I867896

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I867896 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：112148623 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 12 月 14 日

(51)Int. Cl.： ***C12N1/20*** ***(2006.01)*** ***C12N15/77*** ***(2006.01)***

C12P13/06 ***(2006.01)*** *C12R1/15* *(2006.01)*

(30)優先權：2022/12/30 南韓 10-2022-0190976

(71)申請人：南韓商ＣＪ第一製糖股份有限公司 (南韓) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
南韓

(72)發明人：金旼貞 KIM, MIN-JUNG (KR)；金柱淵 KIM, JU-YEON (KR)；李智惠 LEE, JI HYE (KR)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

KR 10-2007-0087035A WO 2022/050671A1

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：0 共 27 頁

(54)名稱

一種新穎的多核苷酸以及使用其生產Ｌ-丙胺酸之方法

(57)摘要

本發明係關於一種新穎的多核苷酸及一種使用其生產 L-丙胺酸之方法，且引入該新穎的多核苷酸的微生物之 L-丙胺酸生產能力顯著提高，在該多核苷酸中，編碼本發明之 AvtA 之基因的啟動子區之特定位置，且因此，該新穎的多核苷酸可有助於用於有效地生產 L-丙胺酸。

The present invention relates to a novel polynucleotide and a method for producing L-alanine using the same, and a microorganism to which the novel polynucleotide in which a specific position of a promoter region of a gene encoding AvtA of the present invention is introduced has significantly increased production ability of L-alanine, and thus, the novel polynucleotide can be usefully used for producing L-alanine efficiently.

公告本

I867896

【發明摘要】

【中文發明名稱】 一種新穎的多核苷酸以及使用其生產L-丙胺酸之方法

【英文發明名稱】 A NOVEL POLYNUCLEOTIDE AND METHOD FOR PRODUCING L-ALANINE USING THEREOF

【中文】

本發明係關於一種新穎的多核苷酸及一種使用其生產L-丙胺酸之方法，且引入該新穎的多核苷酸的微生物之L-丙胺酸生產能力顯著提高，在該多核苷酸中，編碼本發明之AvtA之基因的啟動子區之特定位置，且因此，該新穎的多核苷酸可有助於用於有效地生產L-丙胺酸。

【英文】

The present invention relates to a novel polynucleotide and a method for producing L-alanine using the same, and a microorganism to which the novel polynucleotide in which a specific position of a promoter region of a gene encoding AvtA of the present invention is introduced has significantly increased production ability of L-alanine, and thus, the novel polynucleotide can be usefully used for producing L-alanine efficiently.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 一種新穎的多核苷酸以及使用其生產L-丙胺酸之方法

【英文發明名稱】 A NOVEL POLYNUCLEOTIDE AND METHOD FOR PRODUCING L-ALANINE USING THEREOF

【技術領域】

相關申請案之交叉引用

【0001】 本申請案主張基於2022年12月30日申請的韓國專利申請案第10-2022-0190976號的優先權之權益，且對應韓國專利申請案之文獻中所揭示的全部內容作為本說明書之一部分併入。

【0002】 本發明係關於一種新穎的多核苷酸及一種使用其生產L-丙胺酸之方法，且更特定言之，關於一種新穎的多核苷酸、一種包含該多核苷酸之重組載體、一種經該載體轉形之宿主細胞以及一種使用該宿主細胞生產L-丙胺酸之方法。

【先前技術】

【0003】 L-丙胺酸係一種無色或白色胺基酸晶體，不具有氣味但具有獨特甜味，且廣泛應用於諸如化學、食品、醫藥領域及其類似領域。在食品行業中，其增強鮮味，且具有各種生理功能，諸如促進酒精代謝、保護肝功能及促進胰島素分泌。與其他胺基酸相比，L-丙胺酸具有抑制褐變反應之功能，因此將其用作酸度調節劑，且其以多種方式使用，諸如前列腺肥大用之藥物及體育產品及其類似物。以2020年為基準，丙胺酸年產量大約為500噸，且市場規模估計為2.5億美元或更大。

【0004】 大部分食品添加劑或色素添加劑係透過自然資源萃取、化學合成

或生物生產獲得，且L-丙胺酸主要藉由化學合成或酶轉化生產。近來，隨著消費者注重健康生活之意識的轉變，儘管由於產量低而價格較高，但天然物質仍比人工產品更受青睞。因此，除了生產石油衍生之L-丙胺酸的方法之外，已進行各種研究，例如努力開發生產高濃度胺基酸之微生物或醱酵製程技術。

【0005】 用於生產L-丙胺酸之常見方法包括使用微生物，諸如棒狀桿菌屬（*Corynebacterium*）或大腸桿菌（*Escherichia coli*）、短桿菌屬（*Brevibacterium*）、乳酸桿菌屬（*Lactobacillus* sp.）及其類似微生物進行醱酵之方法（US 5559016 A）。

【0006】 然而，隨著對L-丙胺酸之需求增加，研究更有效地生產高濃度L-丙胺酸的必要性亦凸顯出來。

【0007】 因此，作為開發生產高濃度L-丙胺酸之微生物的結果，本案發明人已開發出一種新穎的多核苷酸，在該多核苷酸中，編碼AvtA之基因的啟動子區之特定位置發生突變；且已確認使用該多核苷酸可改良L-丙胺酸之生產，由此完成本發明。

【發明內容】

[技術問題]

【0008】 本發明之一個具體實例提供一種多核苷酸，其中基於由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列，對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置之核苷酸分別經A取代。

【0009】 本發明之另一具體實例提供包含該多核苷酸之載體；及包含可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因的載體。

【0010】 本發明之其他具體實例提供包含該多核苷酸的宿主細胞；及包含可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因的載體。

【0011】 本發明之其他具體實例提供一種用於生產胺基酸之方法，其包含

在培養基中培養宿主細胞。

【0012】 本發明之其他具體實例提供一種用於生產胺基酸的包含宿主細胞之組成物。

【0013】 本發明之其他具體實例提供用於在胺基酸生產中使用以下之用途：多核苷酸，其中基於由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列，對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置之核苷酸分別經A取代；包含該多核苷酸之載體；以及包含該載體之宿主細胞。

[技術解決方案]

【0014】 此詳細解釋如下。另一方面，本發明中所揭示之各描述及具體實例可應用於其他描述及具體實例中之各者。換言之，本發明中所揭示之各種要素之所有組合均屬於本發明之範圍內。另外，本申請案之範圍不可被視為受下文所描述之特定描述限制。

【0015】 本發明提供一種多核苷酸，其中基於由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列，對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置之核苷酸分別經A取代。

【0016】 在本說明書中，術語「由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列（nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 2）」可意謂編碼胺基轉移酶之基因之啟動子序列的一部分。

【0017】 在本說明書中，術語「胺基轉移酶（aminotransferase）」可與「轉胺酶（aminotransferase）」互換使用，且意謂具有能夠自丙酮酸鹽可逆地生產L-丙胺酸之功能的酶。彼時使用輔因子L-纈胺酸可影響減少副產物。

【0018】 在本說明書中，術語「L-丙胺酸（L-alanine）」為必需胺基酸之一，且意謂具有$HO_2CCH(NH_2)CH_3$之化學式的L-胺基酸。

【0019】 多核苷酸可具有啟動子活性。

【0020】 在本說明書中，術語「啟動子（promoter）」意謂一個編碼區上游之非轉譯核苷酸序列，其包含與聚合酶之結合位點且對啟動子目標基因之mRNA具有轉錄起始活性，亦即，一個結合聚合酶的DNA區起始基因轉錄。啟動子可位於mRNA轉錄起始位點之5'位點上。隨後，啟動子之目標基因可為編碼胺基轉移酶之基因，但不限於此。

【0021】 本發明之多核苷酸為，由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列的一部分，亦即編碼胺基轉移酶之基因的啟動子序列，發生突變，且特定言之，突變可為對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置之核苷酸分別經A取代。因此，多核苷酸可由SEQ ID NO: 1之核苷酸序列組成。

【0022】 術語「突變（mutation）」意謂遺傳或非遺傳穩定的表型變化，且在本說明書中，其可藉由與「突變（mutant）」互換使用來命名。

【0023】 特定言之，相較於不包含突變的多核苷酸（野生型多核苷酸），該多核苷酸可具有增加的啟動子活性。因此，該多核苷酸可控制（增加）可操作地連接於該多核苷酸之目標基因的表現及由目標基因編碼之蛋白質的活性，且此外，其可控制除目標基因以外之基因的表現。

【0024】 該多核苷酸可藉由引入適當的宿主細胞中而具有提高宿主細胞之胺基酸生產能力（產量），例如L-丙胺酸生產能力（產量）的活性。因此，該多核苷酸可用於提高胺基酸生產能力（產量），且特定言之，其可用於提高L-丙胺酸生產能力（產量）。

【0025】 特定言之，多核苷酸可由SEQ ID NO: 1之核苷酸序列組成。

【0026】 另外，本發明之核苷酸序列可藉由一般已知的突變誘發，例如直接進化及定點突變誘發及其類似者來修飾。

【0027】 因此，該多核苷酸可包含以下多核苷酸：包含與SEQ ID NO: 1之

核苷酸序列具有至少60%或更高、特定言之70%或更高、更特定言之80%或更高、更特定言之83%或更高、84%或更高、88%或更高、90%或更高、93%或更高、95%或更高或97%或更高的同源性的核苷酸序列。只要其為與該序列具有同源性之序列，且其為與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列具有實質上相同或對應生物活性（啟動子活性）及/或所需活性（例如增加宿主細胞中L-丙胺酸之產量的活性）的多核苷酸序列，即使有在多核苷酸序列中一些序列缺失、經修飾、經取代或添加的情況，亦可包括於本申請案之範圍中。

【0028】 在本說明書中，術語「一致性（identity）（或同源性（homology））」意謂對應於指定核酸序列或胺基酸序列之程度，且可表示為百分比（%）。在與核酸同源之情況下，可使用有文獻記錄之算法BLAST（參見：Karlin及Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, 1993)或Pearson的FASTA（參見：Methods Enzymol., 183, 63, 1990）測定。基於此算法BLAST，已開發出稱為BLASTN或BLASTX之程式（參見：http://www.ncbi.nlm.nih.gov）。

【0029】 在一個具體實例中，包含本發明說明書中提供之特定核酸序列的多核苷酸可解釋為包含滿足如下之多核苷酸片段，其不僅包含特定核酸序列或與其實質上等效之核酸序列，且亦包含與特定核酸序列互補之核酸序列。特定言之，可在可由所屬技術領域中具有通常知識者根據目的進行適當調整的Tm值下使互補多核苷酸雜合，例如，Tm值為55℃、60℃、63℃或65℃；且可在以下所述之條件下分析互補多核苷酸：此等條件具體描述於已知文獻中。例如，可列出以下條件（但不限於此）：使具有60%或更高、70%或更高、80%或更高、85%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、98%或更高、99.5%或更高或99.9%或更高之高互補性的基因雜合且使具有低於上述之互補性的基因不雜合之條件，或在對應於60℃，1×鹽-檸檬酸鈉緩衝液（saline-sodium citrate buffer，SSC）

及0.1%（w/v）十二烷基硫酸鈉（Sodium Dodecyl Sulfate，SDS）；60℃，0.1× SSC及0.1% SDS；或68℃，0.1× SSC及0.1% SDS之鹽濃度及溫度下洗滌一次，特別是兩次或3次的條件（其為通用南方雜合之洗滌條件）；及其類似條件。雜合需要兩個核苷酸具有互補序列，但視雜合嚴格度而定，可允許鹼基之間錯配。術語「互補（complementary）」可用於描述可彼此雜合之核苷酸鹼基之間的關係。舉例而言，在DNA之情況下，腺苷與胸腺嘧啶互補且胞嘧啶與鳥嘌呤互補。使多核苷酸雜合之適當嚴格度視多核苷酸之長度及互補程度而定，且此為相關技術中所熟知的（參見Sambrook等人, 同上, 9.50-9.51, 11.7-11.8）。

【0030】 具體言之，當對應多核苷酸用作啟動子連接於目標基因時，表述「由SEQ ID NO: 1之核苷酸序列組成」不排除核苷酸之添加及/或缺失及/或突變之情況，其可能在使用限制酶連接於目標基因之過程期間發生。

【0031】 舉例而言，可包含但不限於具有由SEQ ID NO: 1表示之核苷酸序列組成之生物活性（啟動子活性）及/或目標活性（例如增加宿主細胞中之L-丙胺酸產量的活性）的多核苷酸，只要其為藉由在嚴格條件下與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列之全部或一部分的互補序列雜合而具有本申請案之生物活性（啟動子活性）及/或目標活性（例如增加L-丙胺酸產量之活性）的核苷酸序列即可。

【0032】 此外，本發明之多核苷酸能可操作地連接於編碼目標蛋白之基因。

【0033】 在本說明書中，術語「基因表現調節序列（gene expression regulatory sequence）」意謂包含本發明之多核苷酸且可表現可操作地連接於其之目標基因的序列。

【0034】 在本說明書中，術語「可操作地連接（operatively linked）」意謂將本發明之具有啟動子活性的多核苷酸功能性地連接於基因序列以起始及介導目標基因之轉錄。可使用所屬技術領域中已知之基因重組技術製備可操作地連

接，且可使用所屬技術領域中之切割及接合酶及其類似物（但不限於此）構築位點特異性DNA切割及接合。

【0035】 另外，本發明之基因表現調節序列除用於進行基因轉錄之啟動子之外，亦可進一步包含用於調節轉錄之任何操縱序列、編碼適當的mRNA核糖體結合位點之序列以及調節轉錄及轉譯終止之DNA，及其類似者。

【0036】 舉例而言，除啟動子以外，適用於原核生物之調節序列可進一步包含核糖體結合位點，但不限於此。若所屬技術領域中具有通常知識者需要，則本發明之具有啟動子活性的多核苷酸可構成上文所描述之用於調節基因表現的序列。

【0037】 在本發明中，目標基因係指編碼用以調節微生物中之表現的目標蛋白之基因。

【0038】 舉例而言，其可為涉及胺基酸生產之基因，但不限於此。具體而言，基因可為編碼與胺基酸生物合成有關之酶的基因，但不限於此。更特定言之，基因可為編碼胺基轉移酶的基因，但不限於此。

【0039】 另外，本發明提供一種載體，其包含：多核苷酸，其中對應於突變之核苷酸可為滿足以下的核苷酸：基於由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列，對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置之核苷酸分別經A取代。

【0040】 多核苷酸如上文所述。

【0041】 載體可進一步包含可操作地連接於多核苷酸的編碼目標蛋白之基因。

【0042】 在本說明書中，術語「載體（vector）」係指如下DNA產物，其含有編碼目標蛋白之多核苷酸的鹼基序列，該鹼基序列可操作地連接於適當調節序列，以便在適當宿主中表現目標蛋白。調節序列可包含能夠起始轉錄之啟動

子、用於調節轉錄之任何操縱子序列、編碼適當mRNA核糖體結合位點之序列及/或調節轉錄及/或轉譯終止之序列。載體可轉形至適合之宿主細胞中，且隨後獨立於宿主細胞之基因體表現，或整合至宿主細胞之基因體中。

【0043】 在本發明中，載體不受特別限制，只要其在宿主中可複製，且其可選自所有常用載體。常用載體之實例可包括天然狀態或重組狀態下之質體、黏質體、病毒、噬菌體及其類似物。舉例而言，作為載體，可使用pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A及Charon21A及其類似物作為噬菌體載體或黏質體載體，且可使用pDZ載體、基於pBR、基於pUC、基於pBluescriptII、基於pGEM、基於pTZ、基於pCL及基於pET之載體及其類似物作為質體載體。特定言之，可例示pDZ、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BAC載體及其類似者，但不限於此。

【0044】 本說明書中之可用載體可為已知表現載體及/或用於將多核苷酸插入宿主細胞染色體中的載體。將多核苷酸插入宿主細胞染色體中可藉由所屬技術領域中已知之任何方法進行，例如同源重組或CRISPR系統，但不限於此。載體可進一步包含選擇標記以用於確認是否將其插入染色體中。選擇標記用於選擇使用載體轉形之細胞，亦即，確認是否插入多核苷酸，且其可選自提供選擇性表型（諸如抗藥性、營養缺陷型、對細胞毒性劑具有耐受性或表現表面蛋白質）的基因且經使用。在用選擇劑處理之環境下，僅表現選擇標記之細胞存活或展示其他表型，因此可對經轉形細胞進行選擇。

【0045】 另外，本發明提供一種宿主細胞，其包含多核苷酸及可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因。

【0046】 多核苷酸及可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因如上文所描述。

【0047】 宿主細胞可為微生物，但不限於此。

【0048】 在本說明書中，術語「微生物（microorganism）」係如下概念，其包括所有野生型微生物或其中發生天然或人工基因修飾之微生物，且包括其中特定機制由於諸如插入外源基因之原因而減弱或加強或內源基因之活性經加強或減弱的所有微生物，及其類似者。

【0049】 在本發明中，微生物可包含多核苷酸，且特定言之，可包含多核苷酸及/或可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因。此外，微生物可包含載體，該載體包含多核苷酸或編碼基因表現調節序列及目標蛋白之基因，但不限於此。另外，多核苷酸、編碼目標蛋白之基因及載體可藉由轉形引入微生物中（但不限於此）。此外，只要微生物可表現基因，則多核苷酸及編碼目標蛋白之基因是安置於染色體上還是安置於染色體外均無關緊要。

【0050】 包含多核苷酸及編碼目標蛋白之基因的微生物可具有提高之胺基酸生產能力，且特定言之，其可具有提高之L-丙胺酸生產能力。

【0051】 舉例而言，微生物可具有加強的胺基轉移酶。

【0052】 在本發明中，微生物均可包含在內而不受限制，只要其為在引入本發明之具有啟動子活性之多核苷酸時可作為啟動子操作之微生物即可。

【0053】 特定言之，微生物可為棒狀桿菌屬微生物，且更特定言之，可包含停滯棒狀桿菌（*Corynebacterium stationis*）、嗜熱產胺棒狀桿菌（*Corynebacterium thermoaminogenes*）、麩胺酸棒狀桿菌（*Corynebacterium glutamicum*）、黃色短桿菌（*Brevibacterium flavum*）、乳酸醱酵短桿菌（*Brevibacterium lactofermentum*）及自其製備的菌株，但不限於此。特定言之，其可為停滯棒狀桿菌或麩胺酸棒狀桿菌菌株。

【0054】 此外，本發明提供一種用於生產胺基酸之方法，其包含在培養基中培養包含多核苷酸之宿主細胞，在該多核苷酸中，基於由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列，對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置

之核苷酸分別經A取代。

【0055】 多核苷酸及宿主細胞如上文所描述。

【0056】 該方法可進一步包含在培養之後自所培養微生物、培養產物或此兩者回收胺基酸。

【0057】 胺基酸可為L-丙胺酸，但不限於此。

【0058】 在本說明書中，術語「培養（culture）」意謂在經適當人工調整之環境條件下使微生物生長。用於培養本發明微生物的方法可使用所屬技術領域中廣泛已知的麩胺酸棒狀桿菌的培養方法來進行。特定言之，培養方法的實例包括分批培養、連續培養及饋料批式培養，但不限於此。此等各種方法揭示於例如「Biochemical Engineering」（James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, 第138-176頁, 1991）及其類似者中。

【0059】 在本說明書中，術語「培養產物」意謂包含培養基之物質，微生物在該培養基中在經適當人工調整之環境條件下生長或已生長。在狹義上，已生長微生物不包含於培養產物中，但其在廣義上可被包含在內。「培養產物」包含在微生物與針對培養微生物製備之培養基組分一起生長期間由微生物分泌之各種物質，且特定言之，包含目標物質L-丙胺酸。

【0060】 用於培養之培養基應以適當方式滿足特定菌株之要求。棒狀桿菌屬菌株之培養基為已知的。舉例而言，本申請案之微生物可在好氧條件下在含有適合碳源、氮源、維生素及其類似物之通用培養基中培養，同時調整溫度、pH及其類似者。此時，碳源包括碳水化合物，諸如葡萄糖、果糖及蔗糖；胺基酸，諸如麩胺酸、半胱胺酸及其類似物。特定言之，可使用天然有機養分，諸如澱粉水解產物及糖蜜，且較佳地，天然有機養分為碳水化合物，諸如葡萄糖、果糖、經滅菌之預處理糖蜜（亦即轉化成還原糖之糖蜜）及其類似物，且可多樣化地使用（但不限於）適當量之其他碳源，但不限於此。至於氮源，可使用無機氮源，

諸如氨；及有機氮源，諸如胺基酸，諸如麩胺酸及半胱胺酸；及蛋白胨、肉類萃取物、酵母萃取物及其類似物。此等氮源可單獨或以組合形式使用，但不限於此。在培養基中，可使用磷酸、磷酸二氫鉀或磷酸氫二鉀或對應的含鈉鹽（但不限於此）作為磷源。至於無機化合物，可使用硫酸鎂、硫酸鐵、硫酸錳及氯化鈣及其類似物，且除此之外，可包含胺基酸、維生素及適當前驅體及其類似物。此等介質或前驅體可以分批或連續方法（但不限於此）添加至培養產物中。

【0061】 在培養期間，藉由以適當方法將諸如氫氧化鉀、氨及磷酸之化合物添加至培養產物中，可調整培養產物之pH。另外，在培養期間，可使用消泡劑，諸如脂肪酸聚乙二醇酯抑制泡沫產生。此外，為了維持培養產物之好氧條件，可將氧氣或含氧氣體注射至培養產物中。培養產物之溫度可為27℃至37℃，特定言之，30℃至33℃。培養時段可持續至獲得所需有用物質之產量，且特定言之，其為20至120小時。

【0062】 回收胺基酸可使用所屬技術領域中已知之適當方法根據培養方法自培養基、培養溶液或微生物收集目標胺基酸。舉例而言，回收可藉由至少一種選自以下之方法進行：離心、過濾、陰離子交換層析、結晶、HPLC及其類似方法，但不限於此。用於生產胺基酸之方法可在回收之前、同時或之後另外包含純化步驟。

[有利效應]

【0063】 本發明係關於一種新穎的多核苷酸及一種使用其生產L-丙胺酸之方法，且引入該新穎的多核苷酸的微生物之L-丙胺酸生產能力顯著提高，在該多核苷酸中，編碼本發明之AvtA之基因的啟動子區之特定位置，且因此，該新穎的多核苷酸可有助於用於有效地生產L-丙胺酸。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

【0064】 在下文中，將藉由以下實施例更詳細地描述本發明。然而，此等實施例僅意欲說明本發明，但本發明之範圍不受此等實施例限制。

實施例1.構築在avtA基因之啟動子區中引入突變的菌株

【0065】 將構築如下突變菌株，其中在avtA基因之啟動子序列中引入突變，即第47個核苷酸G經T取代，且第48個核苷酸G經A取代，且第49個核苷酸C經A取代。

【0066】 特定言之，為了將突變引入野生型麩胺酸棒狀桿菌（ATCC13869）中（在由SEQ ID NO: 2表示的啟動子區中，將第47個核苷酸G取代為T，將第48個核苷酸G取代為A，且將第49個核苷酸C取代為A），透過PCR使用SEQ ID NO: 3與SEQ ID NO: 4及SEQ ID NO: 5與SEQ ID NO: 6的各引子對來獲得包含對應突變的基因片段。PCR條件係藉由在95℃下變性5分鐘，接著重複在95℃下變性30秒，在55℃下黏合30秒，且在72℃下聚合30秒30次，且接著在72℃下聚合5分鐘來進行。更特定言之，獲得使用SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4之引子擴增的501 bp之多核苷酸，及使用SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之引子擴增的501 bp之多核苷酸。使用輸注酶將所獲得之兩個基因片段連接於用限制酶BamHI及SalI（韓國專利公開案第10-2020-0136813號）切割的pDCM2，以構築一個包含avtA啟動子突變之基因取代載體，且將此命名為pDCM2-Pm_avtA。用於構築載體之引子序列之資訊展示於下表1中。

[表1]

SEQ ID NO:	引子名稱	序列（5'->3'）
3	Pm_avtA_AF	ctcggtacccggggatccGTCTGCTTTATGCAGGTA
4	Pm_avtA_AR	AAGAGACAAttaTATCTGCGTACTGC
5	Pm_avtA_BF	AGCAGTACGCAGATAtaaTTGTCTC
6	Pm_avtA_BR	gcatgcctgcaggtcgacGTACTTGGACAAGGTACC

【0067】 藉由電脈衝法（Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999）將載體轉形至麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869，且隨後將其塗抹在含有25 mg/L康黴素之複雜平板培養基上以固定菌落。此後，透過習知二次雜合過程，獲得包含對應突變且移除了所引入之載體的最終菌株。最後透過使用SEQ ID NO: 7（5'-CGTACACCACCATCAAGGACA-3'）及SEQ ID NO: 8（5'-CAAAGGACCCGAGCGAAGAGC-3'）之引子對的基因序列分析確認引入對應突變之菌株。將引入目標突變之菌株命名為CJ0011。

實施例2.確認其中引入新穎啟動子突變基因之菌株的L-丙胺酸產量

【0068】 為了比較由實施例1構築之突變菌株，即CJ0011菌株與野生型麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13869菌株之L-丙胺酸生產能力，藉由以下方法對其進行培養。

【0069】 特定言之，在將親本菌株，即麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13869菌株以及突變菌株，即CJ0011菌株分別接種於含有25 ml生產培養基之250 mm彎頭擋板式燒瓶（corner-baffled flask）中之後，將其在200 rpm下在30℃下培養46小時。

【0070】 完成培養之後，使用高效液相層析法來量測各培養基中之L-丙胺酸濃度，且用於各實驗菌株之培養基溶液中之L-丙胺酸濃度展示於下表2中。

[表2]

麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869菌株及麩胺酸棒狀桿菌CJ0011菌株之L-丙胺酸生產能力的比較

	ATCC13869 （親本菌株）	CJ0011 （突變菌株）
L-丙胺酸濃度（g/L）	5.7	7.5

【0071】 因此，如表2中所示，確認其中引入突變之麩胺酸棒狀桿菌CJ0011菌株產生濃度為7.5 g/L之L-丙胺酸，且與親本菌株相比，具有約132% L-丙胺酸生產能力。

【0072】 以上結果展示出，在由SEQ ID NO: 2表示之啟動子區之序列中的突變（即第47個核苷酸G經取代為T，且第48個核苷酸G經取代為A，且第49個核苷酸C經取代為A）顯著提高微生物之L-丙胺酸生產能力，且在由SEQ ID NO: 2表示之啟動子區之序列中，啟動子（其中第47個核苷酸G經取代為T，且第48個核苷酸G經取代為A，且第49個核苷酸C經取代為A）可有效用於生產L-丙胺酸之方法。

【0073】 實施例2中所使用之培養基之組成如下。

<活化培養基>

【0074】 牛肉萃取物5 g/L，聚蛋白胨（Polypeptone）10 g/L，酵母萃取物5 g/L，尿素2 g/L，氯化鈉（NaCl）2.5 g/L，瓊脂20 g/L，葡萄糖10 g/L，10 N氫氧化鈉（NaOH）100 μℓ/L

<種子培養基>

【0075】 葡萄糖（無水葡萄糖）20 g/L，聚蛋白胨10 g/L，酵母萃取物10 g/L，硫酸銨[$(NH_4)_2SO_4$] 10 g/L，尿素1.5 g/L，磷酸二氫鉀（KH_2PO_4）5.2 g/L，磷酸氫二鉀（K_2HPO_4）10.7 g/L，d-生物素1.8 mg/L，鹽酸硫胺9 mg/L，CAPA 9 mg/L，NCA 60 mg/L，硫酸鎂（$MgSO_4$）0.5 g/L

<生產培養基>

【0076】 碳酸鈣（$CaCO_3$）30 g/L，蔗糖57 g/L，BM 6 g/L，硫酸鎂（$MgSO_4$）0.5 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 50 g/L，KH_2PO_4 1 g/L，酵母萃取物2 g/L，乙酸銨6.28 g/L，d-生物素0.05 mg/L，鹽酸硫胺0.1 mg/L，$MnSO_4$ 6.7 mg/L，$FeSO_4$ 10 mg/L

【符號說明】

無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="FCP070831-
1130827.FIX.SEQ.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2024-08-27">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>112148623</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-12-14</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>OPP20238507TW</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>KR</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>10-2022-0190976</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-12-30</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">南韓商CJ第一製糖股份有限公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>CJ Cheiljedang Corporation</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">一種新穎的多核苷酸以及使用其生產L-丙胺酸之方
法</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>8</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>100</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..100</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>avtA promoter region_mutant</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..100</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q2">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gctgcattagagggtcgtatctcgatctaaaagcagtacgcagatataattgtctcttatga
agccaagcactagaagcaatgttcagccgtttcgcgtc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="2">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>100</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..100</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q3">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>avtA promoter region_wt</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..100</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q4">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gctgcattagagggtcgtatctcgatctaaaagcagtacgcagataggcttgtctcttatga
agccaagcactagaagcaatgttcagccgtttcgcgtc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="3">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>36</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..36</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q5">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Pm_avtA_AF</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..36</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q6">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctcggtacccggggatccgtctgctttatgcaggta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q7">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Pm_avtA_AR</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aagagacaattatatctgcgtactgc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q9">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Pm_avtA_BF</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agcagtacgcagatataattgtctc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
```

<INSDSeq>
<INSDSeq_length>36</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..36</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q11">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Pm_avtA_BR</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..36</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gcatgcctgcaggtcgacgtacttggacaaggtacc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q13">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>avtA_CF</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q14">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cgtacaccaccatcaaggaca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q15">
```

```
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>avtA_CR</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q16">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>caaaggacccgagcgaagagc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種多核苷酸，其中基於由SEQ ID NO: 2表示之核苷酸序列，對應於第47位置之核苷酸經T取代，且對應於第48位置及第49位置之核苷酸分別經A取代。

【請求項2】如請求項1之多核苷酸，其中該多核苷酸由SEQ ID NO: 1之核苷酸序列組成。

【請求項3】如請求項1或請求項2之多核苷酸，其中該多核苷酸具有啟動子活性。

【請求項4】一種重組載體，其包含如請求項3之多核苷酸；及可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因。

【請求項5】如請求項4之重組載體，其中該目標蛋白為胺基轉移酶。

【請求項6】一種棒狀桿菌屬（*Corynebacterium* sp.）微生物，其包含如請求項3之多核苷酸；及可操作地連接於該多核苷酸的編碼目標蛋白之基因。

【請求項7】如請求項6之棒狀桿菌屬微生物，其中該多核苷酸由SEQ ID NO: 1之核苷酸序列組成。

【請求項8】如請求項6之棒狀桿菌屬微生物，其中該目標蛋白為胺基轉移酶。

【請求項9】如請求項6至請求項8中任一項之棒狀桿菌屬微生物，其中該棒狀桿菌屬微生物為麩胺酸棒狀桿菌（*Corynebacterium glutamicum*）。

【請求項10】一種用於生產胺基酸之方法，其包含在培養基中培養如請求項6至請求項8中任一項之棒狀桿菌屬微生物。

【請求項11】如請求項10之用於生產胺基酸之方法，其中該胺基酸為L-丙胺酸。

【請求項12】一種用於生產胺基酸之組成物，其包含如請求項6至請求項8中

任一項之棒狀桿菌屬微生物。

【請求項13】如請求項12之用於生產胺基酸之組成物，其中該胺基酸為L-丙胺酸。