



(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 I819552 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：111112722

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 04 月 01 日

(51)Int. Cl. : C12N1/21 (2006.01)

C12N15/77 (2006.01)

C12P13/14 (2006.01)

C12R1/15 (2006.01)

(30)優先權：2021/06/30 南韓

10-2021-0085738

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

(KR)

南韓

(72)發明人：權娜羅 KWON, NARA (KR) ; 奉賢珠 BONG, HYUN-JU (KR) ; 李珍南 LEE, JIN

NAM (KR) ; 李亞潤 LEE, AH REUM (KR) ; 許政玉 HEO, JUNG OK (KR)

(74)代理人：陳昭明

(56)參考文獻：

TW I384070B

US 9631002B2

審查人員：吳思瑩

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 59 頁

(54)名稱

用於生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法

(57)摘要

本案是有關用於生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法。

The present application relates to a strain for producing L-glutamic acid in high concentration and a method for producing L-glutamic acid using the same.



I819552

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法

【英文發明名稱】 STRAIN FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID IN
HIGH CONCENTRATION AND METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMIC
ACID USING THE SAME

【中文】

本案是有關用於生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法。

【英文】

The present application relates to a strain for producing L-glutamic acid in high concentration and a method for producing L-glutamic acid using the same.

【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】 用於生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法

【英文發明名稱】 STRAIN FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID IN HIGH CONCENTRATION AND METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID USING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本案係有關於用以生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法。

【先前技術】

【0002】 左旋麩胺酸（L-Glutamic acid）為由發酵作用所生產的代表性胺基酸，且具有獨特、可區辨的嗜味，且因此為廣泛用於食品產業以及醫療領域及其他動物飼料領域的重要胺基酸。已知用以生產左旋麩胺酸的方法包括使用棒狀桿菌（*Corynebacterium*）、大腸桿菌（*Escherichia coli*）屬的微生物，或芽孢桿菌（*Bacillus*）、鏈黴菌（*Streptomyces*）、青黴菌（*Penicillium*）、克留氏菌（*Klebsiella*）屬、伊文氏桿菌（*Erwinia*）、泛菌（*Pantoea*）屬等的微生物的方法（美國發明專利第3,220,929號及6,682,912號）。

【0003】 目前，各種研究已被進行以研發在高效率下生產左旋麩胺酸之微生物及發酵製程技術。舉例而言，於棒狀桿菌屬之微生物中，目的材料特定(target material-specific)之方案，諸如增加編碼涉及於胺基酸生物合成的酵素之基因的

表現或移除對於胺基酸生物合成為非必要之基因是主要用於增強左旋麩胺酸生產率。

【發明內容】

[技術問題]

【0004】 本發明人等已盡最大努力在高產率下生產左旋麩胺酸，且結果，他/她們已確認左旋麩胺酸生產力藉由去活化（inactivated）之VKOR蛋白質而增加，藉此完成本案。

[解決問題的技術手段]

【0005】 本案的一個目的為提供棒狀桿菌屬之微生物，其中VKOR蛋白質（維生素K過氧化物還原酶家族蛋白，vitamin K epoxide reductase family protein）被去活化（inactivated）。

【0006】 本案的另一個目的是提供用以生產左旋麩胺酸的方法，其包括：於一培養基中培養其中VKOR蛋白質被去活化的棒狀桿菌屬之微生物。

【0007】 本案的再另一目的是提供用以生產左旋麩胺酸之組成物，其包括：棒狀桿菌屬之一微生物，其中VKOR蛋白質被去活化；用以培養該微生物的一培養基；或其等之組合。

【0008】 本案的再另一目的是提供用以生產棒狀桿菌屬之微生物的方法，其包括：使VKOR蛋白質去活化。

【0009】 本案的再另一目的是提供棒狀桿菌屬之微生物用於生產左旋麩胺酸的用途，其中VKOR蛋白質被去活化。

[有益的技术功效]

【0010】 其中本案之VKOR蛋白質被去活化的棒狀桿菌屬之生產左旋麩胺酸的微生物可在高產率下生產左旋麩胺酸，且因此可被有效地用於左旋麩胺酸之工業生產。

【實施方式】

【0011】 本案將於以下更詳細地被敘述。同時，在此揭露的各敘述及實施例可被分別應用於其他的敘述及實施例。亦即，在此所揭露的各種組份的所有組合被包括於本案的範圍內。再者，本案的範圍不應被以下所提供的特定敘述所限制。另外，所屬技術領域具有通常知識者可以在僅使用常規之實驗內容之下認知或確認本發明所述的具體實施例的許多均等實施方式。再者，這些均等實施方式意欲被涵蓋於本案中。

【0012】 本案的一個態樣提供棒狀桿菌屬之微生物，其中VKOR蛋白質（維生素K過氧化物還原酶家族蛋白質）被去活化。

【0013】 如此處所使用的，該用語「VKOR（維生素K過氧化物還原酶家族蛋白質）」是指具有降低維生素K 2,3-過氧化物及維生素K至維生素K氫醌（vitamin K hydroquinone）之活性的酵素（*Vitamins & Hormones* Volume 78, 2008, pages 103–130）。

【0014】 在一個實例中，本案之該VKOR蛋白質可衍生自一微生物。該微生物可為特別是衍生自棒狀桿菌屬（genus *Corynebacterium*）之微生物。更具體而言，其可衍生自麩胺酸棒狀桿菌（*Corynebacterium glutamicum*）、漠棒狀桿菌（*Corynebacterium deserti*）、克氏棒狀桿菌（*Corynebacterium crudilactis*）、艾非氏棒狀桿菌（*Corynebacterium efficiens*）、癒傷棒狀桿菌（*Corynebacterium callunae*）等，但不限於此。

【0015】 該VKOR蛋白質之胺基酸序列可由該VKOR基因編碼。舉例而言，該VKOR基因可為衍生自麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032之NCgl0775或衍生自麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869之BBD29_04485，但不限於此。

【0016】 本案之VKOR蛋白質可包括或由下列所組成：由具有與SEQ ID NO: 1之胺基酸序列80%或更高之序列同源性的胺基酸序列所代表的多肽。此外，本案之該VKOR蛋白質可具有具備與SEQ ID NO: 1之胺基酸序列80%或更高的序列同源性的胺基酸序列，或實質上由該胺基酸序列所組成。具體而言，該蛋白質可由以SEQ ID NO: 1之胺基酸序列所代表的多肽所組成。

【0017】 SEQ ID NO: 1之該胺基酸序列可自NIH GenBank（一已知資料庫）獲得。在本案中，SEQ ID NO: 1之胺基酸序列可包括具有與SEQ ID NO: 1之胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.7%，或99.9%之同源性或相等性地胺基酸序列。此外，顯見的是具有其中一部分之胺基酸序列被刪除、修飾、取代、保留取代或添加的胺基酸序列的蛋白質可落於本案之範圍內，只要該胺基酸序列具有這些同源性或相等性且顯示對應於包括SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的蛋白質之效能。

【0018】 舉例而言，其可在N端（N-terminus）、C端（C-terminus），及／或胺基酸序列內包括不變更本案蛋白質之功能的序列添加或刪除、自然發生之突變、沉默突變（silent mutations）或保留取代。

【0019】 如此處所述，該用語「保留取代」是指一胺基酸以具有相似結構及／或化學性質的另一胺基酸取代。此胺基酸取代可典型地基於在殘基的極性、電荷、溶解度、疏水性、親水性，及／或兩親本質（amphipathic nature）之相似度而發生。通常，保留取代對於蛋白質或多肽的活性可能具有很少的影響或不具影響。

【0020】 如此處所使用的，該用語「同源性」及「相等性」是指兩個給定的胺基酸序列或核苷酸序列之間的相似度之程度（degree of relatedness），且可以百分比表示。同源性及相等性之用語通常可被彼此互換使用。

【0021】 保留多核苷酸（conserved polynucleotide）或多肽之序列同源性或相等性可藉由標準對位演算法（standard alignment algorithms）而決定，且可與藉由程式所確立的預設空位罰分（default gap penalty）一起使用。實質上，同源或相等的序列一般預期與該等序列的整體或部分在中等或高度嚴密條件下雜交。顯見的是，該雜交亦包括與包含常見密碼子或雜交之多核苷酸中之退化密碼子的多核苷酸之雜交。

【0022】 任何兩個多核苷酸序列是否具有同源性、相似性或相等性可以，舉例而言，藉由已知的電腦演算法，諸如「FASTA」程式，使用預設參數而決定（Pearson *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444）。或者是，其可藉由使用EMBOSS組合（EMBOSS：The European Molecular Biology Open Software

Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16:276–277) (5.0.0或更新之版本) (GCG 程式package (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 387 (1984)) 之 Needleman程式, BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., *et al.*, *J MOLEC BIOL* 215: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, 及CARILLO *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073)而進行的Needleman-Wunsch演算法 (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453) 決定。舉例而言, 該同源性、相似性或相等性可使用國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的BLAST或ClustalW 來決定。

【0023】多肽或多核苷酸之同源性、相似性或相等性可藉由, 例如使用GAP電腦程式, 諸如揭露於Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482中之Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol.* 48: 443, 比對序列資訊而決定。簡而言之, 該GAP程式將同源性、相似性或相等性界定為相似的經對齊之符號 (即, 核苷酸或胺基酸) 之數量除以兩個序列之較短者中的符號之總數所獲得之值。該GAP程式的預設參數可包括: (1)二進位比較矩陣 (包含表示相同的數值1及表示不同的數值0) 以及揭露於 Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) 中的Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745之加權比較矩陣 (或EDNAFULL取代矩陣 (NCBI NUC4.4之EMBOSS版本)); (2)對各空位 (gap) 之3.0的罰分 (penalty) 以及各空位中每個符號額外0.10的罰分 (或是一個空位開啟10罰分, 且一空位延伸0.5罰分); 以及(3)對於終端空位無罰分。

【0024】 在本案中，編碼該VKOR蛋白質之多核苷酸可為該VKOR基因。於一實例中，該VKOR基因可包括NCgl0775或BBD29_04485基因等，如上所述。

【0025】 如此處所使用的，該用語「多核苷酸」，其是由藉由共價鍵連結成長鏈形狀的核苷酸單體所組成的核苷酸之聚合物，係為具有至少一特定長度的一DNA或RNA股（DNA or RNA strand）。更具體而言，其可指編碼該蛋白質的多核苷酸片段。

【0026】 編碼本案的VKOR蛋白質之多核苷酸可包括編碼由SEQ ID NO: 1所代表之胺基酸序列的核苷酸序列。作為本案的實例，本案之多核苷酸可具有或包括SEQ ID NO: 2之序列。另外，本案之該多核苷酸可由SEQ ID NO: 2之序列所組成，或實質上由SEQ ID NO: 2之序列所組成。具體而言，該VKOR蛋白質可由SEQ ID NO: 2之核苷酸序列所代表的該多核苷酸所編碼。

【0027】 本案之該多核苷酸可在編碼區中，於不改變該VKOR蛋白質之胺基酸序列的範圍內進行各種修飾，該等修飾是由密碼子退化（codon degeneracy）或考慮到其中本案之該VKOR蛋白質欲被表現的生物體所偏好的密碼子所致。具體而言，本案之該多核苷酸可具有或包括具有與SEQ ID NO: 2之序列70%或更高、75%或更高、76%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高，或98%或更高之同源性或相等性的核苷酸序列，或可由具有與SEQ ID NO: 2之序列70%或更高、75%或更高、76%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高，或98%或更高之同源性或相等性的核苷酸序列所組成，或實質上由具有與SEQ ID NO: 2之序列70%或更高、75%或更高、76%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高，或98%或更高之同源性或相等性的核苷酸序列所組成，但不限於此。

【0028】 另外，本案之該多核苷酸可包括可自一已知基因序列所製備之探針（probe），舉例而言，該已知基因序列可包括可與本案之該多核苷酸序列之部分或整體互補的序列在嚴密條件下雜交的任何序列而無限制。該用語「嚴密條件」是指使在多核苷酸之間特定雜交被允許（allowed）的條件。此等條件已具體揭露在文獻中（J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, 紐約, 1989；F. M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 紐約, 9.50–9.51, 11.7–11.8）。舉例而言，該等嚴密條件可包括：其中具有至少70%、至少75%、至少76%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%，或至少99%之高同源性或相等性之多核苷酸彼此雜交，但具有較低之同源性或相等性之多核苷酸不彼此雜交的條件，或南方雜交法之清洗條件，即，在對應於60°C、1× SSC、0.1% SDS，具體而言，60°C、0.1× SSC，及0.1% SDS；及更具體而言68°C、0.1× SSC，及0.1% SDS之溫度及鹽濃度下進行一次清洗，具體而言進行兩次或三次清洗的條件。

【0029】 雜交需要包含互補（complementary）序列之兩個核酸，雖然依據該雜交的嚴密性，鹼基（bases）之間的錯位（mismatches）是可能發生的。該用語「互補」是用於敘述可彼此雜交之核苷酸鹼基之間的關係。舉例而言，對於DNA，腺嘌呤（adenine）是與胸腺嘧啶互補，而胞嘧啶是與鳥糞嘌呤互補。因此，本案之多核苷酸可包括對整個序列互補的獨立（isolated）核苷酸片段，以及與其實質上相似的核酸序列。

【0030】 具體而言，具有與本案之多核苷酸之同源性或相等性的多核苷酸可使用於上述條件下包括在55°C之 T_m 值之雜交步驟的雜交條件加以偵測。另外，

該 T_m 值可為60°C、63°C，或65°C，但不限於此，且可由所屬技術領域具有通常知識者依據其目的而適當地調整。

【0031】 用於雜交多核苷酸的適當嚴密性係視該多核苷酸之長度及其互補性的等級而定，且此等變數在所屬技術領域中為已知的(例如Sambrook *et al.*)。

【0032】 如此處所使用的，該用語「微生物（或菌株）」包括所有野生種微生物，或經自然或人工基因修飾之微生物，且其可為其中由於插入外來基因或一內源基因（endogenous gene）之活性的增強或去活化（inactivation）而特定機制被弱化或增強的微生物，且可為包括基因修飾以生產所欲多肽、蛋白質或產物的微生物。

【0033】 如此處所使用的，該用語多肽活性之「去活化」為一綜合的概念，包括與其內生活性（endogenous activity）相比降低或無活性兩者。該去活化可與例如弱化（weakening）、缺少（deficiency）、下調（down-regulation）、減低、減少、衰減（attenuation）等用語互換使用。

【0034】 該去活化亦可包括：其中與由原始微生物所具有之多肽本身的活性相比，由於編碼該多肽之多核苷酸之突變所致之多肽活性本身降低或去除的情形；其中與原生菌株相比，由於抑制編碼該多肽之多核苷酸的基因表現，或抑制轉譯成多肽等所致之細胞內多肽活性整體等級及／或濃度（表現等級）被降低的情形；其中該多核苷酸完全未被表現的情形；及／或其中即使該多核苷酸被表現，沒有觀察到多肽活性的情形。如此處所使用的，該用語「內生活性」是指當由於自然或人工因素所致之基因修飾而發生表徵轉化時，一母株在轉化前或野生種或未經修飾之微生物原先具有的特定多肽之活性，且可與「修飾前活性」互換使用。「與該原生活性相比，該多肽之活性的「去活化（inactivated）」、「弱

化」、「缺陷」、「減少」、「下調」、「減低」或「衰減」之表達是指與在修飾前之母株或未經修飾之微生物原始具有的特定多肽之活性相比，該多肽之活性被降低。

【0035】 該多肽之活性的去活化可藉由本領域中所熟知的任何方法達成，但該方法不限於此，且可藉由應用本領域中已知的各種方法（例如，Nakashima *N et al.*, *Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2773–2793, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning* 2012等）達成。

【0036】 具體而言，本案之多肽活性的去活化可由下列達成：

【0037】 1) 刪除編碼該多肽之基因的部分或整體；

【0038】 2) 修飾表現控制區域（expression regulatory region，表現控制序列），使得編碼該多肽之基因的表現降低；

【0039】 3) 修飾構成該多肽之胺基酸序列，使得該多肽之活性被移除或弱化（例如，在該胺基酸序列上的一或多個胺基酸之刪除／取代／添加）。

【0040】 4) 修飾編碼該多肽之基因序列，使得該多肽之活性被移除或弱化（例如，該多肽基因之核苷酸序列上的一或多個核苷酸之刪除／取代／添加以編碼被修飾以消除或弱化該多肽之活性的多肽）；

【0041】 5) 修飾編碼該起始密碼子的核苷酸序列、編碼該多肽之基因轉譯的夏因-達爾加諾序列或5'-UTR區域；

【0042】 6) 導入互補地結合至編碼該多肽之基因轉錄之反股寡核苷酸（antisense oligonucleotide，例如，反股RNA）

【0043】 7) 添加與夏因-達爾加諾 (SD) 序列互補之序列於編碼該多肽之基因的SD序列前端 (front end) 以形成一二級結構，藉此抑制核醣體之附接 (attachment) ；

【0044】 8) 反轉錄工程 (reverse transcription engineering , RTE) ，其在編碼該多肽之基因序列的該開讀框 (open reading frame , ORF) 之3'端添加將被反轉錄之啟動子；或

【0045】 9) 選自上述第1)至8)項之二或多者的組合，但不特別限制於此。

【0046】 舉例而言：

【0047】 第1)項中之刪除編碼該多肽之基因的部分或整體的方法可藉由刪除編碼該染色體內之內源目標多肽的多核苷酸之整體，或藉由以具有經部分刪除之核苷酸的多核苷酸或標記基因進行多核苷酸之取代而達成。

【0048】 第2)項中之修飾表現控制區域 (或表現控制序列) 的方法可藉由在表現控制區域 (或表現控制序列) 上通過刪除、插入、非保留取代或保留取代或其等之組合誘發修飾而達成；或藉由以具有較弱活性之序列取代該序列而達成。該表現控制區域可包括啟動子、操作子序列、編碼核醣體結合位置的序列，及用以控制轉錄及轉譯的序列，但不限於此。

【0049】 第3)及4)項中之修飾胺基酸序列或多核苷酸序列的方法可藉由通過該多肽之胺基酸序列或編碼該多肽之該多核苷酸序列中之刪除、插入、非保留或保留取代，或其等之組合而在該序列上誘發修飾以弱化該多肽之活性，或以被修飾以具有較弱活性之胺基酸序列或多核苷酸序列或被修飾以不具有活性之胺基酸序列或多核苷酸序列取代該序列而達成，但不限於此。舉例而言，該基因之

表現可藉由導入突變至該多核苷酸序列中以形成一終止密碼子而被抑制或弱化，但不限於此。

【0050】 第5)項之修飾編碼該起始密碼子的核苷酸序列或編碼該多肽之基因轉譯的5'-UTR區域的方法可藉由，例如，以編碼具有較該內源起始密碼子低的多肽表現率之另一起始密碼子的核苷酸序列取代該核苷酸序列而達成，但不限於此。

【0051】 第6)項中之導入互補地結合至編碼該多肽之基因轉錄的反股寡核苷酸(例如，反股RNA)的方法可見於文獻中(Weintraub, H. *et al.*, Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986)。

【0052】 第7)項中之添加與夏因-達爾加諾(SD)序列互補之序列在編碼該多肽之基因的該SD序列前端以形成二級結構，藉此抑制核糖體之附接的方法可藉由抑制mRNA轉譯或降低其速率而達成。

【0053】 第8)項中之在編碼該多肽之基因序列的該開讀框(open reading frame, ORF)之3'端添加將被反轉錄之啟動子的反轉錄工程(RTE)可藉由形成與編碼該多肽之基因的轉錄互補的一反股核苷酸，藉此弱化活性而達成。

【0054】 如此處所使用的，該用語，一多肽之活性的「增強」是指與其內生活性(endogenous activity)相比，多肽之活性被增加。該增強可與下列用語互換使用：例如活化(activation)、上調(up-regulation)、過度表現(overexpression)、增加(increase)等。特別是，活化、增強、上調、過度表現及增加之用語可包括表現原先並未擁有的活性，或與內生活性或修飾前之活性相比，其活性經增強的兩種情形。該「內生活性」是指母株在修飾前所原先擁有的特定多肽之活性，或

當由於天然或人工因素而導致之基因變異而發生特性轉變時，由未經修飾之微生物所原先擁有的特定多肽之活性。該用語可與「修飾前活性」互換使用。與多肽之內生活性相比，多肽之活性之該「增強」、「上調」、「過度表現」，或「增加」係指相較於由母株在修飾前原先所擁有，或未經修飾之微生物原先所擁有的特定多肽之該活性及／或濃度（表現等級），該多肽之活性及／或濃度（表現等級）被增強。

【0055】 該增強可藉由導入外源多肽，或藉由增強該內生多肽之活性及／或濃度（表現等級）而達成。該多肽之活性的增強可藉由增加多肽的活性程度、表現等級，或自多肽所分泌（*excreted*）之產物的量的增加而確認。

【0056】 該多肽之活性的增強可藉由本技術領域中所熟知的各種方法施行，且只要與修飾前之微生物相比其可增強目標多肽之活性，則未受限制。具體而言，所屬技術領域中具有通常知識者所熟知的分子生物學之例行方法的基因工程及／或蛋白工程可被使用，但該方法不限於此（例如， *Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1–16, *Sambrook et al., Molecular Cloning* 2012，等）。

【0057】 具體而言，本案之多肽的活性之增強可藉由以下達成：

【0058】 1) 增加編碼該多肽之多核苷酸的細胞內複製數（*intracellular copy number*）；

【0059】 2) 以具有強活性之序列取代編碼該染色體上的多肽之基因的表現控制區；

【0060】 3) 修飾編碼該起始密碼子之核苷酸序列或編碼該多肽之基因轉錄的5'-UTR區；

【0061】 4) 修飾該多肽之胺基酸序列，使得該多肽之活性被增強；

【0062】 5) 修飾編碼該多肽之該多核苷酸序列，使得該多肽之活性被增強（例如，修飾該多肽基因之該多核苷酸序列，以編碼被修飾以增強多肽之活性的該多肽）；

【0063】 6) 導入具有該多肽之活性之一外源多核苷酸或編碼其之一外源多核苷酸；

【0064】 7) 編碼該多肽之該多核苷酸的密碼子最佳化（codon optimization）；

【0065】 8) 分析該多肽之三級結構，並藉此選擇及修飾該暴露位置，或對其進行化學修飾；或

【0066】 9) 選自上述第1)至8)項之二或多者之組合，但不特別限於此。

【0067】 更具體而言，

【0068】 第1)項之增加編碼多肽之多核苷酸的細胞內複製數的方法可藉由將一載體（vector）導入至宿主細胞而達成，其中該載體是被可操作地連結至編碼該多肽的多核苷酸，且得以獨立於宿主細胞複製及運作。或者是，該方法可藉由導入編碼該多肽的多核苷酸的一份複製或二份複製至宿主細胞中的染色體中而達成。染色體中的導入可藉由將能夠把該多核苷酸插入至宿主細胞中之該染色體中的載體導入宿主細胞中而進行，但不限於此。

【0069】 第2)項之以具有強活性之序列取代編碼該染色體上的多肽之基因的表現控制區（或表現控制序列）的方法可由，例如，通過刪除、插入、非保留

或保留取代，或其等之組合而在序列上誘發修飾，用以進一步增強該表現控制區域的活性，或以具有較強活性之序列取代該序列而達成。該表現控制區域可包括，但不特別限制於，一啟動子（**promoter**）、一操作子序列、編碼一核醣體結合位置（**ribosome binding site**）之序列，以及控制轉錄及轉譯之終止的序列。於一實例中，該方法可包括以較強啟動子取代原始啟動子，但不限於此。

【0070】 強啟動子之實例可包括CJ1至CJ7啟動子（US 7662943 B2）、乳糖啟動子（**lac promoter**）、色胺酸啟動子（**trp promoter**）、**trc**啟動子、**tac**啟動子、 λ 噬菌體PR啟動子（**lambda phage PR promoter**）、PL啟動子、**tet**啟動子、**gapA**啟動子、SPL7啟動子、SPL13(sm3)啟動子（US 10584338 B2）、O2啟動子（US 10273491 B2）、**tkl**啟動子、**yccA**啟動子等，但不限於此。

【0071】 第3)項之修飾編碼該起始密碼子之核苷酸序列或編碼多肽之基因轉錄的5'-UTR區域的方法可為，例如，以編碼與內源起始密碼子相比具有多肽之較高表現率的另一起始密碼子之核苷酸序列取代該核苷酸序列，但不限於此。

【0072】 第4)及5)之修飾胺基酸序列或多核苷酸序列的方法可藉由通過該多肽之胺基酸序列或編碼該多肽之該多核苷酸序列之刪除、插入、非保留或保留取代，或其等之組合而在序列上誘發修飾，使得該多肽的活性增強，或以被修飾以具有較強活性之胺基酸序列或多核苷酸序列，或被修飾以具有經增加之活性的胺基酸序列或多核苷酸序列取代該序列而達成，但不限於此。具體而言，該取代可藉由通過同源重組將多核苷酸插入至染色體而進行，但不限於此。此處所使用的載體可進一步包括一選擇標記（**selection marker**）用於確認染色體的插入。選擇標記是與如上所述者相同。

【0073】 第6)項中之具有該多肽之活性的外源多肽之導入的方法可藉由將編碼表現與該多肽相同或相似活性之多肽的外源多核苷酸導入宿主細胞而達成。該外源多核苷酸可不限於其起源或序列而被使用，只要該外源多核苷酸表現與該多肽相同或相似之活性。該導入可藉由由所屬技術領域中具有通常知識者適當選擇的已知轉化方法而進行，且通過該經導入之多核苷酸在宿主細胞中的表現使可生產該多肽，藉此增強其活性。

【0074】 第7)項中的編碼該多肽之該多核苷酸的密碼子最佳化的方法可藉由一內源多核苷酸 (endogenous polynucleotide) 的密碼子最佳化以增加其在一宿主細胞中的轉錄或轉譯，或藉由一外源多核苷酸 (foreign polynucleotide) 的密碼子最佳化，用以在一宿主細胞中達到其最佳化的轉錄或轉譯而達成。

【0075】 另外，第8)項之分析該多肽之三級結構藉此選擇及修飾暴露位置，或對其進行化學修飾的方法可藉由，例如，根據藉由以已儲存已知蛋白質之序列資訊的資料庫比對欲加以分析之多肽的序列資訊所得之序列相似性之等級而決定模板蛋白候選者，且因此根據該資訊確認其結構而藉以選擇並轉化或修飾將被修飾或化學修飾之暴露位置。

【0076】 該多肽之活性的增強可表示與表現於野生種或修飾前之微生物中之多肽的活性或濃度相比，該多肽的活性或濃度（表現等級）之增加，或自該多肽而獲得之產物量的增加，但不限於此。

【0077】 本案之微生物中之多核苷酸的部分或整體的修飾可藉由下列達成：(a) 使用用於微生物中之染色體插入之載體的同源重組，或使用工程化核酸酶 (engineered nuclease，例如，CRISPR-Cas9) 的基因組編輯 (genome editing)，

及／或(b) 可以光，諸如紫外光及輻射等，及／或化學處理誘發，但不限於此。修飾該基因的部分或整體的方法可包括使用DNA重組技術的方法。舉例而言，藉由注射包含與目標基因同源之核苷酸序列的一核苷酸序列或載體至該微生物以誘發同源重組，該基因的部分或整體可被刪除。經注入之該核苷酸序列或載體可包括一主要選擇標記，但不限於此。

【0078】 本案之載體可包括一DNA建構，其包含編碼可操作地連結至適當表現控制區（表現控制序列）之目標多肽的多核苷酸之核苷酸序列，使得能夠在合適的宿主細胞中表現該目標多肽。該表現控制序列可包括能夠起始轉錄之啟動子、用以控制轉錄的任何操作子序列，用以編碼合適mRNA核糖體結合位置的序列，以及用以控制轉錄及轉譯之終止的序列。在轉化成適當的宿主細胞後，該載體可獨立於該主體基因組複製或發揮功能，或可被整合至該基因組本身中。

【0079】 本案所使用之該載體不特別限制，且任何所屬技術領域中所知的載體可被使用。通常使用之載體的實例可包括天然或重組質體、黏接質體（cosmids）、病毒，及噬菌體（bacteriophages）。舉例而言，作為噬菌體載體或質體載體，pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A及Charon21A等可被使用；且作為質體載體，基於pDC、pBR、pUC、pBluescriptII、pGEM、pTZ、pCL，及pET等之載體可被使用。具體而言，pDZ、pDC、pDCM2、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BAC載體等可被使用。

【0080】 在一個實例中，編碼一目標多肽的多核苷酸可通過用於胞內染色體插入之載體而被插入該染色體中。該多核苷酸至染色體的插入可藉由任何本

技術領域中已知的方法進行，例如，藉由同源重組，但不限於此。該載體可進一步包括一選擇標記（**selection marker**）用於確認染色體的插入。選擇標記係用以選擇以該載體轉化之細胞，即，確認該目標核酸分子是否被插入，且提供可選擇之表型，諸如抗藥性、營養缺陷性（**auxotrophy**）、對細胞毒劑的抗性，或表面修飾蛋白之表現的標記可被使用。在經選擇性試劑處理的環境下，只有表現該選擇標記的細胞可存活或表現其他表型特徵，藉此得以選擇經轉化的細胞。

【0081】如此處所使用的，「轉化作用（**transformation**）」之用語是指導入包含編碼目標蛋白之多核苷酸的載體至宿主細胞或微生物中，使得由該多核苷酸所編碼的多肽可被表現於該宿主細胞中。只要該經轉化的多核苷酸可被表現於該宿主細胞中，無論該被轉化的多核苷酸是否被整合入且位於該染色體中，或位於染色體外（**extrachromosomally**）皆可，且可包括上述兩種情形。另外，該多核苷酸可包括編碼目標多肽的DNA及／或RNA。只要該多核苷酸可被導入至宿主細胞並於其中被表現，該多核苷酸可以任何形式被導入。舉例而言，該多核苷酸可以表現匣（**expression cassette**）的形式被導入至該宿主細胞中，其是包括對於其自主表現（**autonomous expression**）為必須的所有元素的基因建構（**gene construct**）。該表現匣一般可包括可操作地連結至該多核苷酸的啟動子、轉錄終止子（**transcription terminator**）、核糖體結合位置，或轉譯終止子（**translation terminator**）。該表現匣可呈得以自我複製之表現載體的形式。另外，該多核苷酸可以其當下的形式被導入至宿主細胞並可操作地連結至對於宿主細胞中之表現所需的序列，但不限於此。

【0082】再者，如此處所使用的，該用語「可操作地連結(operably linked)」是指該多核苷酸序列是功能性地連結(functionally linked)至起始及調解(mediating)編碼本案之目標多肽之該多核苷酸的轉錄的一啟動子序列。

【0083】本案的微生物可為其中VKOR蛋白質或編碼該蛋白質的一多核苷酸為去活化的一微生物；或通過一載體之基因修飾而使得該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質的一多核苷酸為去活化的一微生物(即，一重組微生物)，但不限於此。該載體是如上所述。

【0084】本案之該微生物可為具有生產左旋麩胺酸之能力的微生物。

【0085】本案之該微生物可為具有自然生產左旋麩胺酸之能力的微生物，或其中已藉由使該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之多核苷酸去活化，而將生產左旋麩胺酸之能力給與不具生產左旋麩胺酸之能力的母株中的微生物，但不限於此。

【0086】於一實例中，本案之該重組微生物為以使得該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之該多核苷酸被去活化的載體所轉化，且該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之該多核苷酸因此被去活化之微生物，且可包括所有能夠藉由使該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之該多核苷酸被去活化而生產左旋麩胺酸的微生物。

【0087】為了本案之目的，本案之重組微生物可為與天然野生種微生物或藉由包括該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之多核苷酸而生產左旋麩胺酸的微生物相比，在天然野生種微生物或是藉由包括該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之多核苷酸而生產左旋麩胺酸的微生物中，藉由該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之該

多核苷酸被去活化，而左旋麩胺酸生產力被增加的微生物。在一實例中，該未經修飾之微生物，其中VKOR蛋白質未被去活化，其是用以進行比較的一目標菌株，用以決定左旋麩胺酸生產力的增加，可為麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869菌株，其中已知為左旋麩胺酸生產菌株之*odhA*基因被刪除，或是麩胺酸棒狀桿菌BL2菌株，其已知為左旋麩胺酸生產NTG突變菌株（KFCC11074，韓國發明專利第10-0292299號），但不限於此。

【0088】 在一實例中，具有增加之生產力之該重組菌株可具有與修飾前之母株或一未經修飾之微生物相比約1%或更高，具體而言約1%或更高、約2.5%或更高、約5%或更高、約6%或更高、約7%或更高、約8%或更高、約9%或更高、或10%或更高、約14.3%或更高、約20%或更高、約28.6%或更高、約30%或更高、約31.9%或更高、約33.3%或更高、約37.7%或更高、約40%或更高、約42.9%或更高、約46.3%或更高、約50%或更高或約52.4%或更高（該上限並未特別限制，例如，約200%或更少、約150%或更少、約100%或更少、約50%或更少、約40%或更少、約30%或更少、約20%或更少或約15%或更少）的經增加之左旋麩胺酸生產力，但不限於此，只要其與修飾前之母株或未經修飾之微生物之生產力相比具有增加之+值（+ value）。於另一實例中，具有經增加之生產力之微生物可具有與修飾前之母株或未經修飾之微生物相比，約1.01倍或更高、約1.02倍或更高、約1.03倍或更高、約1.05倍或更高、約1.06倍或更高、約1.07倍或更高、約1.08倍或更高、約1.09倍或更高、約1.1倍或更高、約1.14倍或更高、約1.28倍或更高、約1.32倍或更高、約1.33倍或更高、約1.37倍或更高、約1.43倍或更高、約1.46倍或更高或約1.52倍或更高（該上限不特別限制，例如，約10倍或更低、約5倍或

更低、約3倍或更低，或約2倍或更低）的經增加之左旋麩胺酸生產力，但不限於此。

【0089】如此處所使用的，該用語「未經修飾之微生物」不排除包含可於微生物中自然發生之突變的菌株，且可指一野生種菌株本身或一天然種菌株（natural-type strain）本身，或在因自然或人工因素所致之基因修飾而改變表徵前的菌株。舉例而言，該未經修飾之微生物可指其中敘述於本案之VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之該多核苷酸並非為去活化的菌株，或在其去活化前的菌株。該「未經修飾之微生物」可被與「修飾前之菌株」、「修飾前之微生物」、「非突變菌株」、「未經修飾之菌株」、「非突變微生物」或「參考微生物」互換使用。

【0090】在一實施例中，本案之該微生物可為麩胺酸棒狀桿菌（*Corynebacterium glutamicum*）、停滯棒狀桿菌（*Corynebacterium stationis*）、克氏棒狀桿菌（*Corynebacterium crudilactis*）、漠棒狀桿菌（*Corynebacterium deserti*）、艾非氏棒狀桿菌（*Corynebacterium efficiens*）、癒傷棒狀桿菌（*Corynebacterium callunae*）、奇異棒狀桿菌（*Corynebacterium singulare*）、耐鹽棒狀桿菌（*Corynebacterium halotolerans*）、紋帶棒狀桿菌（*Corynebacterium striatum*）、產氨棒狀桿菌（*Corynebacterium ammoniagenes*）、污染棒狀桿菌（*Corynebacterium pollutisoli*）、亞胺棒狀桿菌（*Corynebacterium imitans*）、龜板棒狀桿菌（*Corynebacterium testudinoris*）或微黃棒狀桿菌（*Corynebacterium flavescens*），並且更具體地可以是麩胺酸棒狀桿菌，但不限於此。

【0091】 於另一實例中，本案之該重組微生物可為其中在左旋麩胺酸生物合成途徑中之一部分蛋白質之活性被額外增強，或於左旋麩胺酸降解途徑中之一部分蛋白質的活性被額外去活化，藉此增強左旋麩胺酸生產力的微生物。

【0092】 具體而言，本案之微生物可為其中該OdhA蛋白質被進一步去活化或該*odhA*基因被進一步刪除的微生物。更具體而言，本案之該微生物可為其中在麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869中該OdhA蛋白質被去活化的麩胺酸棒狀桿菌，或其中該*odhA*基因是自麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869刪除的微生物。該OdhA蛋白質可包括NCBI序列ID WP_060564343.1之胺基酸序列（SEQ ID NO: 32），且該*odhA*基因可包括NCBI GenBank BBD29_06050之核苷酸序列，但本案不限於此。

【0093】 然而，該OdhA蛋白質去活化或*odhA*基因刪除僅為一實例，且本案不限於此。另外，本案之微生物可為其中各種已知左旋麩胺酸生物合成途徑之蛋白質活性被增強，或該降解途徑之蛋白質活性被去活化的微生物。

【0094】 本案的另一態樣提供用於生產左旋麩胺酸的方法，其包括：於一培養基中培養其中VKOR蛋白質被去活化的棒狀桿菌屬之微生物。

【0095】 本案之用以生產左旋麩胺酸的方法可包括於一培養基中培養其中該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質之一多核苷酸被去活化的一微生物；或透過一載體進行基因修飾使得該VKOR蛋白質或編碼該蛋白質的一多核苷酸被去活化的棒狀桿菌屬之微生物的步驟。

【0096】 如此處所使用的，該用語「培養」表示本案之微生物在經適當控制的環境條件中生長。本案之該培養程序可於本領域中所知的合適的培養基及培養條件中進行。此培養程序可由本發明所屬技術領域中具有通常知識者根據

將被選擇之微生物輕易調整而使用。具體而言，該培養可為批次培養、連續培養，及／或進料-批次培養，但不限於此。

【0097】如此處所使用的，該用語「培養基」是指包含做為用於本案之該微生物之培養為必須的營養物質做為主要成分之混合物，且其供應營養物質及生長因子，以及對於存活及生長為必要的水。具體而言，用於培養本案之微生物的培養基及其它培養條件可為任何用於常見的微生物培養之培養基而不特別限制。然而，本案之該微生物可在包含適當碳源、氮源、磷源、無機化合物、胺基酸，及／或維生素的一般培養基中，在好氧條件下，於調整溫度及pH值等下被培養。

【0098】具體而言，用於棒狀桿菌屬之微生物的培養基可見於文獻中（“Manual of Methods for General Bacteriology” by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)）。

【0099】在本案中，該碳源可包括碳水化合物，諸如葡萄糖、蔗糖（saccharose）、乳糖、果糖、蔗糖（sucrose）、麥芽糖等；糖醇，諸如甘露醇、山梨醇等；有機酸，諸如丙酮酸、乳酸、檸檬酸等；胺基酸，諸如麩胺酸、甲硫胺酸、離胺酸等。另外，該碳源可包括天然有機營養素諸如澱粉水解物、糖蜜（molasses）、廢糖蜜（blackstrap molasses）、米糠（rice bran）、木薯（cassava）、甘蔗糖蜜（sugar cane molasses）、玉米浸液等。具體而言，碳水化合物諸如葡萄糖及滅菌預處理之糖蜜（即被轉化成還原糖的糖蜜）等可被使用，且適當量的各種其他碳源可被不受限地使用。這些碳源可被單獨使用或以其至少兩種的組合而使用，但不限於此。

【0100】該氮源可包括無機氮源，諸如氨（ammonia）、硫酸銨、氯化銨、醋酸銨、磷酸銨、碳酸銨、硝酸銨等；胺基酸，諸如麩胺酸、甲硫胺酸、麩醯胺等；以及有機氮源諸如蛋白腴（peptone）、NZ-胺（NZ-amine）、肉品萃取物、酵母萃取物、麥芽精萃取物、玉米浸液、酪蛋白水解物（casein hydrolysate）、魚或其等的分解產物、以及脫脂大豆餅或其等的分解產物等。這些氮源可被單獨使用或其等之二或多者相互組合而使用，但不限於此。

【0101】該磷源可包括磷酸二氫鉀（monopotassium phosphate）、磷酸氫二鉀（dipotassium phosphate）、或對應其等的含鈉之鹽類等。該無機化合物的實例可包括氯化鈉、氯化鈣、氯化鐵、硫酸鎂、硫酸鐵、硫酸錳、碳酸鈣等。另外，胺基酸、維生素，及／或合適的前驅物等可被包括。這些建構成分或前驅物可以批次或連續方式添加至培養基中。然而，此等磷源不限於此。

【0102】培養基之pH值可藉由在本案之微生物的培養期間以合適方式添加化合物，諸如氫氧化銨、氫氧化鉀、氨水、磷酸及硫酸等至培養基而調整。另外，在培養期間，諸如脂肪酸聚乙二醇酯（fatty acid polyglycol ester）的消泡劑（antifoaming agent）可被添加以抑制泡沫形成。另外，氧氣或含氧氣體可被注入該培養基以維持該培養基的好氧狀態（aerobic state）；或是，為了維持該培養基的厭氧（anaerobic）或微氧（microaerobic）狀態，氮氣、氫氣或二氧化碳氣體可被注入該等培養基，或是不注入氣體至該等培養基，但氣體並不限於此。

【0103】本案之培養中該培養基的溫度可為20°C至45°C，且更具體而言，25°C至40°C的範圍，且培養可進行約10至160小時，但並不限於此。

【0104】由本案之培養所生產的左旋麩胺酸可被釋放至培養基中或留存於細胞中。

【0105】 本案之用於生產左旋麩胺酸的方法可進一步包括製備本案之微生物的步驟、製備用以培養該微生物之培養基的步驟，或其等之組合（無論其順序，以任何順序），例如，在培養步驟之前。

【0106】 本案之用於生產左旋麩胺酸的方法可進一步包括自該培養物之培養基（culture medium，生長有培養物的培養基）或經培養之微生物回收左旋麩胺酸的步驟。該回收步驟可在該培養步驟後被進一步包括。

【0107】 於該回收步驟中，所欲之左旋麩胺酸可使用本案之培養微生物的方法收集，例如，根據批次培養、連續培養，或進料批次培養方法而使用本領域中已知的合適方法。舉例而言，諸如離心、過濾、以蛋白質結晶沉澱物進行處理（鹽析法（salting-out method））、萃取、超音波破壞（ultrasonic disruption）、超過濾（ultrafiltration）、滲透、各種層析法諸如分子篩層析法（膠體過濾）、吸附層析法、離子交換層析法、親和力層析法等、HPLC或其等之組合可被使用，且該所欲的左旋麩胺酸可自培養基或微生物使用本領域中已知之合適方法回收。

【0108】 再者，本案之用於生產左旋麩胺酸的方法可進一步包括一純化程序，其可使用本領域中合適的已知方法進行。於一實例中，當本案之用於生產左旋麩胺酸的方法包括回收步驟及純化步驟兩者時，該回收步驟及該純化步驟可無論順序被連續或間歇（intermittently）進行，或同步進行，或可被整合至一個步驟中，但該方法不限於此。

【0109】 在本案的方法中，該VKOR蛋白質、多核苷酸、載體及微生物等與在其他態樣中敘述者相同。

【0110】 本案的再另一態樣提供用以生產左旋麩胺酸的組成物，包括：棒狀桿菌屬之微生物，其中VKOR蛋白質被去活化；用於培養其之培養基；或其等之組合。

【0111】 本案之組成物可進一步包括通常使用在用於生產左旋麩胺酸的組成物中之任何合適的賦形劑，且此賦形劑可為，例如，一防腐劑、一濕潤劑、一分散劑、一懸浮劑、一緩衝劑、一穩定劑，或一等滲劑（isotonic agent）等，但不限於此。

【0112】 本案的再另一態樣提供用於生產棒狀桿菌屬之微生物的方法，包括將VKOR蛋白質去活化。

【0113】 本案的再另一態樣提供棒狀桿菌屬之微生物生產左旋麩胺酸的用途，其中VKOR蛋白質被去活化。

【0114】 該VKOR蛋白質、去活化、棒狀桿菌屬之微生物等，與其他態樣中所述者相同。

[實施本發明的模式]

【0115】 此後，本案將藉由實例被詳細敘述。然而，這些實例僅為用於說明目的之較佳實例，且因此，本案的範圍並非意欲限制於這些實例，或由這些實

例所限制。同時，此處未敘述之技術內容可由本案所屬技術領域或本案之相似技術領域中具有通常知識者充分理解且輕易實施。

實例1：使用轉位子（**transposon**）之隨機突變庫之建構

實例1-1：衍生自野生種麩胺酸棒狀桿菌之具有左旋麩胺酸生產力之麩胺酸棒狀桿菌株的建構

【0116】 為了生產衍生自野生種麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869之具有左旋麩胺酸生產力之菌株，其中該 *odhA* 基因被刪除的一麩胺酸棒狀桿菌 ATCC13869 Δ *odhA* 菌株基於先前文獻（*Appl Environ Microbiol.* 2007 Feb;73(4):1308–19. Epub 2006 Dec 8.）被製備。

【0117】 具體而言，為了刪除該 *odhA* 基因，該 *odhA* 基因的上游及下游區域通過PCR，使用SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4，及SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之引子對，基於該野生種麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869染色體DNA作為模板而獲得。Solg™ Pfu-X DNA聚合酶被用作聚合酶，且PCR在下列PCR放大條件下進行：95°C下5分鐘之變性作用（denaturation）；隨後進行30循環95°C下30秒之變性作用，55°C下退火30秒，及72°C下聚合作用60秒；及接著72°C下聚合作用5分鐘。

【0118】 經放大之 *odhA* 的上游及下游區域及以 *Sma*I 限制酵素切割（cleaved）而用於染色體轉化之該pDCM2載體，使用吉卜森組件方法（Gibson assembly method，DG Gibson *et al.*，NATURE METHODS, Vol. 6 No. 5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix）複製以獲得一重組載體，且該所得之載體被命名為pDCM2- Δ *odhA*。該複製藉由混合以經計算之莫耳數的吉卜森組件試劑以及各基因片段進行，隨後於50°C培養（incubating）1小時。

【0119】 由此製備之pDCM2-ΔodhA載體藉由電穿孔法 (electroporation) 被轉化成麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869菌株，並受到次級交換 (secondary crossover) 藉此獲得其中染色體上之 *odhA* 基因被刪除的菌株。該基因的刪除通過使用SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8之基因組定序及PCR確認，且所得之菌株被命名為ATCC13869ΔodhA。

【0120】 此處所使用之引子序列顯示於下表1。

[表1]

SEQ ID NO:	名稱	序列
3	odhA_up_F	TGAATTCGAGCTCGGTACCCTTGAACGGAAT TGGGTGG
4	odhA_up_R	CCCAGGTGGCATCGGTACCTTCACCCAGCGC CACGCAG
5	odhA_down_F	CGCTGGGTGAAGGTACCGATGCCACCTGGG TTGGTCAAG
6	odhA_down_R	GTCGACTCTAGAGGATCCCCGGACAAGGAA TGGAGAGA
7	odhA_del_F	CTTACCGTTGTTGCCCTT
8	odhA_del_R	CTCCTTCACCCACATCATT

實例1-2：使用轉位子之隨機突變庫的建構

【0121】 為了獲得具有經增加之左旋麩胺酸生產力的菌株，一載體庫以下列方式建構。

【0122】 使用 EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™套組 (Epicentre) 所獲得之質體基於麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869ΔodhA作為母株，藉

由電穿孔法 (Appl. Microbiol. Biothcnol.(1999) 52:541-545) 轉化並分布於包含康黴素 (25 mg/L) 之複合式培養盤，藉此獲得約5,000個菌落。

<複合培養盤 (pH 7.0) >

【0123】 葡萄糖10克、蛋白胨10克、牛肉萃取5克、酵母萃取5克、腦心浸液 (Brain Heart Infusion) 18.5克、NaCl 2.5克、尿素2克、山梨醇91克、洋菜20克 (每升蒸餾水)

實例2：使用轉位子之隨機突變庫篩選

【0124】 實例1-2中所獲得的約5,000個菌落各自被接種 (inoculated) 至300微升 (μL) 的下列選擇性培養基 (selective medium) 上並於96孔深孔盤中於37°C下，1000 rpm下培養約48小時。

<選擇性培養基 (pH 7.0) >

【0125】 粗糖5%、1M 磷酸鹽緩衝液 (pH 8.0) 100 mL、HSM (水解大豆粉，hydrolyzed soybean meal) 0.096%、硫酸銨2.25%、磷酸二氫鉀0.1%、硫酸鎂0.04%、硫酸鐵10 mg/L、硫胺鹽酸鹽 (Thiamine-HCL) 0.2 mg/L、生物素0.3 mg/L (每升蒸餾水)

【0126】 培養完成後，左旋麩胺酸通過YSI (YSI 2900生物化學分析儀) 量測。10個菌株被選擇作為與該麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869ΔodhA (該母株) 相比

顯示高左旋麩胺酸值之突變菌株。其他菌落顯示與作為該母株之麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869 Δ odhA菌株相比下相似或較低之左旋麩胺酸值。

【0127】 經選擇的10個菌株被以上述相同方式再度培養，且結果，與該麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869 Δ odhA（該母株）相比具有增強之左旋麩胺酸生產力之最高的突變菌株ATCC13869 Δ odhA/mt-8被選擇。

實例3：經選擇之突變菌株之左旋麩胺酸生產力增加之原因的辨認

【0128】 基於實例2中所選擇之ATCC13869 Δ odhA/mt-8，由轉位子之隨機插入而刪除的基因使用製造者之手冊及套組的引子1（SEQ ID NO: 9）及引子2（SEQ ID NO: 10）分析。分析的結果，經確認的是基於NIH GenBank中登錄的核苷酸序列，包括SEQ ID NO: 2之該多核苷酸序列的基因（*BBD29_04485*）被去活化。

【0129】 此處所使用的引子序列顯示於下表2中。

[表2]

SEQ ID NO:	名稱	序列
9	引子 1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC
10	引子 2	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT

實例4：用於VKOR蛋白質去活化的重組載體之建構

實例4-1：用於編碼VKOR蛋白質之*BBD29_04485*基因之刪除的重組載體之建構

【0130】 如實例3中所確認，基因經刪除之重組載體被製備以確認當棒狀桿菌屬之菌株的染色體上編碼VKOR蛋白質之該*BBD29_04485*基因（SEQ ID NO: 2）被刪除時該左旋麩胺酸生產力是否被增強。

【0131】 針對此，SEQ ID NOS: 11至14之引子首先被合成以製備用於基因之刪除的片段。

【0132】 具體而言，*BBD29_04485*基因片段通過PCR，使用該等SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12，及SEQ ID NO: 13及SEQ ID NO: 14引子組，基於該野生種麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869染色體DNA作為模板而獲得。Solg™ Pfu-X DNA聚合酶被用作聚合酶，且該PCT在下列PCR放大條件下進行：95°C下5分鐘之變性作用；隨後進行30循環95°C下30秒之變性作用，55°C下退火 30秒，及72°C下聚合作用60秒；及接著72°C下聚合作用5分鐘。

【0133】 經放大之基因片段及以SmaI限制酵素切割而用於染色體轉化之該pDCM2載體，使用吉卜森組件方法複製以獲得一重組載體，該所得之載體被命名為pDCM2-Δ*BBD29_04485*。該複製藉由混合以經計算之莫耳數的吉卜森組件試劑以及各基因片段進行，隨後於50°C培養1小時。

【0134】 此處所使用之引子序列顯示於下表3。

[表3]

SEQ ID NO:	名稱	序列
11	BBD29_0448 5_up_F	AATTCGAGCTCGGTACCCGTGAGTCCAACCAGGTCGAAG
12	BBD29_0448 5_up_R	CTGAAAGCCTTAAATGCTGGCTTGATTTCTTGTGCTGTG

13	BBD29_0448 5_down_F	ACAAGAAATCAAGCCAGCATTTAAGGCTTTCAGGCCG
14	BBD29_0448 5_down_R	CGACTCTAGAGGATCCCCGTATCGACAAGGGTGAGTGATG

實例4-2：用於改變編碼VKOR蛋白質之*BBD29_04485*的起始密碼子的重組載體之建構

【0135】 為了確認當棒狀桿菌屬之菌株之染色體上*BBD29_04485*基因之起始密碼子被改變成TTG及CTG時左旋麩胺酸生產力是否被增強，用於改變起始密碼子的重組載體首先被製備。

【0136】 針對此，SEQ ID NOS: 15至20之引子被合成以製備用以改變該基因之起始密碼子的片段。

【0137】 具體而言，基因片段通過PCR，使用該等SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 19，及SEQ ID NO: 18及SEQ ID NO: 20引子組，基於該野生種麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869染色體DNA作為模板而獲得。Solg™ Pfu-X DNA聚合酶被用作聚合酶，且該PCT在下列PCR放大條件下進行：95°C下5分鐘之變性作用；隨後進行30循環95°C下30秒之變性作用，55°C下退火30秒，及72°C下聚合作用60秒；及接著72°C下聚合作用5分鐘。

【0138】 經放大之基因片段及以SmaI限制酵素切割而用於染色體轉化之該pDCM2載體，使用吉卜森組件方法複製以獲得重組載體，且該等所得之載體被命名為 pDCM2-Δ*BBD29_04485*::*BBD29_04485*(g1t) 載體 及 pDCM2-

ΔBBD29_04485::BBD29_04485(glc)載體。該複製藉由混合以經計算之莫耳數的吉卜森組件試劑以及各基因片段進行，隨後於50°C培養1小時。

【0139】 此處所使用之引子序列顯示於下表4。

[表4]

SEQ ID NO:	名稱	序列
15	BBD29_04485_up_F_2	TTCGAGCTCGGTACCCGTTGATGATCAGGGAAGGCTGT
16	BBD29_04485_up_R_2	TGGATTTCGGTAGACAaGGGGAGACCTCCGGGTGGGAA
17	BBD29_04485_down_F_2	ACCCGGAGGTCTCCCCtTGTCTACCGAAATCCACAACG
18	BBD29_04485_down_R_2	ACTCTAGAGGATCCCCTCGGTCAGGTGTGTGTAAATAG
19	BBD29_04485_up_R_3	TGGATTTCGGTAGACAGGGGGAGACCTCCGGGTGGGAA
20	BBD29_04485_down_F_3	ACCCGGAGGTCTCCCCCTGTCTACCGAAATCCACAACG

實例4-3：用於改變編碼VKOR蛋白質之*BBD29_04485*的核醣體結合位置（RBS）的重組載體之建構

【0140】 為了弱化棒狀桿菌屬之菌株之染色體上的*BBD29_04485*基因，夏因-達爾加諾序列（SD）自包含該基因之頂端35個鹼基對及該開讀框（ORF）之N端起的35個鹼基對的該核苷酸序列被預測。

【0141】 基於上述核苷酸序列，總共三個核醣體結合序列候選群，即，RBS1、RBS2及RBS3，通過該RBS計算器（github）預測。結果，被預測的是與現有的核醣體結合序列相比，三個核醣體結合序列候選群的表現分別被降低50%、20%，及10%。

【0142】 所預測之核醣體結合序列顯示於表5。

[表5]

名稱	夏因-達爾加諾序列	預測之表現等級（ Predicted Expression Level）	表現等級（%）
原始	ACCCGGAGG	13122	100%
RBS1	CTCGAAAGT	6581	50%
RBS2	ACTCGAGGC	2620	20%
RBS3	GCCCTGGAC	1312	10%

【0143】 為了確認當該基因藉由改變棒狀桿菌屬之菌株之染色體上之BBD29_04485的核醣體結合序列而弱化時，該左旋麩胺酸生產力是否被增強，用於改變三個經預測之核醣體結合序列之各者的核醣體結合序列的重組載體被製備。

【0144】 針對此，SEQ ID NOS: 21至28之引子首先被合成以製備用以改變該基因之核醣體結合序列之片段。

【0145】 具體而言，基因片段通過PCR，使用該等SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 25、

SEQ ID NO: 24及SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 27，及SEQ ID NO: 24及SEQ ID NO: 28引子組，基於該野生種麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869染色體DNA作為模板而獲得。Solg™ Pfu-X DNA聚合酶被用作聚合酶，且該PCT在下列PCR放大條件下進行：95°C下5分鐘之變性作用；隨後進行30循環95°C下30秒之變性作用，55°C下退火30秒，及72°C下聚合作用60秒；及接著72°C下聚合作用5分鐘。

【0146】 經放大之基因片段及以SmaI限制酵素切割而用於染色體轉化之該pDCM2載體，使用吉卜森組件方法複製以獲得重組載體，且所得之載體被命名為pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS1 載體、pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS2 載體及pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS3載體。該複製藉由混合以經計算之莫耳數的吉卜森組件試劑以及各基因片段進行，隨後於50°C培養1小時。

【0147】 此處所使用之引子序列顯示於下表6。

[表6]

SEQ ID NO:	名稱	序列
21	BBD29_04485_up_F_4	TTCGAGCTCGGTACCCAGCATCTTCTTCTTCGCCGAA
22	BBD29_04485_up_R_4	GTAGACACGGGGAGAACTTTCGAGGGGAAAACGTTTGTTG
23	BBD29_04485_down_F_4	AACAAACGTTTTCCCCTCGAAAGTTCTCCCCGTGTCTACC
24	BBD29_04485_down_R_4	ACTCTAGAGGATCCCCCTTTTCTGAGCTGGAGGAACAA

25	BBD29_04485_up_R_5	GTAGACACGGGGAGAGCCTCGAGTGGGAAA ACGTTTGTTG
26	BBD29_04485_down_F_5	AACAAACGTTTTCCCACTCGAGGCTCTCCCC GTGTCTACC
27	BBD29_04485_up_R_6	GTAGACACGGGGAGAGTCCAGGGCGGGAAA ACGTTTGTTG
28	BBD29_04485_down_F_6	AACAAACGTTTTCCCGCCCTGGACTCTCCCC GTGTCTACC

實例5：衍生自其中編碼**VKOR**蛋白質之**BBD29_04485**被弱化的野生種麩胺酸棒狀桿菌之具有左旋麩胺酸生產力的菌株之建構

【0148】左旋麩胺酸生產力的效果藉由基於實例1中所製備的ATCC13869ΔodhA菌株，導入實例4中製備之pDCM2- Δ BBD29_04485載體、pDCM2-ΔBBD29_04485::BBD29_04485(g1t) 載 體 、 pDCM2-ΔBBD29_04485::BBD29_04485(g1c) 載 體 、 pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS1 vector, pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS2載體及pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS3載體而確認。

【0149】首先，pDCM2-ΔBBD29_04485載體藉由電穿孔法被轉化至麩胺酸棒狀桿菌ATCC13869ΔodhA菌株中，並受到次級交換以藉此獲得其中染色體上之**BBD29_04485**基因被刪除的菌株。該基因的操縱通過使用可分別放大同源重組上游及下游區域的SEQ ID NO: 29及SEQ ID NO: 30之基因組定序及PCR確認，且所得之菌株被命名為CA02-1624。

【0150】接 著 ， pDCM2-ΔBBD29_04485::BBD29_04485(g1t) 載 體 及 pDCM2-ΔBBD29_04485::BBD29_04485(g1c)載體藉由電穿孔法被轉化至麩胺酸

棒狀桿菌 ATCC13869 Δ odhA 菌株中，並受到次級交換以藉此獲得其中 *BBD29_04485* 基因之起始密碼子分別自 GTG 被改變為 TTG 及 CTG 之菌株。

【0151】該基因操作通過使用可分別放大同源重組上游及下游區域的 SEQ ID NO: 31 及 SEQ ID NO: 30 之基因組定序及 PCR 確認，且所得之菌株被命名為 CA02-1625 及 CA02-1630。

【0152】接著，pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS1 載體、pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS2 載體及 pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3 載體藉由電穿孔法被轉化至麩胺酸棒狀桿菌 ATCC13869 Δ odhA 菌株中，並受到次級交換以藉此獲得其中染色體上之 *BBD29_04485* 基因之核糖體結合序列被分別改變為 RBS1、RBS2 及 RBS3 之菌株。

【0153】該基因操作通過使用可分別放大同源重組上游及下游區域的 SEQ ID NO: 31 及 SEQ ID NO: 30 之基因組定序及 PCR 確認，且所得之菌株被命名為 CA02-1631、CA02-1632 及 CA02-1633。

【0154】此處所使用之引子序列顯示於表 7。

[表 7]

SEQ ID NO:	名稱	序列
29	BBD29_04485_del_F	ATAATCCACCAAAACTGCC
30	BBD29_04485_del_R	AGGTGTGTGTAAATAGGGA
31	BBD29_04485_seq_F	GTGGTTGTCTTCGATAGT

【0155】 總共6個菌株，CA02-1624、CA02-1625、CA02-1630、CA02-1631、CA02-1632及CA02-1633被以下列方式培養以基於該ATCC13869 Δ odhA菌株作為控制組，確認左旋麩胺酸生產力。

【0156】 以上菌株被接種於由種子培養基所組成之複合培養盤中並在30°C下培養20小時。接著，上列菌株使用一接種圈（inoculation loop）被接種至包含25毫升（mL）之如下所述之生產培養基的250毫升角檔板燒瓶（corner-baffle flask）中，並在搖晃中於30°C下，200 rpm下培養40小時。在培養完成後，左旋麩胺酸之生產藉由高效能液相層析法（high-performance liquid chromatography，HPLC）量測，且量測結果顯示於下表8中。

<種子培養基>

【0157】 葡萄糖1%、牛肉萃取0.5%、聚蛋白腯1%、氯化鈉0.25%、酵母萃取0.5%、洋菜2%、尿素0.2%，pH 7.2

<生產培養基>

【0158】 粗糖6%、碳酸鈣5%、硫酸銨2.25%、磷酸鉀0.1%、硫酸鎂0.04%、硫酸鐵10 mg/L、硫胺鹽酸鹽（Thiamine-HCL）0.2 mg/L、生物素50 μ g/L

[Table 8]

菌株名稱	左旋麩胺酸濃度（g/L ）	左旋麩胺酸濃度增加率（% ）

ATCC13869ΔodhA	2.1	-
CA02-1624	3.2	52.4%
CA02-1625	2.7	28.6%
CA02-1630	3.0	42.9%
CA02-1631	2.4	14.3%
CA02-1632	2.8	33.3%
CA02-1633	3.0	42.9%

【0159】 如表8所示，經確認的是與野生種衍生之ATCC13869ΔodhA菌株相比，在所有的其中*BBD29_04485*基因被刪除的CA02-1624菌株、其中該*BBD29_04485*基因之起始密碼子被弱化至TTG及CTG的該CA02-1625及CA02-1630菌株、以及其中*BBD29_04485*之核醣體結合序列被弱化至RBS1、RBS2，及RBS3的該CA02-1631、CA02-1632及CA02-1633菌株中，左旋麩胺酸的濃度被增加。

【0160】 基於這些結果，可見出不管具體的手段，只要該VKOR蛋白質之活性被去活化，左旋麩胺酸生產力會被增強。

【0161】 在這些菌株之中，CA02-1624依據布達佩斯條約於2021年1月13日寄存於韓國微生物保藏中心，存取碼為KCCM12928P。

實例 6：確認刪除 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亞硝基胍 (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine，NTG)-突變麩胺酸棒狀桿菌菌株中編碼VKOR蛋白質之*BBD29_04485*的效果

【0162】 除了衍生自野生種棒狀桿菌屬之菌株，為了確認該基因是否在具有增加之左旋麩胺酸生產力之衍生自棒狀桿菌屬之NTG-突變菌株表現相同效

果，於實例5中確認的基因之衰減效果於已知為生產左旋麩胺酸NTG突變菌株（KFCC11074，韓國發明專利No. 10-0292299）的麩胺酸棒狀桿菌BL2中確認。

【0163】 具體而言，左旋麩胺酸生產力之效果藉由導入在實例5中顯示增加40%或更高之左旋麩胺酸濃度的該pDCM2- Δ BBD29_04485載體、該pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(glc)載體，及該pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3載體之總共3個載體至KFCC11074菌株中而確認。

【0164】 首先，該pDCM2- Δ BBD29_04485載體藉由電穿孔法轉化成KFCC11074菌株並受到二次交換，藉此獲得其中染色體上之BBD29_04485基因被刪除的菌株。

【0165】 該基因操縱通過使用可分別放大同源重組上游及下游區域之SEQ ID NO: 29及SEQ ID NO: 30之基因組定序及PCR確認，且所得之菌株被命名為CA02-1634。

【0166】 接下來，該pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(glc)載體藉由電穿孔法被轉化成KFCC11074菌株並受到二次交換，藉此獲得其中BBD29_04485基因之起始密碼子自GTG改變成CTG的菌株。

【0167】 該基因操縱通過使用可分別放大同源重組上游及下游區域之SEQ ID NO: 31及SEQ ID NO: 30之基因組定序及PCR確認，且所得之菌株被命名為CA02-1635。

【0168】 接著，該pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3載體藉由電穿孔法被轉化成KFCC11074菌株並受到二次交換，藉此獲得其中染色體上*BBD29_04485*基因之核醣體結合序列被改變成RBS3的菌株。

【0169】 該基因操縱通過使用可分別放大同源重組上游及下游區域之SEQ ID NO: 31及SEQ ID NO: 30之基因組定序及PCR確認，且所得之菌株被命名為CA02-1636。

【0170】 總共3個經製備之菌株，CA02-1634、CA02-1635及CA02-1636被以下列方式培養以基於該KFCC11074菌株作為控制組，確認左旋麩胺酸生產力。

【0171】 以上菌株被接種於由種子培養基所組成之複合培養盤中並在30°C下培養20小時。接著，上列菌株使用一接種圈被接種至包含25毫升（mL）之如下所述之生產培養基的250毫升角檔板燒瓶中，並在搖晃中於30°C下，200 rpm下培養40小時。在培養完成後，左旋麩胺酸生產藉由高效能液相層析法（HPLC）量測，且量測結果顯示於下表9中。

<種子培養基>

【0172】 葡萄糖1%、牛肉萃取0.5%、聚蛋白腴1%、氯化鈉0.25%、酵母萃取0.5%、洋菜2%、尿素0.2%，pH 7.2

<生產培養基>

【0173】 粗糖6%、碳酸鈣5%、硫酸銨2.25%、磷酸鉀0.1%、硫酸鎂0.04%、硫酸鐵10 mg/L、硫胺鹽酸鹽（Thiamine-HCL）0.2 mg/L、生物素500 μ g/L

[表9]

菌株名稱	左旋麩胺酸濃度(g/L)	左旋麩胺酸濃度增加率(%)
KFCC11074	6.9	-
CA02-1634	10.1	46.4%
CA02-1635	9.5	37.7%
CA02-1636	9.1	31.9%

【0174】 如上表所示，經確認的是與該KFCC11074菌株相比，左旋麩胺酸濃度於其中該*BBD29_04485*基因被刪除之CA02-1634中被增加約46.4%。另外，經確認的是，左旋麩胺酸濃度於其中*BBD29_04485*基因之起始密碼子被弱化成CTG之CA02-1635中被增加約37.7%。再者，經確認的是左旋麩胺酸濃度於其中該*BBD29_04485*基因之核醣體結合序列被弱化成RBS3之CA02-1636中被增加約31.9%。

【0175】 本案所屬技術領域中具有通常知識者將了解本案可以其他具體形式實施而不背離本案之技術精神或必要特徵。所敘述之實施例在所有方面考量下僅用於說明目的而非限制性的。本案的範圍因此由所附之申請專利範圍而不是由前述說明所表示。在申請專利範圍之相等意義及範圍內的所有改變將被涵蓋於本案之範圍內。

【符號說明】

(無)

【生物材料寄存】

【0176】

寄存機構：韓國微生物保藏中心（外國）

寄存編號：KCCM12928P

寄存日期：2021年1月13日

【序列表】

<110> 南韓商CJ第一製糖股份有限公司 (CJ CheilJedang Corporation)
<120> 用於生產高濃度左旋麩胺酸的菌株及使用其生產左旋麩胺酸的方法
<130> OPA21393
<140> 111112722
<141> 2022-04-01
<150> KR 10-2021-0085738
<151> 2021-06-30
<160> 32
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 196
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> VKOR

<400> 1
Met Ser Thr Glu Ile His Asn Ala Pro Pro Lys Ala Pro Thr Trp Leu
1 5 10 15
Gly Trp Val Leu Met Ile Gly Gly Ile Ile Gly Leu Ile Leu Ser Val
20 25 30
Ile Ile Met Ala Glu Lys Leu Ala Ile Leu Glu Asp Pro Gly His Ile
35 40 45
Thr Ser Cys Asp Phe Asn Ala Val Leu Ala Cys Gly Asp Val Met Arg
50 55 60
Ser Gly Gln Ala Asn Ala Phe Gly Ile Pro Asn Pro Leu Ile Gly Ile
65 70 75 80
Ala Gly Phe Ala Ala Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Ile Leu Ala Gly
85 90 95
Gly Arg Phe Arg Gly Trp Phe Trp Phe Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr
100 105 110
Phe Ala Met Met Phe Cys His Trp Leu Ala Tyr Gln Ser Met Ser Val
115 120 125
Ile Arg Ala Leu Cys Pro Tyr Cys Met Gly Val Trp Thr Val Ser Ile
130 135 140
Ile Met Phe Val Leu Val Thr Ala Trp Asn Val Lys Thr Phe Ser Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ser Thr Phe Val Asn Ala Leu Tyr Lys Tyr Lys Trp Val Ile
165 170 175

Ala Ile Val Trp Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ala Ala Val Trp Ser Phe
180 185 190

Arg Tyr Met Phe
195

<210> 2
<211> 591
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> VKOR

<400> 2
gtgtctaccg aaatccacaa cgccccaccc aaggccccaa cttggcttgg ctgggtgctc 60
atgatcggcg gaataatcgg cctcattttg tccgtgatca tcatggccga aaaacttgcc 120
atcctcgagg atccccgtca catcaccagc tgcgatttca atgcagtcct agcttgtggc 180
gatgtcatgc gttccggcca agctaacgcg ttcggcatcc cgaatccgct catcggcatac 240
gccggtttcg ccgctgtcgc catcatcggc gccggcatcc tcgcgggcgg caggttccgc 300
ggttggttct ggttcggcgc ccaggccgga ctacttttg ccatgatgtt ctgccactgg 360
ctgcctacc aatccatgtc cgtcatccgc gcgctctgcc ctactgcat gggcgtgtgg 420
accgtatcga tcatcatgtt cgtgctggc actgcatgga atgtgaaaac ttccagcggc 480
tccgacagca cgttcgtcaa cgcactgtac aaatacaagt gggtcatacg gatcgtctgg 540
ctgctgtca tcgcagccgc agctgtgtgg tcattccgct acatgttcta g 591

<210> 3
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> odhA_up_F

<400> 3
tgaattcgag ctcggtaccc ttgaacggaa ttgggtgg 38

<210> 4
<211> 38
<212> DNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	odhA_up_R	
<400>	4	
	cccaggtggc atcgtacct tcacccagcg ccacgcag	38
<210>	5	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	odhA_down_F	
<400>	5	
	cgctgggtga aggtaccgat gccacctggg ttggtcaag	39
<210>	6	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	odhA_down_R	
<400>	6	
	gtcgactcta gaggatcccc ggacaaggaa tggagaga	38
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	odhA_del_F	
<400>	7	
	cttaccgttg ttgccctt	18
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	odhA_del_R	

<400> 8
ctccttcacc cacatcatt

19

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> primer 1

<400> 9
acctacaaca aagctctcat caacc

25

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> primer 2

<400> 10
ctaccctgtg gaacacctac atct

24

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> BBD29_04485_up_F

<400> 11
aattcgagct cggtaccctg gagtccaacc aggtcgaag

39

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> BBD29_04485_up_R

<400> 12
ctgaaagcct taaatgctgg cttgatttct tgtgctgtg

39

<210> 13
<211> 37

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_F	
<400>	13	
	acaagaaatc aagccagcat ttaaggcttt caggccg	37
<210>	14	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_R	
<400>	14	
	cgactctaga ggatccccgt atcgacaagg gtgagtgatg	40
<210>	15	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_F_2	
<400>	15	
	ttcgagctcg gtaccggttg atgatcaggg aaggctgt	38
<210>	16	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_R_2	
<400>	16	
	tggatttcgg tagacaaggg gagacctccg ggtgggaa	38
<210>	17	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_F_2	

<400>	17	
accggaggt	ctccccctgt	ctaccgaaat ccacaacg
		38
<210>	18	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_R_2	
<400>	18	
actctagagg	atccccctcg	tcaggtgtgt gtaaataag
		38
<210>	19	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_R_3	
<400>	19	
tggatttcg	tagacagggg	gagacctccg ggtgggaa
		38
<210>	20	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_F_3	
<400>	20	
accggaggt	ctccccctgt	ctaccgaaat ccacaacg
		38
<210>	21	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_F_4	
<400>	21	
ttcgagctcg	gtaccccagc	atcttcttct tcgccgaa
		38
<210>	22	

<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_R_4	
<400>	22	
	gtagacacgg ggagaacttt cgaggggaaa acgtttgttg	40
<210>	23	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_F_4	
<400>	23	
	aacaaacgtt ttcccctcga aagttctccc cgtgtctacc	40
<210>	24	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_R_4	
<400>	24	
	actctagagg atcccccttt tctgagctgg aggaacaa	38
<210>	25	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_R_5	
<400>	25	
	gtagacacgg ggagagcctc gagtgggaaa acgtttgttg	40
<210>	26	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_F_5	

<400>	26	
aacaaacgtt ttcccactcg aggctctccc cgtgtctacc		40
<210>	27	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_up_R_6	
<400>	27	
gtagacacgg ggagagtcca gggcgggaaa acgtttgttg		40
<210>	28	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_down_F_6	
<400>	28	
aacaaacgtt ttcccgccct ggactctccc cgtgtctacc		40
<210>	29	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_del_F	
<400>	29	
ataatccacc aaaactgcc		19
<210>	30	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BBD29_04485_del_R	
<400>	30	
aggtgtgtgt aaataggga		19

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> BBD29_04485_seq_F

<400> 31
gtggttgtct tcgatagt 18

<210> 32
<211> 1205
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> OdhA

<400> 32
Met Phe Gln Gln Phe Gln Lys Asp Pro Lys Ser Val Asp Lys Glu Trp
1 5 10 15
Arg Glu Leu Phe Glu Ala Gln Gly Gly Pro Asn Ala Thr Pro Ala Thr
20 25 30
Thr Glu Ala Gln Pro Ser Ala Pro Lys Glu Ser Ala Lys Pro Ala Pro
35 40 45
Lys Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ala Ala Pro Arg Val Glu Thr Lys Pro
50 55 60
Ala Ala Lys Thr Ala Pro Lys Ala Lys Glu Ser Ser Val Pro Gln Gln
65 70 75 80
Pro Lys Leu Pro Glu Pro Gly Gln Thr Pro Ile Arg Gly Ile Phe Lys
85 90 95
Ser Ile Ala Lys Asn Met Asp Ile Ser Leu Glu Ile Pro Thr Ala Thr
100 105 110
Ser Val Arg Asp Met Pro Ala Arg Leu Met Phe Glu Asn Arg Ala Met
115 120 125
Val Asn Asp Gln Leu Lys Arg Thr Arg Gly Gly Lys Ile Ser Phe Thr
130 135 140
His Ile Ile Gly Tyr Ala Met Val Lys Ala Val Met Ala His Pro Asp
145 150 155 160
Met Asn Asn Ser Tyr Asp Val Ile Asp Gly Lys Pro Thr Leu Ile Val
165 170 175
Pro Glu His Ile Asn Leu Gly Leu Ala Ile Asp Leu Pro Gln Lys Asp
180 185 190

Gly Ser Arg Ala Leu Val Val Ala Ala Ile Lys Glu Thr Glu Lys Met
195 200 205

Asn Phe Ser Glu Phe Leu Ala Ala Tyr Glu Asp Ile Val Thr Arg Ser
210 215 220

Arg Lys Gly Lys Leu Thr Met Asp Asp Tyr Gln Gly Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Asn Pro Gly Gly Ile Gly Thr Arg His Ser Val Pro Arg Leu
245 250 255

Thr Lys Gly Gln Gly Thr Ile Ile Gly Val Gly Ser Met Asp Tyr Pro
260 265 270

Ala Glu Phe Gln Gly Ala Ser Glu Asp Arg Leu Ala Glu Leu Gly Val
275 280 285

Gly Lys Leu Val Thr Ile Thr Ser Thr Tyr Asp His Arg Val Ile Gln
290 295 300

Gly Ala Val Ser Gly Glu Phe Leu Arg Thr Met Ser Arg Leu Leu Thr
305 310 315 320

Asp Asp Ser Phe Trp Asp Glu Ile Phe Asp Ala Met Asn Val Pro Tyr
325 330 335

Thr Pro Met Arg Trp Ala Gln Asp Val Pro Asn Thr Gly Val Asp Lys
340 345 350

Asn Thr Arg Val Met Gln Leu Ile Glu Ala Tyr Arg Ser Arg Gly His
355 360 365

Leu Ile Ala Asp Thr Asn Pro Leu Ser Trp Val Gln Pro Gly Met Pro
370 375 380

Val Pro Asp His Arg Asp Leu Asp Ile Glu Thr His Ser Leu Thr Ile
385 390 395 400

Trp Asp Leu Asp Arg Thr Phe Ser Val Gly Gly Phe Gly Gly Lys Glu
405 410 415

Thr Met Thr Leu Arg Glu Val Leu Ser Arg Leu Arg Ala Ala Tyr Thr
420 425 430

Leu Lys Val Gly Ser Glu Tyr Thr His Ile Leu Asp Arg Asp Glu Arg
435 440 445

Thr Trp Leu Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gly Met Pro Lys Pro Thr Gln
450 455 460

Ala Glu Gln Lys Tyr Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Glu Ala Phe
465 470 475 480

Glu Asn Phe Leu Gln Thr Lys Tyr Val Gly Gln Lys Arg Phe Ser Leu
485 490 495

Glu Gly Ala Glu Ala Leu Ile Pro Leu Met Asp Ser Ala Ile Asp Thr
 500 505 510
 Ala Ala Gly Gln Gly Leu Asp Glu Val Val Ile Gly Met Pro His Arg
 515 520 525
 Gly Arg Leu Asn Val Leu Phe Asn Ile Val Gly Lys Pro Leu Ala Ser
 530 535 540
 Ile Phe Asn Glu Phe Glu Gly Gln Met Glu Gln Gly Gln Ile Gly Gly
 545 550 555 560
 Ser Gly Asp Val Lys Tyr His Leu Gly Ser Glu Gly Gln His Leu Gln
 565 570 575
 Met Phe Gly Asp Gly Glu Ile Lys Val Ser Leu Thr Ala Asn Pro Ser
 580 585 590
 His Leu Glu Ala Val Asn Pro Val Met Glu Gly Ile Val Arg Ala Lys
 595 600 605
 Gln Asp Tyr Leu Asp Lys Gly Val Asp Gly Lys Thr Val Val Pro Leu
 610 615 620
 Leu Leu His Gly Asp Ala Ala Phe Ala Gly Leu Gly Ile Val Pro Glu
 625 630 635 640
 Thr Ile Asn Leu Ala Lys Leu Arg Gly Tyr Asp Val Gly Gly Thr Ile
 645 650 655
 His Ile Val Val Asn Asn Gln Ile Gly Phe Thr Thr Thr Pro Asp Ser
 660 665 670
 Ser Arg Ser Met His Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Cys
 675 680 685
 Pro Val Phe His Val Asn Gly Asp Asp Pro Glu Ala Val Val Trp Val
 690 695 700
 Gly Gln Leu Ala Thr Glu Tyr Arg Arg Arg Phe Gly Lys Asp Val Phe
 705 710 715 720
 Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Leu Arg Gly His Asn Glu Ala Asp Asp
 725 730 735
 Pro Ser Met Thr Gln Pro Lys Met Tyr Glu Leu Ile Thr Gly Arg Glu
 740 745 750
 Thr Val Arg Ala Gln Tyr Thr Glu Asp Leu Leu Gly Arg Gly Asp Leu
 755 760 765
 Ser Asn Glu Asp Ala Glu Ala Val Val Arg Asp Phe His Asp Gln Met
 770 775 780
 Glu Ser Val Phe Asn Glu Val Lys Glu Gly Gly Lys Lys Gln Ala Glu
 785 790 795 800
 Ala Gln Thr Gly Ile Thr Gly Ser Gln Lys Leu Pro His Gly Leu Glu

805					810					815						
Thr	Asn	Ile	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Gly	Gln	Ala	Phe	Ala	
			820				825					830				
Asn	Thr	Pro	Glu	Gly	Phe	Asn	Tyr	His	Pro	Arg	Val	Ala	Pro	Val	Ala	
		835				840					845					
Lys	Lys	Arg	Val	Ser	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Ile	Asp	Trp	Ala	Trp	
		850				855					860					
Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	
		865				870					875		880			
Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Asp	Ser	Arg	Arg	Gly	Thr	Phe	Thr	Gln	Arg	His	
			885					890					895			
Ala	Val	Ala	Ile	Asp	Pro	Ala	Thr	Ala	Glu	Glu	Phe	Asn	Pro	Leu	His	
			900					905					910			
Glu	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asn	Asn	Gly	Lys	Phe	Leu	Val	Tyr	Asn	
		915					920					925				
Ser	Ala	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Met	Gly	Phe	Glu	Tyr	Gly	Tyr	Ser	
		930					935					940				
Val	Gly	Asn	Glu	Asp	Ser	Val	Val	Ala	Trp	Glu	Ala	Gln	Phe	Gly	Asp	
		945					950					955		960		
Phe	Ala	Asn	Gly	Ala	Gln	Thr	Ile	Ile	Asp	Glu	Tyr	Val	Ser	Ser	Gly	
			965					970					975			
Glu	Ala	Lys	Trp	Gly	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Pro	His	
			980					985					990			
Gly	Tyr	Glu	Gly	Gln	Gly	Pro	Asp	His	Ser	Ser	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	
		995					1000					1005				
Phe	Leu	Gln	Leu	Cys	Ala	Glu	Gly	Ser	Met	Thr	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	
		1010					1015					1020				
Thr	Pro	Ala	Asn	His	Phe	His	Leu	Leu	Arg	Arg	His	Ala	Leu	Ser	Asp	
		1025		1030						1035		1040				
Leu	Lys	Arg	Pro	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Pro	Lys	Ser	Met	Leu	Arg	Asn	
			1045					1050					1055			
Lys	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Glu	Asp	Phe	Thr	Glu	Val	Thr	Lys	Phe	
			1060					1065					1070			
Gln	Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Pro	Asn	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	
		1075					1080					1085				
Lys	Val	Met	Leu	Val	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	
		1090		1095						1100						
Lys	Glu	Lys	Asp	Gly	Arg	Asp	Asp	Ile	Ala	Ile	Val	Arg	Ile	Glu	Met	
		1105		1110						1115		1120				

Leu His Pro Ile Pro Phe Asn Arg Ile Ser Glu Ala Leu Ala Gly Tyr
1125 1130 1135

Pro Asn Ala Glu Glu Val Leu Phe Val Gln Asp Glu Pro Ala Asn Gln
1140 1145 1150

Gly Pro Trp Pro Phe Tyr Gln Glu His Leu Pro Glu Leu Ile Pro Asn
1155 1160 1165

Met Pro Lys Met Arg Arg Val Ser Arg Arg Ala Gln Ser Ser Thr Ala
1170 1175 1180

Thr Gly Val Ala Lys Val His Gln Leu Glu Glu Lys Gln Leu Ile Asp
1185 1190 1195 1200

Glu Ala Phe Glu Ala
1205

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種經修飾的具有左旋麩胺酸生產力之棒狀桿菌（*Corynebacterium*）屬之微生物，其中VKOR蛋白質（維生素K過氧化物還原酶家族蛋白質）被去活化（inactivated），

其中該VKOR蛋白質是由以具有與SEQ ID NO: 1之一胺基酸序列90%或更高之相等性的一胺基酸序列所代表的多肽所組成。

【請求項2】 如請求項1所述之微生物，其中該VKOR蛋白質是衍生自該具有左旋麩胺酸生產力之棒狀桿菌屬。

【請求項3】 如請求項1所述之微生物，其中該VKOR蛋白質是由以SEQ ID NO: 1之一胺基酸序列所代表的多肽所組成。

【請求項4】 如請求項1所述之微生物，其中該VKOR蛋白質是由以SEQ ID NO: 2之核苷酸序列所代表的一多核苷酸所編碼。

【請求項5】 如請求項1所述之微生物，其中該VKOR蛋白質的去活化意指由SEQ ID NO: 2之核苷酸序列所代表之多核苷酸的刪除或弱化。

【請求項6】 如請求項1所述之微生物，其中該具有左旋麩胺酸生產力之棒狀桿菌屬之微生物為麩胺酸棒狀桿菌（*Corynebacterium glutamicum*）。

【請求項7】 如請求項1所述之微生物，其中該微生物與一母株或野生種菌株相比，具有經增加之左旋麩胺酸生產力。

【請求項8】 如請求項1所述之微生物，其中該微生物包含進一步被去活化的OdhA蛋白質。

【請求項9】 一種用以生產左旋麩胺酸的方法，其包含：於一培養基中培養其中 VKOR 蛋白質被去活化的具有左旋麩胺酸生產力之棒狀桿菌（*Corynebacterium*）屬之微生物，

其中該VKOR蛋白質是由以具有與SEQ ID NO: 1之一胺基酸序列90%或更高之相等性的一胺基酸序列所代表的多肽所組成。

【請求項10】 如請求項9所述之方法，其中該VKOR蛋白質是衍生自該具有左旋麩胺酸生產力之棒狀桿菌屬。

【請求項11】 如請求項9所述之方法，其中該VKOR蛋白質是由以SEQ ID NO: 1之一胺基酸序列所代表的多肽所組成。

【請求項12】 如請求項9所述之方法，其中該VKOR蛋白質是由以SEQ ID NO: 2之核苷酸序列所代表的一多核苷酸所編碼。

【請求項13】 如請求項9所述之方法，其中該VKOR蛋白質的去活化意指由SEQ ID NO: 2之核苷酸序列所代表之該多核苷酸的刪除或弱化。

【請求項14】 如請求項9所述之方法，其中該具有左旋麩胺酸生產力之棒狀桿菌屬之微生物為麩胺酸棒狀桿菌（*Corynebacterium glutamicum*）。

【請求項15】 如請求項9所述之方法，其中該微生物包含進一步被去活化的OdhA蛋白質。