отсутствует	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E
pEC-XK99E_argFGH	<i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i>	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E_argFGH
pEC-XK99E_AGAT_Mp	AGAT_Mp	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp
pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG	AGAT_Mp, <i>argG</i>	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG

pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF	AGAT_Mp, <i>argF</i>	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF
pEC-XK99E_AGAT_Mp_argGH	AGAT_Mp, <i>argG</i> , <i>argH</i>	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argGH
pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH	AGAT_Mp, <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i>	ATCC13032	ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH
pEC-XK99E	отсутствует	ATCC13032_Psod-carAB	ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E
pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH	AGAT_Mp, <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i>	ATCC13032_Psod-carAB	ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH

Пример 12. Влияние доступности AGAT и субстрата на получение GAA

Штаммы ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp (несущие ген фермента AGAT из *Moorea producens*) и ATCC13032/pEC-XK99E (пустой вектор для контроля) анализировали в отношении из способности продуцировать GAA в периодических культивированиях с применением системы Wouter Duetz (как описано выше). Среда для продуцирования (PM) содержала 40 г/л D-глюкозы в качестве основного источника углерода. Некоторые порции дополняли L-аргинином и/или глицином, как указано.

Таблица 11. Получение GAA с помощью штаммов ATCC13032/pEC-XK99E и ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp

Штамм	Добавка	GAA
ATCC13032/pEC-ХК99Е	отсутствует	не выявлено
ATCC13032/pEC-ХК99Е	1,90 г/л Arg 0,818 г/л Gly	не выявлено
ATCC13032/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	отсутствует	25 мг/л
ATCC13032/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	0,818 г/л Gly	31 мг/л
ATCC13032/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp	1,90 г/л Arg 0,818 г/л Gly	124 мг/л

Как показано в таблице 11, контрольный штамм ATCC13032/pEC-ХК99Е не мог продуцировать GAA, даже если были предусмотрены предшественники L-аргинин и глицин. Авторы настоящего изобретения сделали вывод, что он не обладает внутренней активностью AGAT. Штамм ATCC13032/pEC-ХК99Е_AGAT_Mp содержит полинуклеотид, кодирующий предполагаемый AGAT из *Moorea producens*. Он продуцировал 25 мг/л GAA в недополненной РМ. Добавка глицина приводила к небольшому увеличению до 31 мг/л GAA. Добавка глицина и L-аргинина значительно увеличивала получение GAA до 124 мг/л.

Пример 13. Получение GAA из первичных субстратов

В промышленном способе получения GAA добавка L-аргинина будет достаточно дорогостоящей по сравнению с первичным субстратом, таким как аммиак, мочевина и глюкоза. Следовательно, будет требуемым образование GAA непосредственно из таких первичных субстратов.

С этой целью продуцент L-аргинина ATCC21831 *C. glutamicum* трансформировали

- pEKEx2 (пустой вектор для контроля),
- pEKEx2_AGAT_Mp (содержащая ген AGAT_Mp из *Morea producens*),
- pEKEx2_AGAT_Hs (содержащая ген AGAT_Hs из *Homo sapiens*),
- pEKEx2_AGAT_Rn (содержащая ген AGAT_Rn из *Rattus norvegicus*),
- pEKEx2_AGAT_Gv (содержащая ген AGAT_Gv из *Galeopterus variegatus*)
и
- pEKEx2_AGAT_cytA (содержащие ген AGAT_cytA из *Cylindrospermopsis raciborskii*).

ATCC21831 изолировали в качестве устойчивого к канаванину мутанта, и было обнаружено, что он продуцирует L-аргинин. Его геном секвенировали Park *et al.* (Nat Commun. 2014 Aug 5;5:4618. doi: 10.1038/ncomms5618; номер доступа CP007722), и штамм находился в открытом доступе из LGC Standards (LGC Standards GmbH, Везель, Германия).

Все трансформированные штаммы ATCC21831 анализировали в отношении их способности продуцировать GAA в периодических культивированиях с применением системы Wouter Duetz (как описано выше). Среда для продуцирования (PM) содержала 40 г/л D-глюкозы в качестве основного источника углерода. Некоторые порции дополняли глицином и/или L-аргинином.

Таблица 12. Получение GAA с помощью штаммов ATCC21831, трансформированных вектором pEKEx2, содержащим AGAT из различных видов, в среде CGAF и MOPS с 1,5 г/л дрожжевого экстракта.

Штамм	Добавка	GAA
ATCC21831/pEKEx2	отсутствует	не выявлено

Штамм	Добавка	GAA
ATCC21831/pEKEx2	1,90 г/л аргинина,	не выявлено
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Mp	отсутствует	26,5 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Mp	0,82 г/л глицина	166,3 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Hs	отсутствует	3,6 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Hs	0,82 г/л глицина	56,2 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Rn	отсутствует	0,9 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Rn	0,82 г/л глицина	7,6 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Gv	отсутствует	0,7 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Gv	0,82 г/л глицина	8,5 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_cyrA	отсутствует	20,8 мг/л
ATCC21831/pEKEx2_AGAT_cyrA	0,82 г/л глицина	52,7 мг/л

Как показано в таблице 12, ATCC21831/pEKEx2 не продуцировал GAA, даже если были в наличии предшественники L-аргинин и глицин. Авторы настоящего изобретения делали вывод, что ATCC21831/ pEKEx2 не обладает внутренней активностью AGAT. Трансформированные штаммы ATCC21831/

pEKEx2_AGAT_Mp, ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Hs, ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Rn, ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Gv и ATCC21831/pEKEx2_AGAT_cytA продуцировали от приблизительно 1 до 26 мг/л GAA в недополненной РМ. Авторы настоящего изобретения делают вывод, что предшественники L-аргинина и глицина синтезировали из первичных субстратов D-глюкозы, аммиака и мочевины.

При добавлении глицина, продуцирование GAA ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Mp, ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Hs, ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Rn, ATCC21831/pEKEx2_AGAT_Gv и ATCC21831/pEKEx2_AGAT_cytA значительно повышалось по сравнению с экспериментами без добавок. По сравнению со штаммом ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp (см. таблицу 10) продуцент L-аргинина ATCC21831, обладающий геном AGAT, накапливает намного больше GAA, когда глицин не является ограничивающим. Авторы настоящего изобретения делали вывод, что возможность внутреннего обеспечения L-аргинина улучшает получение GAA.

Пример 14. Влияние восстановления L-аргинина на получение GAA

В продуцирующих L-аргинин штаммах (например, ATCC21831) синтезируется *de novo* промежуточный L-орнитин и дополнительно превращается в L-аргинин. Когда такой штамм обеспечивается AGAT, фермент будет продуцировать одинаковое молярное количество GAA и L-орнитина. Однако на образование L-орнитина расходуется значительное количество первичных C- и N-источником и, таким образом, это снижает выход GAA.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что усиление пути биосинтеза, ведущего от L-орнитина к L-аргину, улучшает получение GAA предпочтительно за счет улучшения рециркуляции от L-орнитина до L-аргинина.

Различные штаммы, полученные из ATCC13032, культивировали с применением системы Wouter Duetz и затем анализировали в отношении их способности продуцировать GAA (таблицы 13, 14 и 15).

Таблица 13. Влияние улучшенного восстановления L-аргинина на получение GAA в РМ, содержащей YE без добавок глицина или L-аргинина

Штамм	GAA
ATCC13032/pEC-XK99E	0 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_argFGH	0 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E	0 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp	25 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG	26 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argH	24 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF	27 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argGH	26 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH	25 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp	43 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG	45 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH	45 мг/л

Таблица 14. Влияние улучшенного восстановления L-аргинина на получение ГАА в РМ без YE Все культуры дополняли 0,82 г/л глицина.

Штамм	ГАА
ATCC13032/pEC-XK99E	0 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_argFGH	0 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E	0 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp	22 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG	24 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argH	22 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF	23 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argGH	23 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH	23 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp	53 мг/л

Таблица 15. Влияние улучшенного восстановления L-аргинина на получение ГАА в РМ, содержащей YE. Все культуры дополняли 0,82 г/л глицина и 1,9 г/л L-аргинина.

Штамм	ГАА
ATCC13032/pEC-XK99E	не выявлено
ATCC13032/pEC-XK99E_argFGH	не выявлено
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E	не выявлено
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp	124 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG	136 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF	136 мг/л

ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argGH	133 мг/л
ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH	154 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-	156 мг/л
ATCC13032_Psod-carAB/pEC-	171 мг/л

Как показано в таблицах 13-15, штаммы без гена AGAT не продуцировали выявляемое количество GAA.

Экспрессия AGAT_Mp в ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp приводила к 124 мг/л GAA. Дополнительная амплификация *argG* (штамм ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argG), *argH* (штамм ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argF) или *argG+argH* (штамм ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argGH) улучшала получение GAA (см. таблицу 14).

В штамме ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH экспрессия генов *argF* (кодирующего орнитинкарбамоилтрансферазу), *argG* (кодирующего аргининосукцинатсинтетазу) и *argH* (кодирующего аргининосукцинатлиазу) усиливается. Это дополнительно улучшает получение GAA до 154 мг/л (см. таблицу 14).

Превращение L-орнитина в L-цитруллин, катализируемое орнитинкарбамоилтрансферазой, зависит от доступности субстратного кофактора карбамоилфосфата. Карбамоилфосфат продуцируется с помощью карбамоилфосфатсинтеза, которая кодируется генами *carA* и *carB*. В штамме ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp геномная вставка сильного *sod*-промотора усиливает экспрессию *carA* и *carB*. По сравнению с ATCC13032/pEC-XK99E_AGAT_Mp это приводило к улучшенному продуцированию GAA (156 мг/л по сравнению с 124 мг/л).

В штамме ATCC13032_Psod-carAB/pEC-XK99E_AGAT_Mp_argFGH улучшенное превращение L-орнитина (сверхэкспрессия *argF*, *argG* и *argH*) комбинировали с улучшенным биосинтезом карбамоилфосфата

(сверхэкспрессия *carA* и *carB*). Данная комбинация дополнительно улучшала получение GAA до 171 мг/л.

Пример 15. Конструирование вектора экспрессии *P. putida* для гена AGAT_Mp *Moorea producens*

Для гетерологичной экспрессии AGAT из *Moorea producens* (EC 2.1.4.1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4) в KT2440 *P. putida* конструировали плазмиду pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)]. Кодон-оптимизированный ген AGAT_Mp должны были клонировать под контролем индуцируемого рамнозой промотора P_{rha} в вектор pACYATH-5. Терминирующая последовательность располагается ниже гена AGAT_Mp. Ген AGAT_Mp заказывали для синтеза гена из Eurofins Genomics Germany GmbH (Эберсберг, Германия), и последовательность ДНК фрагмента гена являлась кодон-оптимизированной для экспрессии KT2440 *P. putida* (SEQ ID NO:33). Выше открытой рамки считывания добавляли последовательность Шайна-Дальгарно. Кассету с промотором P_{Rha} (SEQ ID NO:34) и терминирующую последовательность (SEQ ID NO:35) амплифицировали из геномной ДНК K12 *E. coli*. Вектор основан на pACYC184 (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США) и несет точку начала репликации p15A для *E. coli* и точку начала репликации pVS1 для репликации KT2440 *P. putida*. Точка начала pVS1 происходит от pVS1 плазмиды *Pseudomonas* (Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T, Plasmid 1984, 11(3), 206-20). На следующей стадии фрагмент гена AGAT_Mp амплифицировали с помощью ПЦР с применением праймера MW_20_01_fw (SEQ ID NO:36) и MW_20_02_rv (SEQ ID NO:37) и клонировали в вектор pACYCATH-5 с применением сайтов рестрикции *ApaI/XhoI* и NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Ki от (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. E5520). Собранный продукт трансформировали в 10-бета-электрокомпетентные клетки *E. coli* (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. C3020K). Процедуру очистки с помощью ПЦР, клонирования и трансформации проводили в соответствии с руководством производителя. Правильную вставку целевого гена проверяли посредством рестрикционного анализа и аутентичность введенного фрагмента ДНК подтверждали посредством

секвенирования ДНК. Полученный вектор экспрессии называли pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] (SEQ ID NO:38, см. таблицу 17).

Штамм KT2440 *P. putida* трансформировали плазмидой pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] посредством электропорации и высевали на чашки с агаром -LB, дополненным тетрациклином (10 мг/л). Трансформантов проверяли в отношении наличия правильной плазмиды посредством получения плазмид и аналитического рестрикционного анализа. Полученный штамм называли KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida* (см. таблицу 18).

Пример 16. Конструирование вектора экспрессии для *P. putida* гена AGAT_Mp *Moorea producens* и генов *argF*, *argG* и *argHP. putida*.

Для гетерологичной экспрессии AGAT_Mp из *P. putida Moorea producens* и *argF* (SEQ ID NO:39), *argG* (SEQ ID NO:41), *argH* (SEQ ID NO:43) из KT2440 конструировали плазмиду pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp].

Синтетический оперон, состоящий из AGAT_Mp, кодирующего L-аргинин:глицинаминотрансферазу (AGAT, EC 2.1.4.1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4), *argF*, кодирующего орнитинкарбамоилтрансферазу (ArgF, EC 2.1.3.3, SEQ ID NO:40), *argG*, кодирующего аргининосукцинатсинтазу (ArgG, E.C. 6.3.4.5, SEQ ID NO:42) и *argH*, кодирующего аргининосукцинатлиазу (ArgH, E.C. 4.3.2.1, SEQ ID NO:44) соответственно, клонировали под контролем индуцируемого рамнозой промотора P_{rha} в вектор pACYCATH-5.

Терминирующая последовательность располагается ниже синтетического оперона. Ген AGAT_Mp заказывали для синтеза гена из Eurofins Genomics Germany GmbH (Эберсберг, Германия), и последовательность ДНК фрагмента гена являлась кодон-оптимизированной для экспрессии KT2440 *P. putida*. Гены *argF*^{GH} также синтезировали в качестве фрагмента генов *argF*^{GH} (SEQ ID NO: 45). Кассету с промотором P_{Rha} (SEQ ID NO:34) и терминирующую последовательность (SEQ ID NO:35) амплифицировали из геномной ДНК K12 *E. coli*. Вектор основан на pACYC184 (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США) и несет точку начала репликации p15A для *E. coli* и точку начала репликации

pVS1 для репликации KT2440 *P. putida*. Точка начала pVS1 происходит от pVS1 плазмиды *Pseudomonas* (Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T, Plasmid 1984, 11(3), 206-20). Для клонирования AGAT_Mp и *argFGH* амплифицировали с помощью ПЦР. Праймеры, применяемые для клонирования, перечислены в таблице 16. Продукты ПЦР клонировали в вектор pACYCATH-5 с применением сайтов рестрикции *ApaI/XhoI* и набора NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit от (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. E5520) для образования оптимизированного оперона. Для амплификации Phusion™ High-Fidelity Master Mix от New England Biolabs (Ипсвич, США) применяли в соответствии с руководством производителя. Собранный продукт трансформировали в 10-бета-электрокомпетентные клетки *E. coli* (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. C3020K). Процедуру очистки с помощью ПЦР, клонирования и трансформации проводили в соответствии с руководством производителя. Правильную вставку целевых генов проверяли посредством рестрикционного анализа и аутентичность введенного фрагмента ДНК подтверждали посредством секвенирования ДНК. Полученный вектор экспрессии называли pACYCATH-5{PRha}[*agat_Mp*(coPp) *argFGH_Pp*] (SEQ ID NO:49, см. таблицу 17).

Штамм KT2440 *P. putida* трансформировали плазмидой pACYCATH-5{PRha}[*agat_Mp*(coPp) *argFGH_Pp*] посредством электропорации и высевали на чашки с агаром -LB, дополненным тетрациклином (10 мг/л). Трансформантов проверяли в отношении наличия правильной плазмиды посредством получения плазмид и аналитического рестрикционного анализа. Полученный штамм называли KT2440/pACYCATH-5{PRha}[*agat_Mp*(coPp) *argFGH_Pp*] *P. putida* (см. таблицу 18).

Таблица 16. Праймеры применяли для клонирования AGAT_Mp и *argFGH* в pACYCATH-5.

Праймер	SEQ ID	Матрица	Продукт ПЦР

MW_20_01 _fw	SEQ ID NO:36	Фрагмент гена AGAT_Mp	AGAT_Mp
MW_20_03 _rv	SEQ ID NO:46	Фрагмент гена AGAT_Mp	AGAT_Mp
MW_20_04 _fw	SEQ ID NO:47	Фрагмент гена argFGH	argFGH
MW_20_09 _rv	SEQ ID NO:48	Фрагмент гена argFGH	argFGH

Пример 17. Клонирование генов *carAB* из KT2440 *P. putida* в вектор экспрессии pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]

Для гетерологичной экспрессии AGAT_Mp из *Moorea producens*, *argF* (SEQ ID NO:39), *argG* (SEQ ID NO:41), *argH* (SEQ ID NO:43), *carA* (SEQ ID NO:50) и *carB* (SEQ ID NO:52) из KT2440 *P. putida* конструировали плазмиду pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter]. Гены *carA* (SEQ ID NO:50) и *carB* (SEQ ID NO:52), кодирующие карбамоилфосфатсинтазу (CarAB, EC 6.3.5.5, SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:53), амплифицировали из геномной ДНК KT2440 *P. putida*, в том числе нативный промотор оперона *carAB*, с помощью ПЦР с применением праймера MW_20_35_fw (SEQ ID NO:54) и MW_20_36_rv (SEQ ID NO:55). Для амплификации PhusionTM High-Fidelity Master Mix от New England Biolabs (Ипсвич, США) применяли в соответствии с руководством производителя. Продукт ПЦР (SEQ ID NO:56) клонировали в pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp], разрезанную с помощью *Bsu36I* с применением набора NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Cloning Kit от (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. E5520). Собранный продукт трансформировали в 10-бета-электрокомпетентные клетки *E. coli* (New England BioLabs Inc., Ипсвич, США, № по кат. C3020K). Процедуру очистки с помощью ПЦР, клонирования и трансформации проводили в соответствии с руководством

производителя. Правильную вставка целевых генов проверяли посредством рестрикционного анализа и аутентичность введенного фрагмента ДНК подтверждали посредством секвенирования ДНК. Полученный вектор экспрессии называли pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] (SEQ ID NO:57, см. таблицу 17).

Штамм KT2440 *P. putida* трансформировали плазмидой pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] посредством электропорации и высевали на чашки с агаром -LB, дополненным тетрациклином (10 мг/л). Трансформантов проверяли в отношении наличия правильной плазмиды посредством получения плазмид и аналитического рестрикционного анализа. Полученный штамм называли KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] *P. putida* (см. таблицу 18).

Таблица 17. Перечень плазмид для экспрессии *P. putida*

Плазмида	Комментарий
pACYCATH-5	Пустая шаттл-плазмида <i>E. coli</i> – <i>P. putida</i>
pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)]	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>)
pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>), <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i> (<i>P. putida</i>)
pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter]	Экспрессия AGAT_Mp (<i>Moorea producens</i>), <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i> , <i>carA</i> , <i>carB</i> (<i>P. putida</i>)

Таблица 18. Перечень содержащих плазмиду штаммов *P. putida*

Плазмида	Клонированный ген	Реципиентный штамм	Полученный штамм
pACYCATH-5	отсутствует	KT2440 <i>P. putida</i>	KT2440/pACYCATH-5 <i>P. putida</i>
pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)]	AGAT_Mp	KT2440 <i>P. putida</i>	KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] <i>P. putida</i>
pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]	AGAT_Mp, <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i>	KT2440 <i>P. putida</i>	KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp] <i>P. putida</i>
pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter]	AGAT_Mp, <i>argF</i> , <i>argG</i> , <i>argH</i> , <i>carA</i> , <i>carB</i>	KT2440 <i>P. putida</i>	KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] <i>P. putida</i>

Пример 18. Влияние AGAT на продуцирование ГАА в KT2440 *P. putida*

Штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*, несущий ген для фермента AGAT из *M. producens*, и KT2440/pACYCATH-5 *P. putida* (пустой вектор контроля) анализировали в отношении их способности продуцировать ГАА в периодическом культивировании с применением встряхиваемых колб. В чашку с агаром LB, содержащую 10 мг/л тетрациклина, при помощи петли инокулировали штрихом замороженную культуру соответствующего штамма. Чашки с агаром инкубировали в течение 24 ч. при 30°C. Колбу с перегородками объемом 100 мл, содержащую 15 мл среды для посева (автоклавированные:

4,4 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,5 г/л KH_2PO_4 , 1 г/л NH_4Cl , 10 г/л дрожжевого экстракта, стерилизованные отдельно: 20 г/л глюкозы, 0,2 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,006 г/л FeCl_3 , 0,015 г/л CaCl_2 , 1 мл/л раствора следовых элементов SL6 (стерильно фильтрованные: 0,3 г/л H_3BO_3 , 0,2 г/л $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г/л $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 г/л $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), pH 7) с 10 мг/л тетрациклина инокулировали одной колонией чашки с агаром и инкубировали во встряхивателе-инкубаторе в течение 18 ч при 30°C и 200 об./мин для получения предварительной культуры. Предварительную культуру применяли для инокуляции 40 мл среды M12 (композиция: (2,2 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02 г/л NaCl , 0,4 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 г/л $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, стерилизованные отдельно: 2 г/л KH_2PO_4 , 8,51 г/л Na_2HPO_4 , 20 г/л глюкозы, 10 мл/л раствора следовых элементов M12 (стерильно фильтрованные: 0,2 г/л $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г/л Na_3 -цитрат $\times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,002 г/л $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,003 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л H_3BO_3 , 1 г/л $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), pH 7,4) с 10 мг/л тетрациклина, 3,48 г/л аргинина и 1,5 г/л глицина до начальной OD_{600} , составляющей 0,1. Штаммы культивировали в течение 48 ч. При OD_{600} , составляющей ~0,5-0,8, экспрессию генов индуцировали добавлением 0,2% (вес/об.) рамнозы. Через 9 ч и 24 ч после индукции добавляли 1,74 г/л аргинина и 0,75 г/л глицина. В конце культивирования образцы забирали для определения концентрации продуцированного ГАА.

Результаты показаны в таблице 19.

Таблица 19. Получение ГАА с помощью штаммов KT2440/pACYCATH-5 *P. putida* и KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*

Штамм	ГАА
KT2440/pACYCATH-5 <i>P. putida</i>	не выявлено
KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)]	81,5 мг/л

Как можно видеть из таблицы 19, штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*, оснащенный геном AGAT_Mp из *M. producens*, был способен продуцировать приблизительно 81,5 мг/л GAA. Контрольный штамм KT2440/pACYCATH-5 *P. putida* вообще не мог продуцировать какую-либо GAA.

Пример 19. Влияние AGAT и повышенного поступления L-аргинина на продуцирование GAA в KT2440 *P. putida*

Штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*, несущий ген для фермента AGAT из *M. producens*, и штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp] *P. putida*, несущий дополнительно гены биосинтеза аргинина *argFGH*, анализировали в отношении их способности продуцировать GAA в периодическом культивировании с применением встряхиваемых колб. В чашку с агаром LB, содержащую 10 мг/л тетрациклина, при помощи петли инокулировали штрихом замороженную в глицерине культуру соответствующего штамма. Чашку с агаром инкубировали в течение 24 ч. при 30°C. Колбу с перегородками объемом 100 мл, содержащую 15 мл среды для посева (автоклавируемые: 4,4 г/л Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 г/л KH₂PO₄, 1 г/л NH₄Cl, 10 г/л дрожжевого экстракта, стерилизованные отдельно: 20 г/л глюкозы, 0,2 г/л MgSO₄ x 7 H₂O, 0,006 г/л FeCl₃, 0,015 г/л CaCl₂, 1 мл/л раствора следовых элементов SL6 (стерильно фильтрованные: 0,3 г/л H₃BO₃, 0,2 г/л CoCl₂ x 6 H₂O, 0,1 г/л ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,03 г/л MnCl₂ x 4H₂O, 0,01 г/л CuCl₂ x 2 H₂O, 0,03 г/л Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,02 г/л NiCl₂ x 6 H₂O), pH 7) с 10 мг/л тетрациклина инокулировали одной колонией чашки с агаром и инкубировали во встряхивателе-инкубаторе в течение 18 ч при 30°C и 200 об./мин для получения предварительной культуры. Предварительную культуру применяли для инокуляции 40 мл среды M12 (композиция: (2,2 г/л (NH₄)₂SO₄, 0,02 г/л NaCl, 0,4 г/л MgSO₄ x 7H₂O, 0,04 г/л CaCl₂ x 2H₂O, стерилизованные отдельно: 2 г/л KH₂PO₄, 8,51 г/л Na₂HPO₄, 20 г/л глюкозы, 10 мл/л раствора следовых элементов M12 (стерильно фильтрованные: 0,2 г/л ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,1 г/л MnCl₂ x 4H₂O, 1,5 г/л Na₃-цитрат x 2 H₂O, 0,1 г/л CuSO₄ x 5 H₂O, 0,002 г/л NiCl₂ x 6 H₂O,

0,003 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л H_3BO_3 , 1 г/л $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), pH 7,4) с 10 мг/л тетрациклина, 3,48 г/л аргинина и 1,5 г/л глицина до начальной OD_{600} , составляющей 0,1. Штаммы культивировали в течение 48 ч. При OD_{600} , составляющей ~0,5-0,8, экспрессию генов индуцировали добавлением 0,2% (вес/об.) рамнозы. Через 9 ч и 24 ч после индукции добавляли 1,74 г/л аргинина и 0,75 г/л глицина. В конце культивирования образцы забирали для определения концентрации продуцированного GAA.

Результаты показаны в таблице 20.

Таблица 20. Получение GAA с помощью штаммов KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida* и KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp] *P. putida*

Штамм	GAA
KT2440/pACYCATH-5 <i>P. putida</i>	не выявлено
KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] <i>P. putida</i>	81,5 мг/л
KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp] <i>P. putida</i>	169,5 мг/л

Как можно видеть из таблицы 20, штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*, оснащенный геном AGAT_Mp из *M. producens*, был способен продуцировать приблизительно 81,5 мг/л GAA. Дополнительно внедрение *argF*, *argG* и *argH* в штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp] *P. putida* улучшало получение GAA до 169,5 мг/л.

Пример 20. Влияние AGAT и восстановления L-аргинина на продуцирование GAA в KT2440 *P. putida*

Штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*, несущий ген для фермента AGAT из *M. producens*, штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp argFGH_Pp] *P. putida*, несущий дополнительно гены биосинтеза аргинина *argF**GH*, и штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)

argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] *P. putida*, несущий дополнительно гены карбамоилфосфатсинтазы *carAB*, анализировали в отношении их способности продуцировать ГАА в периодическом культивировании с применением встряхиваемых колб. Превращение L-орнитина в L-цитруллин, катализированное орнитинкарбамоилтрансферазой, зависит от доступности субстратного кофактора карбамоилфосфата. Карбамоилфосфат продуцируется с помощью карбамоилфосфатсинтазы, которая кодируется генами *carA* и *carB*. В чашку с агаром LB, содержащую 10 мг/л тетрациклина, при помощи петли инокулировали штрихом замороженную в глицерине культуру соответствующего штамма. Чашку с агаром инкубировали в течение 24 ч. при 30°C. Колбу с перегородками объемом 100 мл, содержащую 15 мл среды для посева (автоклавируемые: 4,4 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,5 г/л KH_2PO_4 , 1 г/л NH_4Cl , 10 г/л дрожжевого экстракта, стерилизованные отдельно: 20 г/л глюкозы, 0,2 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,006 г/л FeCl_3 , 0,015 г/л CaCl_2 , 1 мл/л раствора следовых элементов SL6 (стерильно фильтрованные: 0,3 г/л H_3BO_3 , 0,2 г/л $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г/л $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 г/л $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), pH 7) с 10 мг/л тетрациклина инокулировали одной колонией чашки с агаром и инкубировали во встряхивателе-инкубаторе в течение 18 ч при 30°C и 200 об./мин для получения предварительной культуры. Предварительную культуру применяли для инокуляции 40 мл среды M12 (композиция: (2,2 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02 г/л NaCl , 0,4 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 г/л $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, стерилизованные отдельно: 2 г/л KH_2PO_4 , 8,51 г/л Na_2HPO_4 , 20 г/л глюкозы, 10 мл/л раствора следовых элементов M12 (стерильно фильтрованные: 0,2 г/л $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г/л $\text{Na}_3\text{-цитрат} \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 г/л $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,002 г/л $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,003 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 г/л H_3BO_3 , 1 г/л $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), pH 7,4) с 10 мг/л тетрациклина, 3,48 г/л аргинина и 1,5 г/л глицина до начальной OD_{600} , составляющей 0,1. Штаммы культивировали в течение 48 ч. При OD_{600} , составляющей ~0,5-0,8, экспрессию генов индуцировали добавлением 0,2% (вес/об.) рамнозы. Через 4 ч./18 ч./23 ч. после индукции добавляли 6,97 г/л Arg/1,5 г/л Gly, 2,34 г/л Arg/0,75 г/л Gly и 6,97 г/л Arg/1,5 г/л Gly. В конце

культивирования образцы забирали для определения концентрации продуцированного GAA.

Результаты показаны в таблице 21.

Таблица 21. Получение GAA с помощью штаммов KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp)] *P. putida*, KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp] *P. putida* и KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] *P. putida*

Штамм	GAA
KT2440/pACYCATH-5 <i>P. putida</i>	не выявлено
KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp argFGH_Pp] <i>P.</i>	589 мг/л
KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] <i>P. putida</i>	693 мг/л

Как можно видеть из таблицы 21, штамм, оснащенный геном AGAT_Mp из *M. producens* и генами *argFGH* из *P. putida*, были способны продуцировать 589 мг/л GAA. Дополнительно внедрение *carAB* в штамм KT2440/pACYCATH-5{PRha}[agat_Mp(coPp) argFGH_Pp]{carAB_Pp}[carAB_Pp][ter] *P. putida* улучшало получение GAA до 693 мг/л.

Формула изобретения

1. Микроорганизм, характеризующийся повышенной активностью фермента, обладающего функцией карбамоилфосфатсинтазы, по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа и содержащий по меньшей мере один гетерологичный ген, кодирующий белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы.
2. Микроорганизм по п. 1, где повышенная активность фермента, обладающего функцией карбамоилфосфатсинтазы, обеспечена мутацией и/или сверхэкспрессией гена, кодирующего фермент, обладающий функцией карбамоилфосфатсинтазы.
3. Микроорганизм по любому из пп. 1-2, где активность L-аргинин:глицинамидинотрансферазы повышена за счет мутации и/или сверхэкспрессии гена, кодирующего L-аргинин:глицинамидинотрансферазу.
4. Микроорганизм по любому из предыдущих пунктов, обладающий улучшенной способностью продуцировать L-аргинин по сравнению со способностью микроорганизма дикого типа.
5. Микроорганизм по п. 4, где активность фермента, обладающего функцией аргининосукцинатлиазы, повышена по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.
6. Микроорганизм по п. 4 или п. 5, где активность фермента, обладающего функцией орнитинкарбамоилтрансферазы, повышена по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.
7. Микроорганизм по любому из пп. 4-6, где активность фермента, обладающего функцией аргининосукцинатсинтетазы, повышена по сравнению с соответствующей ферментативной активностью у микроорганизма дикого типа.

8. Микроорганизм по любому из пп. 4-7, где повышенная активность ферментов обеспечена за счет мутации и/или сверхэкспрессии генов, кодирующих соответствующие ферменты.
9. Микроорганизм по любому из пп. 4-8, где аргининовый оперон (*argCJBDFR*) сверхэкспрессируется.
10. Микроорганизм по любому из пп. 4-8, где ген *argR*, кодирующий репрессорный белок ArgR, отвечающий на аргинин, является ослабленным или удаленным.
11. Микроорганизм по любому из пп. 4-8 или п. 10, где по меньшей мере один или более генов, кодирующих фермент пути биосинтеза L-орнитина и L-аргинина, включающие *gdh*, *argJ*, *argB*, *argC* и/или *argD*, кодирующие глутаматдегидрогеназу, орнитинацетилтрансферазу, ацетилглутаматкиназу, ацетилглутамилфосфатредуктазу и ацетилорнитинаминотрансферазу соответственно, сверхэкспрессируются.
12. Микроорганизм по любому из пп. 1-11, где белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2.
13. Микроорганизм по любому из пп. 1-11, где белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 16.
14. Микроорганизм по любому из пп. 1-11, где белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинамидинотрансферазы, содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 24.

15. Микроорганизм по любому из пп. 1-11, где белок, обладающий функцией L-аргинин:глицинаминотрансферазы, содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 20.

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

17. Микроорганизм по п. 16, где микроорганизм представляет собой *Corynebacterium glutamicum*.

18. Микроорганизм по п. 16, где микроорганизм представляет собой *Escherichia coli*.

19. Микроорганизм по п. 16, где микроорганизм представляет собой *Pseudomonas putida*.

20. Способ ферментативного получения гуанидиноуксусной кислоты (GAA), включающий стадии: а) культивирования микроорганизма по любому из предыдущих пунктов в среде для ферментации и б) накопление GAA в среде с образованием ферментационного бульона, содержащего GAA.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий выделение GAA из ферментационного бульона, содержащего GAA.

22. Способ по п. 20, дополнительно включающий высушивание и/или гранулирование ферментационного бульона, содержащего GAA.

23. Микроорганизм по любому из пп. 1-19, дополнительно содержащий ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы.

24. Микроорганизм по п. 23, где ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гуанидинацетат-N-метилтрансферазы, сверхэкспрессируется.

25. Способ ферментативного получения креатина, включающий стадии: а) культивирования микроорганизма, как указано в п. 22 или п. 24, в среде для ферментации и б) накопление креатина в среде с образованием ферментационного бульона, содержащего креатин.

26. Способ по п. 25, дополнительно включающий выделение креатина из ферментационного бульона, содержащего креатин.