



(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 I694151 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：107126887

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 02 日

(51)Int. Cl. : C12N9/10 (2006.01)

C12N15/77 (2006.01)

C12P13/24 (2006.01)

(30)優先權：2017/08/02 南韓

10-2017-0098205

(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：朴明根 PARK, MYUNG KEUN (KR) ; 權娜羅 KWON, NARA (KR) ; 李珍南 LEE, JIN NAM (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(83)生物材料寄存：

財團法人食品工業發展研究所 BCRC 910852 2018 年 10 月 01 日

(56)參考文獻：

EP 1647593B1

YUN ZHANG, "Genetic and biochemical characterization of Corynebacterium glutamicum ATP phosphoribosyltransferase and its three mutants resistant to feedback inhibition by histidine", Biochimie., Vol. 94, No.3, March 2012, page 829-838.

GEORG SCHENDZIELORZ, "Taking control over control: use of product sensing in single cells to remove flux control at key enzymes in biosynthesis pathways", ACS Synth Biol., Vol. 3, No.1, 17 January, 2014, page 21-29.

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：0 共 39 頁

(54)名稱

A T P 磷酸核糖基轉移酶變體及使用該變體製造 L-組胺酸之方法

(57)摘要

本公開涉及 ATP 磷酸核糖基轉移酶(HisG)蛋白質和使用該蛋白質製備組胺酸的方法。

The present disclosure relates to an ATP phosphoribosyltransferase (HisG) protein and a method for producing histidine using the same.

I694151

## 發明摘要

### 【發明名稱】(中文/英文)

ATP 磷酸核糖基轉移酶變體及使用該變體製造 L-組胺酸之方法

ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE VARIANT  
AND METHOD FOR PRODUCING L-HISTIDINE  
USING THE SAME

### 【中文】

本公開涉及 ATP 磷酸核糖基轉移酶(HisG)蛋白質和使用該蛋白質製備組胺酸的方法。

### 【英文】

The present disclosure relates to an ATP  
phosphoribosyltransferase (HisG) protein and a method for  
producing histidine using the same.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**本案無圖式。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

本案無化學式。

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

ATP 磷酸核糖基轉移酶變體及使用該變體製造 L-組胺酸之方法

ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE VARIANT  
AND METHOD FOR PRODUCING L-HISTIDINE  
USING THE SAME

## 【技術領域】

【0001】 本公開涉及 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體和使用該變體製備組胺酸的方法。

## 【先前技術】

【0002】 L-組胺酸是 20 種標準的胺基酸之一，從營養的角度來看，其中大多數不是成年人所必需的，但被歸類為成長中的兒童必需的胺基酸。此外，L-組胺酸參與重要的生理作用，如抗氧化、免疫調節等，因此使用於醫療產業(即治療胃潰瘍的藥劑、心血管藥劑的原料、胺基酸液等)。

【0003】 組胺酸主要可見於血紅素，且主要經由使用血粉作為原料，以蛋白質水解萃取方法生產，然而，它具有諸如低效率、環境污染等缺點。另一方面，L-組胺酸可以經由微生物發酵生產，但是大規模工業化尚未實現。這是因為 L-組胺酸的生物合成與核苷酸合成前體(即 PRPP)競爭，並且具有複雜的生物合成過程和需要高能量

的調節機制。

【0004】 經由突變和突變體選擇方法，以及以遺傳修飾調節菌株代謝的方法，改善了在發酵方法中使用的微生物的 L-組胺酸生產力。最近，已知使用微生物生產組胺酸是藉由 PRPP 經數個步驟進行生物合成來完成的。然而，ATP 磷酸核糖基轉移酶是參與組胺酸生物合成的第一個酶，其最終產物即組胺酸或其衍生物具有反饋抑制作用，在 L-組胺酸的工業大量生產是一個問題。(國際專利公開號 WO2014-029376)。

### 【發明內容】

#### [技術問題]

【0005】 本發明人為改善受 L-組胺酸抑制的 ATP 磷酸核糖基轉移酶投入大量努力，結果發現經引入新開發的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的微生物能以高產率生產 L-組胺酸，繼而完成本發明。

#### [技術方案]

【0006】 本公開的一個目的是提供一種 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體，其具有在 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列中位置 215 以精胺酸取代天冬醯胺酸，位置 233 以組胺酸取代甘胺酸，及位置 235 以麩醯胺酸取代蘇胺酸。

【0007】 本公開的另一個目的是提供編碼 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的多核苷酸。

【0008】 本公開的又另一個目的是提供包含編碼 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的多核苷酸的載體。

【0009】 本公開的又另一個目的是提供一種微生物，其經轉化以包含 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體和該蛋白質。

【0010】 本發明的另一個目的是提供一種生產組胺酸的方法，包括：在培養基中培養微生物；從培養的微生物或培養基回收組胺酸。

[優異效果]

【0011】 本公開提供了使用 ATP 磷酸核糖基轉移酶 (HisG) 蛋白質有效生產組胺酸的方法。

#### 【圖式簡單說明】

無。

#### 【實施方式】

【0012】 在下文中，將詳細描述本公開。同時，於此公開的每個解釋和例示性具體例可以應用於其他解釋和例示性具體例。意即，本文公開的各種因素的所有組合都屬於本公開的範圍。此外，本公開的範圍不應受下文提供的具體公開所限制。

【0013】 為了實現上述目的，本公開的一態樣提供了一種 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體，其具有在 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列中位置 215 以精胺酸取代天冬醯胺酸，位置 233 以組胺酸取代甘胺酸，和位置 235 以麩醯胺酸取代蘇胺酸。

【0014】 如本文所用，術語“ATP 磷酸核糖基轉移酶 (HisG)”是指催化化學反應的醣基轉移酶家族的酶，並且特

別屬於戊糖基轉移酶酶家族。該酶的通用名稱是 1(5-磷醯基-D-核糖基)-ATP：二磷酸磷醯基- $\alpha$ -D-核糖基轉移酶。該酶催化下列反應：1-(5-磷醯基-D-核糖基)-ATP+ATP 二磷酸+5 磷醯基- $\alpha$ -D-核糖 1-二磷酸。該酶催化組胺酸生物合成的第一步。

【0015】 在本公開中，ATP 磷酸核糖基轉移酶可與“HisG”或“HisG 蛋白質”互換使用。磷酸核糖基轉移酶的序列可以從已知的資料庫，即 NCBI 的 GenBank 獲得。例如，ATP 磷酸核糖基轉移酶可以是源自棒狀桿菌屬的 ATP 磷酸核糖基轉移酶，但不限於此。例如，ATP 磷酸核糖基轉移酶可具有 SEQ ID NO：13 的胺基酸序列，但不限於此。例如，ATP 磷酸核糖基轉移酶可具有 SEQ ID NO：13 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO：13 的序列具有 80% 或更高同源性或同一性的胺基酸序列，但是不限於此。具體地，ATP 磷酸核糖基轉移酶可以包括具有與 SEQ ID NO：13 和至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，或至少 99% 之一者的同源性或同一性的多肽。另外，顯然地，在序列的一部分中具有缺失，修飾，取代或添加的胺基酸序列的輔助蛋白質也可以作為本公開的 ATP 磷酸核糖基轉移酶，只要該胺基酸序列具有上述同源性或同一性，並具有相應於該蛋白質的作用。

【0016】 具體地，本公開的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體可以是具有 SEQ ID NO：13 的胺基酸序列的棒狀桿菌衍生的 ATP 磷酸核糖基轉移酶，其中從 N 末端的位置 233

的甘胺酸胺基酸殘基、位置 235 的蘇胺酸胺基酸殘基、或位置 215 的天冬醯胺酸胺基酸殘基被其他胺基酸取代。例如，位置 233 的甘胺酸胺基酸殘基可以被組胺酸取代；位置 235 的蘇胺酸胺基酸殘基可以被麩醯胺酸取代；或者位置 215 的天冬醯胺酸胺基酸殘基可以被精胺酸取代。

【0017】 具體地，ATP 磷酸核糖基轉移酶變體可以由 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列組成。在本公開中，ATP 磷酸核糖基轉移酶變體可以包括 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列具有 80% 或更高的同源性或同一性的胺基酸序列，但不限於此。具體地，本公開的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體可包括 SEQ ID NO：1 的多肽和與 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列具有至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，或至少 99% 的同源性或同一性的多肽。另外，顯然地，在序列的一部分中具有缺失，修飾，取代或添加的胺基酸序列的輔助蛋白質也可包含在本公開的範圍內，只要該胺基酸序列具有上述同源性或同一性，並具有相應於該蛋白質的作用。

【0018】 另外，基於密碼子簡併性，顯然由 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列組成的蛋白質或可轉譯成與上述蛋白質具有同源性或同一性的蛋白質的多核苷酸也可包括在本公開的範圍。另外，編碼具有由 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列組成的蛋白質活性的蛋白質的任何序列，其可以在嚴格條件下與可從已知基因序列製備的探針雜交來確定，例

如可包括與上述核苷酸序列的全部或部分互補的序列，也可包含於本發明範圍內而沒有限制。術語“嚴格條件”是指使多核苷酸之間的特異性雜交成為可能的條件。這些條件在參考文獻中具體描述(例如，J. Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; FM Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)。例如，該條件可以包括在具高同源性、80%或更高、特別是85%或更高、更具體地90%或更高、甚至更具體地95%或更高、甚至更具體地97%或更高、最特別是99%或更高的同源性或同一性的基因之間進行雜交，而不在具有低於上述同源性或同一性的基因之間進行雜交；或者在60°C，1×SSC和0.1% SDS的南方雜交常規洗滌條件下進行一次，特別是兩次或三次雜交，特別是在相應於60°C，0.1×SSC和0.1% SDS的鹽濃度和溫度下，更具體地68°C，0.1×SSC和0.1% SDS。

【0019】 即，儘管在本公開中描述為“具有特定 SEQ ID NO 的胺基酸序列的蛋白質或多肽”，但該蛋白質或多肽可具有與相應 SEQ ID NO 的胺基酸序列組成的多肽相同或相應的活性。在這種情況下，顯然在序列的一部分中具有缺失，修飾，取代，保守取代或添加的胺基酸序列的任何蛋白質也可用於本公開內容。例如，在具有與經修飾的多肽相同活性或對應的活性的情況下，它不排除在胺基酸序

列的上游或下游添加序列，其不改變蛋白質功能、天然可能發生的突變、其沉默突變或保守構成，即便有序列添加或突變，也顯然屬於本發明的範圍。

【0020】 術語“保守取代”是指以具有相似結構和/或化學性質的另一種胺基取代一種胺基酸。這種胺基酸取代通常可以基於所涉及殘基的極性，電荷，溶解度，疏水性，親水性和/或兩親性質的相似性來進行。例如，帶正電的(鹼性)胺基酸包括精胺酸、離胺酸和組胺酸；帶負電的(酸性)胺基酸包括麩胺酸和天冬胺酸；芳香胺基酸包括苯丙胺酸、色胺酸和酪胺酸；疏水性胺基酸包括丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸。

【0021】 因此，在本公開中，除了“具有特定 SEQ ID NO 的胺基酸序列的蛋白質或多肽”之外，“變體”可以包括一個或多個胺基酸的保守取代和/或修飾。例如，一些變體可包括其中已除去一個或多個部分的變體，例如 N-末端前導序列或跨膜結構域。其他變體可包括其中一部分已從 N-和/或 C-末端除去的變體。另外，變體可以包括其他修飾，其包括對多肽的性質和二級結構具有最小影響的胺基酸的缺失或添加。

【0022】 例如，多肽可以與蛋白質 N-末端參與共轉譯或轉譯後蛋白質轉移的信號(或前導)序列接合。另外，多肽還可以與另一個序列或連接基接合以鑑定、純化或合成該多肽。如本文所用，術語“變體”可以指變體、修飾、

經修飾蛋白質、經修飾多肽、突變體、突變蛋白、分歧物 (divergent) 等，並且不受限制，只要該術語指修飾即可。

【0023】 雜交需要兩個核酸具有互補序列，儘管鹼基之間的錯配可以是可能的，取決於雜交的嚴格性。術語“互補”用於描述可相互雜交的核苷酸鹼基之間的關係。例如，就 DNA 而言，腺苷與胸腺嘧啶互補，胞嘧啶與鳥嘌呤互補。因此，本公開還可以包括與整個序列互補的經分離核酸片段以及實質相似的核酸序列。

【0024】 具體地，可以使用包括雜交步驟和使用上述條件的雜交條件，以 55°C 的  $T_m$  值檢測具有同源性或同一性的多核苷酸。另外， $T_m$  值可以是 60°C、63°C 或 65°C，但不限於此，並且可以由本領域普通技術人員根據預期目的適當地調整。

【0025】 適合多核苷酸雜交的嚴格性取決於多核苷酸的長度和互補性，且相關的變數是本領域熟知的 (參見 Sambrook 等，同上，9.50-9.51, 11.7-11.8)。

【0026】 同源性或同一性是指與特定的胺基酸序列或核苷酸序列的相配程度，並且可以表示為百分比。

【0027】 術語“同源性”和“同一性”通常可彼此互換使用。

【0028】 保留多核苷酸或多肽序列的序列同源性或同一性可以經由標準對準演算法決定，並且可以使用由所使用的程式建立的預設缺口罰分 (gap penalty)。通常實質上同源或相同的序列通常預期在中等或高嚴格性下沿序列

的全長或該序列的全長的至少約 50%、約 60%、約 70%、約 80% 或約 90% 雜交。亦考慮在雜交多肽中含有簡併密碼子而不是密碼子的多核苷酸。

【0029】 任何兩個多核苷酸或多肽序列是否具有同源性、相似性或同一性可以使用已知的電腦演算法例如“FASTA”程式決定(Pearson 等, (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]]: 2444: 在 2444 中使用預設參數)。或者, 可以使用 NeedlemanWunsch 演算法(Needleman 和 Wunsch, 1970, J.Mol.Biol.48: 443-453)決定, 該演算法在 EMBOSS 套裝軟體的 Needleman 程式中進行((EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice 等, 2000, Trends Genet.16: 276-277)(5.0.0 版或其後版本)(GCG 程式套裝軟體(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12: 387(1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul, [S.][F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403(1990); 大型電腦指南, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 和 [CARILLO ETA/.] (1988)SIAM J Applied Math 48: 1073)。例如, 同源性、相似性或同一性可以使用國家生物技術資訊中心的 BLAST 或 ClustalW 決定。

【0030】 多核苷酸或多肽序列的同源性、相似性或同一性可以經由使用例如發表的 GAP 電腦程式(例如, Needleman 等, (1970), J Mol Biol.48: 443)比較序列資訊來確定(例如, Smith 和 Waterman, Adv.Appl.Math (1981)2:

482)。總之，GAP 程式將同源性、相似性或同一性定義為藉由將相似對準的符號(即，核苷酸或胺基酸)的數量除以兩個序列中較短的符號總數而獲得的值。GAP 程式的預設參數可以包括(1)一元比較矩陣(包含同一的值為 1，非同一的值為 0)和 Gribskov 等人的加權比較矩陣(1986)，Nucl. Acids Res. 14: 6745，如 Schwartz 和 Dayhoff 所揭露，eds., Atlas of Protein Sequence and Structure National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2)每個缺口罰分為 3.0，每個缺口中的每個符號額外罰 0.10(或缺口開放罰分為 10，延伸缺口罰分為 0.5); (3)對端缺口不予罰分。因此，如本文所用，術語“同源性”或“同一性”是指序列之間的相關性。

【0031】 本公開的另一態樣提供編碼 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的多核苷酸，或包含該多核苷酸的載體。

【0032】 如本文所用，術語“多核苷酸”是指由在鏈中共價鍵合的核苷酸單體組成的核苷酸聚合物，其實例是具有預定或更長長度的 DNA 或 RNA 鏈。具體地，多核苷酸是指編碼經修飾多肽的多核苷酸片段。

【0033】 在本公開中，編碼 ATP 磷酸核糖基轉移酶的胺基酸序列的基因是 *hisG* 基因，其可以特定地衍生自麩胺酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glutamicum*)。基於遺傳密碼子簡併性，編碼相同的胺基酸序列及其變體的核苷酸序列屬於本公開的範圍，具體地，它們可以由 SEQ ID NO: 2 表示，但不限於此。

【0034】 另外，關於經修飾多肽，編碼相同的胺基酸及其變體的核苷酸序列基於遺傳密碼子簡併性也屬於本公開的範圍。

【0035】 本公開的又一態樣提供宿主細胞，其包含編碼 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的多核苷酸，和提供經以包含編碼 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的多核苷酸的載體轉形的微生物。具體地，引入可以經由轉形進行，但不限於此。

【0036】 具體地，在本公開的包含 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的微生物中，相較於包含野生型 ATP 磷酸核糖基轉移酶的微生物，其組胺酸生產能力得到改善而不抑制宿主細胞的生長。因此，組胺酸能以高產率從這些微生物中獲得。

【0037】 如本文所用，術語“載體”是指包含編碼靶蛋白質的多核苷酸的核苷酸序列的 DNA 構建體，其中靶蛋白質與合適的調控序列可操作地連接，使其可以在合適的宿主中表達。調控序列包括能夠啟始轉錄的啟動子、用於調控轉錄的任何操縱子序列、編碼合適的 mRNA 核糖體結合結構域的序列、以及調控轉錄和轉譯終止的序列。以合適的宿主細胞轉形後，載體可以無關於宿主基因組地複製或作用，或者可以整合至宿主基因組本身。

【0038】 本公開中使用的載體不受特別限制，只要其能夠在宿主細胞中複製，並且可以使用本領域已知的任何載體。常規載體的實例可包括天然或重組質體、黏質體、

病毒和噬菌體。例如，*pWE15*、*M13*、*MBL3*、*MBL4*、*IXII*、*ASHII*、*APII*、*t10*、*t11*、*Charon4A* 和 *Charon21A* 可用作噬菌體載體或黏質體載體；*pBR* 型、*pUC* 型、*pBluescriptII* 型、*pGEM* 型、*pTZ* 型、*pCL* 型和 *pET* 型可用作質體載體。可用於本公開的載體不受特別限制，可以使用任何已知的表達載體。具體地，可以使用 *pDZ*、*pACYC177*、*pACYC184*、*pCL*、*pECCG117*、*pUC19*、*pBR322*、*pMW118* 或 *pCC1BAC* 載體。

【0039】 在一個具體例中，編碼染色體中靶蛋白質的多核苷酸可以經由用於染色體插入的載體以經修飾多核苷酸替換。可以藉由本領域已知的任何方法(例如，同源重組)插入多核苷酸至染色體中，但是該方法不限於此。

【0040】 如本文所用，術語“轉形”是指在宿主細胞中引入包含編碼靶蛋白質的多核苷酸的載體，而能夠在宿主細胞中表達由多核苷酸編碼的蛋白質的過程。對於經轉形多核苷酸，無關於經轉形多核苷酸是否插入宿主細胞的染色體並位於其中或位於染色體外，只要它可以在宿主細胞中表達，則包括兩種情況。另外，多核苷酸包括編碼靶蛋白質的 DNA 和 RNA。多核苷酸可以以任何形式插入，只要它可以被引入宿主細胞並在其中表達即可。例如，可以以表達卡匣的形式將多核苷酸引入宿主細胞中，該表達卡匣是包括自我表達所需的所有必需元件的基因構建體。表達卡匣通常可包括與多核苷酸可操作地連接的啟動子、轉錄終止信號、核糖體結合結構域和轉譯終止信號。表達卡

匣可以是能夠自我複製的表達載體形式。另外，多核苷酸可以原樣引入宿主細胞中並且可操作地連接至其在宿主細胞中表達所必需的序列，但該多核苷酸不限於此。

【0041】 另外，如本文所用，術語“可操作地連接”是指啟動子序列和上述基因序列之間的功能性連接，該啟動子序列啟動並介導編碼本公開內容的靶蛋白質的多核苷酸的轉錄。

【0042】 如本文所用，術語“生產組胺酸的微生物”或“具有組胺酸生產力的微生物”是指天然具有組胺酸生產能力的微生物，或其組胺酸生產能力係提供至沒有組胺酸生產能力的母菌株的微生物。

【0043】 生產組胺酸的微生物可以是細胞或微生物，其包括編碼經修飾多肽的多核苷酸或能夠經由轉形成包含編碼經修飾多肽的多核苷酸的載體來表達經修飾多肽。對於本公開的目的，宿主細胞或微生物可以是能夠產生 L-組胺酸的任何微生物，其包括 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體。例如，微生物可以是如埃希氏菌屬、沙雷氏菌屬、歐文氏菌屬、腸桿菌屬、沙門氏菌屬、鏈黴菌屬、假單胞菌屬、短桿菌屬或棒狀桿菌屬的微生物菌株，具體可以是棒狀桿菌屬的微生物，更具體地，可以是麩胺酸棒狀桿菌，但該微生物不限於此。

【0044】 如本文所用，術語“生產組胺酸的棒狀桿菌屬的生產組胺酸的微生物”是指棒狀桿菌屬的微生物，其具有天然或藉由修飾的組胺酸生產能力。已知組胺酸包含在

棒狀桿菌屬微生物的培養物中。然而，其組胺酸生產能力非常低，並且尚未解明生產中涉及的基因或機制。因此，本公開中的“具有組胺酸生產能力的棒狀桿菌屬的微生物”是指天然微生物本身，或其中插入了涉及組胺酸生產機制的外源基因或增強或失活內源基因的活性的棒狀桿菌屬的微生物，以便具有改善的組胺酸產生能力。

【0045】 如本文所用，“棒狀桿菌屬的微生物”可具體為麩胺酸棒狀桿菌、產胺棒狀桿菌、乳酸發酵短桿菌、黃色短桿菌、熱產胺棒狀桿菌、有效棒狀桿菌等，但不限於此。更具體地，棒狀桿菌屬的微生物可以是麩胺酸棒狀桿菌，即使暴露於高濃度的組胺酸，其細胞生長和存活也幾乎不受影響。

【0046】 本發明的又另一態樣提供一種生產組胺酸的方法，包括：培養本發明所述的微生物；從培養的微生物或培養基中回收組胺酸。

【0047】 在該方法中，培養微生物的步驟可以經由本領域已知的分批培養、連續培養和饋料分批培養進行，但不特別限於此。本文中，培養條件沒有特別限制，但是可以經由使用鹼性化學品(例如，氫氧化鈉、氫氧化鉀、或氨)或酸性化學品(例如，磷酸或硫酸)來維持最佳 pH(例如，pH 5 至 9，特別是 pH 6 至 8，並且最特別是 pH 6.8)。另外，可以經由在細胞培養物中添加氧氣或含氧氣體混合物來維持有氧狀態。培養溫度可以保持在 20℃ 至 45℃，具體地在 25℃ 至 40℃，並且培養可以進行約 10 小時至 160

小時，但是條件不限於此。由培養物產生的組胺酸可以分泌到培養基中或可以保留在細胞中。

【0048】 另外，用於培養的培養基可包括糖和碳水化合物(例如，葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麥芽糖、糖蜜、澱粉和纖維素)、油和脂肪(例如，大豆油、葵花籽油、花生油和椰子油)、脂肪酸(例如棕櫚酸、硬脂酸和亞麻油酸)、醇(例如甘油和乙醇)和有機酸(例如乙酸)單獨或組合的作為碳源；含氮有機化合物(如蛋白朮、酵母提取物、肉汁、麥芽提取物、玉米溶液、豆粕粉和尿素)或無機化合物(如硫酸銨、氯化銨、磷酸銨、碳酸銨和硝酸銨)單獨或組合的作為氮源；以及磷酸二氫鉀、磷酸氫二鉀或與其相應的含鈉鹽單獨或組合的作為磷源；但是不限於此。此外，培養基可含有必需的生長促進材料，例如其他金屬鹽(例如硫酸鎂或硫酸鐵)、胺基酸和維生素。

【0049】 根據培養方法，可以使用本領域已知的合適方法，進行本公開的培養步驟中產生的組胺酸的回收方法，從培養基中收集目標胺基酸。例如，可以使用離心、過濾、陰離子交換層析法、結晶和 HPLC，並且可以經由使用本領域已知的合適方法從培養基或微生物中回收目標胺基酸。

#### [發明模式]

【0050】 在下文中，將結合例示性具體例詳細描述本公開。然而，本文公開的例示性具體例僅用於說明目的，不應解釋為限制本公開的範圍。

**【0051】 實施例 1：設計 ATP 磷酸核糖基轉移酶 (HisG) 變體**

在棒狀桿菌屬微生物的 ATP 磷酸核糖基轉移酶 (HisG) 中，當組胺酸、嘌呤型核苷酸等的濃度增加時，作為受質的 ATP 競爭性地或非競爭性地結合至 ATP 磷酸核糖基轉移酶的調節結構域，因而減弱其活性。基於此，設計一種結構性增強其活性同時防止組胺酸與 ATP 磷酸核糖基轉移酶結合的變體。

**【0052】** 具體地，設計 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體 (N215R/G233H/T235Q，SEQ ID NO：1)，其中，從麩胺酸棒狀桿菌 ATP 磷酸核糖基轉移酶的 N 末端，位置 233 的甘胺酸胺基酸殘基被組胺酸取代，位置 235 的蘇胺酸胺基酸殘基被麩醯胺酸取代，及位置 215 的天冬醯胺酸胺基酸殘基被精胺酸取代。編碼 SEQ ID NO：1 的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的核苷酸序列是 SEQ ID NO：2。

**【0053】 實施例 2：*hisG* 基因選殖及用於製備無標記菌株的染色體插入載體的構建體**

**實施例 2-1：經引入 N215R 變異和 G233H 和 T235Q 變異的 *HisG* 基因選殖及用於染色體插入的載體的構建體**

**【0054】** 單離野生型麩胺酸棒狀桿菌 ATCC13032 的染色體基因，然後使用 SEQ ID NO：3 和 4 的引子對以聚合酶連鎖反應 (PCR) 獲得 *hisG* 基因片段 (表 1)。於此，在 95℃ 變性 5 分鐘後，在以下條件下進行總共 25 個循環的 PCR：95℃ 變性 30 秒，52℃ 黏合 30 秒，72℃ 聚合 90 秒。

此後，聚合反應在 72℃ 進行 7 分鐘。結果，獲得了多核苷酸(約 850bp)。將如此獲得的 *hisG* 基因片段接合到 TOPO 載體，並將構建的載體命名為 pTOPO-*hisG*。

【0055】 [表 1]

| SEQ ID NO: | 引子                       | 序列 (5'-3')                  |
|------------|--------------------------|-----------------------------|
| 3          | Xba1-Cgl- <i>hisG</i> -F | GGGTCTAGACCCAAACAAAGGCTCGC  |
| 4          | Xba1-Cgl- <i>hisG</i> -R | GGGTCTAGAGCAAGGTTGGCAACAACC |

【0056】 使用製備的 pTOPO-*hisG* 載體作為模板，以表 1 和 2 中所述的引子進行 PCR，如下所述。以引入 *hisG* 基因變異的待修飾區域為中心，分別對 5'和 3'末端進行初步 PCR，然後進行二次 PCR 以組合兩個 PCR 片段。

【0057】 具體地，使用 Xba1-Cgl-*hisG*-F(SEQ ID NO: 3)和 Cgl-*hisG*-G233H / T235Q-R(SEQ ID NO: 8)的引子以 PCR 擴增模板的 5'末端。使用 Cgl-*hisG*-G233H/ T235Q-F (SEQ ID NO: 7)和 Xba1-Cgl-*hisG*-R(SEQ ID NO: 4)的引子以 PCR 擴增模板的 3'末端。使用以 PCR 獲得的兩個 PCR 片段作為模板，以 Xba1-Cgl-*hisG*-F(SEQ ID NO: 3)和 Xba1-Cgl-*hisG*-R(SEQ ID NO: 4)的引子進行二次 PCR。從二次 PCR 獲得的 *hisG*\_G233H/T235Q 基因的片段以限制酶 XbaI(New England Biolabs, Beverly, MA)切割。將切割的基因片段以 T4 連接酶(New England Biolabs, Beverly, MA)連接到線性載體以構建重組載體，其中用於染色體插入的 pDC 載體以限制酶 XbaI 消化。構建的載體命名為

pDC-hisG\_G233H/T235Q。

【0058】 為了進一步引入 N215R 變異，再次進行二次 PCR。具體地，使用 pDC-hisG\_G233H/T235Q 作為模板，使用 Cgl13032 hisG N215R-F(SEQ ID NO：5) 和 Cgl-hisGG233H/T235Q-R(SEQ ID NO：8)的引子以 PCR 擴增 5'末端；使用引子 Cgl-hisG-G233H/T235Q-F(SEQ ID NO：7)和 Cgl13032 hisG N215R-R(SEQ ID NO：6)以 PCR 擴增 3'末端。使用兩個擴增的 PCR 片段作為二次 PCR 的模板，以 Xba1-Cgl-hisG-F(SEQ ID NO：3)和 Xba1-Cgl-hisG-R(SEQ ID NO：4)的引子進行二次 PCR。將二次 PCR 獲得的基因片段以限制酶 XbaI 切割，並將切割的基因片段以連接到線性載體，其中用於染色體插入的 pDC 載體以限制酶 XbaI 消化。然後將所得物插入 pDC 載體中。構建的載體命名為 pDC-hisG\_N215R / G233H / T235Q。以序列分析證實 *hisG* 變異是否被引入至如此構建的載體中。

【0059】 **實施例 2-2：引入已知 *HisG* 的基因選殖及用於染色體插入的載體構建體**

【0060】 為了比較引入已知 *HisG* 修飾基因(N215K/L231F/T235A)的微生物與引入本公開內容的變體的微生物的組胺酸生產能力，構建已知修飾基因的載體(Biochimie. 2012 年 3 月；94(3)：829-38)。

【0061】 為了構建引入 *HisG* 修飾基因(N215K/L231F/T235A)的載體，以與實施例 2-1 相同的方式，以 pTOPO 模板載體作為模板，以 SEQ ID NO：9 和 12 和 SEQ

ID NO：10 和 11(表 2)的各引子進行 PCR 擴增。使用兩個擴增的 PCR 片段作為二次 PCR 的模板，以 Xba1-Cgl-hisG-F (SEQ ID NO：3)和 Xba1-Cgl-hisG-R(SEQ ID NO：4)的引子進行二次 PCR。從二次 PCR 獲得的基因片段以限制酶 XbaI 切割，並將切割的基因片段連接到線性載體，其中用於染色體插入的 pDC 載體以限制酶 XbaI 消化。然後，將所得物插入 PDC 載體中。如此構建的載體命名為 pDC-hisG\_N215K / L231F / T235A。

【0062】 [表 2]

| SEQ ID NO: | 引子                     | 序列 (5'-3')                              |
|------------|------------------------|-----------------------------------------|
| 5          | Cgl13032 hisG N215R -F | CCTCATGCTGGATTACCGCGTCG                 |
| 6          | Cgl13032 hisG N215R -R | CGACGCGGTAATCCAGCATGAGG                 |
| 7          | Cgl-hisG-G233H/T235Q-F | CAGGCTTATCCCACCCACAGGTATCCCCAC          |
| 8          | Cgl-hisG-G233H/T235Q-R | GTGGGGATACCTGTGGGTGGGATAAGCCTG          |
| 9          | Cgl-hisG-N215K-F       | GCTGGATTACAAGGTCGACCGCGAC               |
| 10         | Cgl-hisG-N215K-R       | GTCGCGGTCGACCTTGTAATCCAGC               |
| 11         | Cgl-hisG-L231F/T235A-F | ACCCCAGGCTTCTCCGGCCCAGCAGTATCC<br>CCACT |
| 12         | Cgl-hisG-L231F/T235A-R | AGTGGGGATACTGCTGGGCCGGAGAAGCC<br>TGGGGT |

【0063】 實施例 3：選擇插入 *HisG* 修飾基因的菌株

實施例 3-1：選擇插入 *HisG* 修飾基因的野生型菌株

【0064】 在實施例 2 中構建的含有 *HisG* 修飾基因的 hisG\_N215R / G233H/T235Q 載體，以電穿孔轉形野生型麴

胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032。此後，從含有康黴素(25mg/L)的選擇性培養基中選擇表現出抗性的菌株。進行二級重組作用(交叉)以選擇其中染色體經插入修飾基因的菌株。使用 Xba1-Cgl-hisG-F(SEQ ID NO: 3)和 Xba1-Cgl-hisG-R(SEQ ID NO: 4)的引子進行 PCR。以插入至基因組的 DNA 片段 hisG\_N215R/G233H/T235Q 將 *hisG* 修飾基因插入其中的菌株經由 PCR 產物的序列分析證實，並命名為 ATCC13032-161。

**【0065】 實施例 3-2：選擇其中經插入包含 *HisG*-修飾基因的載體，具有 L-組胺酸產生能力的菌株**

**【0066】** 麩胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032 不能生產組胺酸。因此，為了測量酶的活性並確認 L-組胺酸生產能力，使用具有 L-組胺酸產生能力的菌株 HCJ-86(KCCM11795P)作為宿主細胞。

**【0067】** HCJ-86 如以下獲得。在野生型麩胺酸棒狀桿菌活化培養基中培養和失活 16 小時後，將活化的菌株接種到在 121℃ 滅菌 15 分鐘的種子培養基中，然後培養 14 小時。此後，回收培養基(5mL)。回收的培養基用檸檬酸緩衝液(100mM)洗滌，加入 N-甲基-N'-硝基-N-亞硝基胍(NTG)至終濃度為 200mg/L，然後將產物處理 20 分鐘。然後，以磷酸鹽緩衝液(100mM)洗滌產物。在基本培養基塗抹以 NTG 處理的菌株來計算死亡率，並且發現死亡率為 85%。選出一種具有對 1,2,4-三唑-3-丙胺酸(例如，L-組胺酸的衍生物)的抗性並且具有產生 L-組胺的能力的變體。

該變體命名為 H CJ-86。H CJ-86 變體於 2015 年 12 月 22 日寄存在韓國微生物培養中心，該中心是布達佩斯條約下的國際寄存機構，指定的登記號為 KCCM11795P。H CJ-86 的 *hisG* 基因的序列分析發現，該序列與野生型麩胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032 的序列相同。因此，確認沒有 *hisG* 基因的變異。

【0068】 將實施例 2 構建的含有 *HisG* 修飾基因的 pDC-*hisG*\_G233H/T235Q，pDC-*hisG*\_N215R/G233H/T235Q 和 pDC-*hisG*\_N215K/L231F/T235A 載體以電穿孔轉形麩胺酸棒狀桿菌 H CJ-86。之後，從含有康黴素(25mg/L)的選擇性培養基選擇表現出抗性的菌株。進行二級重組作用(交叉)以選擇其中染色體經插入修飾的基因的菌株。使用 Xba1-Cgl-*hisG*-F(SEQ ID NO：3)和 Xba1-Cgl-*hisG*-R(SEQ ID NO：4)的引子進行 PCR。獲得已插入基因組的 DNA 片段 *hisG*\_G233H/T235Q、*hisG*\_N215R/G233H/T235Q 和 *hisG*\_N215K/L231F/T235A 修飾 *hisG* 基因的菌株，並以 PCR 產物的序列分析證實。這些分別命名為 H CJ-96、H CJ-161 和 H CJ-162。

【0069】 其中，H CJ-161 寄存於韓國微生物培養中心(KCCM)，2017 年 2 月 27 日，是布達佩斯條約下的國際寄存機構，指定的登記號為 KCCM11982P。

【0070】 另外，分析歷經二級重組作用(交叉)的菌株的序列以選擇僅具有 *hisG*\_N215R DNA 片段的菌株，並將其命名為 H CJ-163。

【0071】 為了構建具有 hisG\_N215R/L231F/T235A 修飾的菌株，使用 pDC-hisG\_N215K/L231F/T235A 載體以電穿孔轉形 HCJ-161 菌株。此後，顯示抗性的菌株主要選自含有康黴素(25mg/L)的選擇性培養基。分析經歷二次重組過程(交叉)的菌株的序列，並且從 *hisG* 基因中發生重組的菌株二次選擇含有 hisG\_N215R/L231F/T235A 修飾的菌株。選擇的菌株命名為 HCJ-164。

【0072】 為了製備具有 hisG\_N215K/G233H/T235Q 修飾的菌株，使用 pDC-hisG\_G233H/T235Q 載體以電穿孔轉形 HCJ-162 菌株。此後，顯示抗性的菌株主要選自含有康黴素(25mg / L)的選擇性培養基。分析經歷二次重組過程(交叉)的菌株的序列，並且從 *hisG* 基因中發生重組的菌株中二次選擇含有 hisG\_N215K/G233H/T235Q 修飾的菌株。選擇的菌株命名為 HCJ-165。

【0073】 各菌株和 ATP 磷酸核糖基轉移酶(HisG)修飾性狀如下表 3 所示。

【0074】 [表 3]

| Strain  | HisG 修飾性狀                |
|---------|--------------------------|
| HCJ-96  | HisG (G233H/T235Q)       |
| HCJ-161 | HisG (N215R/G233H/T235Q) |
| HCJ-162 | HisG (N215K/L231F/T235A) |
| HCJ-163 | HisG (N215R)             |
| HCJ-164 | HisG (N215R/L231F/T235A) |
| HCJ-165 | HisG (N215K/G233H/T235Q) |

**【0075】 實施例 4: ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的活性測量**

**實施例 4-1：取得 ATP 磷酸核糖基轉移酶**

**【0076】** 將實施例 3 中選擇的麴胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032 和菌株 HCJ-96、HCJ-161、HCJ-162、HCJ-163、HCJ-164 和 HCJ-165 各自接種到含有種培養基(25mL)的角部擋板燒瓶(250mL)中，並以 200rpm 振盪在 30℃ 培養 20 小時以獲得種培養液。然後，將種培養液(1mL)接種到含有生產培養基(24mL)的角部擋板燒瓶(250mL)中，在 30℃ 以 200rpm 培養 45 小時。培養後，將獲得的細胞超音波處理並離心，由此獲得的上清液用於評估 ATP 磷酸核糖基轉移酶的活性。

**【0077】** 同時，實施例 4-1 中使用的培養基的組成示於下表 4 中。

**【0078】 [表 4]**

| 類型    | 培養基組成及 pH                                                                               |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 種培養基  | 葡萄糖(5%)，細菌用蛋白胨(1%)，氯化鈉(0.25%)，酵母提取物(1%)，尿素(0.4%)；pH 7.2                                 |
| 生產培養基 | 葡萄糖(5%)，硫酸銨(2%)，磷酸二氫鉀(0.1%)，硫酸鎂七水合物(0.05%)，玉米漿(CSL，2.0%)，生物素(200μg/ L)，碳酸鈣(30 克)；pH 7.2 |

**【0079】 實施例 4-2: ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的活性測量**

測量實施例 4-1 中獲得的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體和野生型 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的活性。參考現有文獻報導(Biochimie. 2012 年 3 月；94(3)：829-38.)中描述的條件進行這些酶的活性評估。

【0080】 為了評估酶的活性，定量上清液以得到相同的濃度。將這些酶作為樣品酶，反應條件如下：將反應組合物與經定量的蛋白質 (0.05mg)混合，得到總量為 500μL，然後在 30℃，UV 波長為 290 奈米持續 90 秒測定。對於具有低活性的野生型 ATP 磷酸核糖基轉移酶，使用上清液蛋白質(0.3mg)並在 290nm 的 UV 波長測量 30 分鐘以評估其活性。用於測量酶活性的反應溶液的組成如下：

【0081】 [表 5]

| 反應組合物               |        |
|---------------------|--------|
| 100 mM Tris, pH 8.5 |        |
| 150 mM KCl          |        |
| 10 mM MgCl          |        |
| 5 mM ATP            |        |
| 0.5 mM PRPP         |        |
| 1 U 酵母焦磷酸酶          |        |
| ATP 磷酸核糖基轉移酶 + DDW  |        |
| Total               | 500 μL |

【0082】 測量的結果證實相較於野生型 ATP 磷酸核糖基轉移酶，ATP 磷酸核糖基轉移酶變體具有增強的活性。

特別地，具有 N215R/G233H/T235Q 變異的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體顯示出比野生型酶高約 160 倍的活性(表 6)。

【 0083】 [表 6]

ATP 磷酸核糖基轉移酶(HisG)活性

| 酶種類                      | 活性 (U/mg) |
|--------------------------|-----------|
| HisG                     | 0.013     |
| HisG (G233H/T235Q)       | 1.381     |
| HisG (N215R/G233H/T235Q) | 2.082     |
| HisG (N215K/L231F/T235A) | 0.387     |
| HisG (N215R)             | 0.021     |
| HisG (N215R/L231F/T235A) | 0.408     |
| HisG (N215K/G233H/T235Q) | 1.3       |

【 0084】 實施例 4-3：測量組胺酸對 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體活性的抑制程度

測量 L-組胺酸對實施例 4-1 中獲得的 ATP 磷酸核糖基轉移酶和 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的活性的抑制程度。具體地，使用實施例 4-2 中描述的方法，在含有 L-組胺酸(0mM、50mM 或 100mM)的實施例 4-2 的反應組合物溶液中測量這些酶的活性。測量的結果證實，在 L-組胺酸濃度為 50mM 和 100mM 時野生型酶的活性被完全抑制。然而，L-組胺酸對 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的活性的抑制較小。特別是，具有 N215R / G233H / T235Q 變異的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體即使在含有 L-組胺酸(100mM)的組合物溶

液中也表現出最高的活性(表 7)。

【0085】 [表 7]

L-組胺酸對 ATP 磷酸核糖基轉移酶(HisG)活性的抑製

|                          | 酶活性 (U/mg) |       |        |
|--------------------------|------------|-------|--------|
|                          | 0 mM       | 50 mM | 100 mM |
| HisG                     | 0.013      | 0     | 0      |
| HisG (G233H/T235Q)       | 1.381      | 0.64  | 0.542  |
| HisG(N215R/G233H/T235Q)  | 2.082      | 1.435 | 1.335  |
| HisG (N215K/L231F/T235A) | 0.387      | 0.202 | 0.023  |
| HisG (N215R)             | 0.021      | 0     | 0      |
| HisG (N215R/L231F/T235A) | 0.408      | 0.157 | 0      |
| HisG (N215K/G233H/T235Q) | 1.3        | 0.679 | 0.413  |

【0086】 實施例 5：測量引入 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的生產 L-組胺酸菌株的 L-組胺酸生產能力

測量實施例 3 中選擇的菌株的 L-組胺酸生產能力，以證實具有增強活性的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體對 L-組胺酸生產的影響。

【0087】 母菌株麩胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032 和變體 ATCC13032-161、HCJ-96、HCJ-161、HCJ-162、HCJ-163、HCJ-164 和 HCJ-165 各自接種在含有種培養基(25mL)的角部擋板燒瓶(250mL)中，在 30℃ 以 200rpm 振盪培養 20 小時，得到種子培養液。然後，將種培養液(1mL)接種到含有生產培養基(24mL)的角部擋板燒瓶(250mL)中，在 30℃ 以 200rpm 培養 45 小時，得到 L-組胺酸。培養完成後，使用高效液相層析法(HPLC)測量 L 組胺酸的產量。

【 0088】 詳細的分析方法和濃度示於下表 8 中。

【 0089】 [表 8]

| 分析項目   |       | 組胺酸                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 濃度 STD |       | STD 1: 0.011 g/L<br>STD 2: 0.033 g/L<br>STD 3: 0.100 g/L                                                                                                                                                                                                  |
| 移動相    |       | A: 25 mM-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 12 mM-辛烷磺酸鈉鹽<br>pH 2.5 (by H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )<br>B: 25 mM-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 12 mM-辛烷磺酸鈉鹽 :<br>乙腈 = 50 : 50 pH 2.5 (by H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )<br><b>A : B = 80 : 20</b> |
| 分析條件   | 系統    | HPLC                                                                                                                                                                                                                                                      |
|        | 注入樣本量 | 5 μL                                                                                                                                                                                                                                                      |
|        | 流速    | 1.0 mL/min                                                                                                                                                                                                                                                |
|        | 管柱    | CAP CELL PAK C18 (ACR) 3 μm, 4.6 × 150 mm                                                                                                                                                                                                                 |
|        | 管柱溫度  | 40°C                                                                                                                                                                                                                                                      |
|        | 偵測器   | UV 210 nm                                                                                                                                                                                                                                                 |
|        | 分析時間  | 12 min                                                                                                                                                                                                                                                    |

【 0090】 [表 9]

| 菌株                                  | L- 組胺酸濃度<br>(g/L) |
|-------------------------------------|-------------------|
| 麩胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032                  | 0                 |
| ATCC 13032 -161                     | 0.5               |
| H CJ-86                             | 1.6               |
| H CJ-96 [hisG (G233H/T235Q)]        | 1.9               |
| H CJ-161 [hisG (N215R/G233H/T235Q)] | 2.3               |
| H CJ-162 [hisG (N215K/L231F/T235A)] | 1.6               |
| H CJ-163 [hisG (N215R)]             | 1.6               |
| H CJ-164 [hisG (N215R/L231F/T235A)] | 1.5               |
| H CJ-165 [hisG (N215K/G233H/T235Q)] | 2.1               |

【 0091】 結果，證實野生型麩胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032 不以任何方式生產 L-組胺酸，並且以本發明的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體轉形的 ATCC 13032-161 生產 L-組胺酸(0.5g/L)。另外，H CJ-161 生產 L-組胺酸(2.3g/L)，其量以 43.75% 高於母株 H CJ-86 的(表 9)。證實 H CJ-86、H CJ-96、H CJ-162、H CJ-163 和 H CJ-164 菌株均生產組胺酸，其產量為 1.6g/L 至 1.9g/L，並且具有 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體(N215R/G233H/T235Q)的 H CJ-161 菌株顯示出最高的酶活性和 L-組胺酸生產能力。結果證實，經由使用本公開的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體 (N215R/G233H/T235Q)，能以高效率和高產率生產 L-組胺酸。

【 0092】 雖然以特定的說明性具體例描述本公開，

但是本公開所屬領域的技術人員將理解，本公開可以以其他特定形式實施而不背離其技術精神或者必要特徵。因此，上述具體例在所有方面都被認為是說明性的而非限制性的。此外，本公開的範圍由所附申請專利範圍限定而不是說明內容，並且應當理解，從本公開的含義和範圍及其等同物衍伸的所有修改或變化都包括在本公開所附申請專利範圍內。

**【符號說明】**

無。

**【生物材料寄存】**

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

1. 中華民國、財團法人食品工業發展研究所、107 年 10 月 01 日、BCRC 910852

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

1. 大韓民國、韓國微生物保存中心、2017 年 02 月 27 日、KCCM11982P

【 序 列 表 】

<110> 南韓商CJ第一製糖股份有限公司(CJ CHEILJEDANG CORPORATION)  
<120> ATP磷酸核糖基轉移酶變體及使用該變體製造L-組胺酸之方法

<150> KR 10-2017-0098205  
<151> 2017-08-02  
  
<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0  
  
<210> 1  
<211> 281  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> HisG

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

Gln Gln Ile Leu Leu Arg Arg Ile Gln Gly Ile Leu His Ala Gln Asn  
195 200 205

Phe Leu Met Leu Asp Tyr Arg Val Asp Arg Asp Asn Leu Asp Ala Ala  
210 215 220

Thr Ala Val Thr Pro Gly Leu Ser His Pro Gln Val Ser Pro Leu Ala  
225 230 235 240

Arg Asp Asn Trp Val Ala Val Arg Ala Met Val Pro Arg Arg Ser Ala  
245 250 255

Asn Ala Ile Met Asp Lys Leu Ala Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ile Leu  
260 265 270

Ala Ser Glu Ile Arg Ile Ala Arg Ile  
275 280

<210> 2  
<211> 846  
<212> DNA  
<213> 未知

<220>  
<223> hisG

<400> 2  
atgttgaaaa tcgctgtccc aaacaaaggc tcgctgtccg agcgcgccat ggaaatcctc 60  
gccgaagcag gctacgcagg ccgtggagat tccaaatccc tcaacgtttt tgatgaagca 120  
aacaacgttg aattcttctt ccttcgccct aaagatatcg ccatctacgt tgctggtggc 180  
cagctcgatt tgggtatcac cggccgcgac cttgctcgcg attcccaggc tgatgtccac 240  
gaagttcttt ccctcggctt cggttcctcc actttccggt acgcagcacc agctgatgaa 300  
gagtggagca tcgaaaagct cgacggcaag cgcacgccta cctcttacct caaccttggt 360  
cgcgatgacc tcgcagcacg tgggctttcc gctgaggtgc tccgcctcga cggtgcagta 420  
gaggtatcca tcaagcttgg tgtcgcagat gccatcgccg atgttgtatc caccggccgc 480  
acgctgcgtc agcaaggtct tgcacctttc ggcgagggtc tgtgcacctc tgaggctgtc 540  
attgttggcc gcaaggatga aaaggtcacc ccagagcagc agatcctgct tcgccgcac 600  
caggggaattt tgcacgcgca gaacttcctc atgctggatt accgcgtcga ccgcgacaac 660  
ctggacgctg ccactgcagt aaccccaggc ttatcccacc cacaggatat ccactggca 720  
cgcgacaact gggttgctgt acgcgccatg gtgccacgca ggtcagctaa cgccatcatg 780  
gataagcttg ctggactcgg cgctgaagcc atcctggctt ctgaaatccg catcgccgc 840  
atctag 846

<210> 3  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Xba1-Cgl-hisG-F

<400> 3  
gggtctagac ccaaacaaag gctcgc 26

<210> 4  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Xba1-Cgl-hisG-R

<400> 4  
gggtctagag caaggttggc aacaacc 27

<210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl13032 hisG N215R -F

<400> 5  
cctcatgctg gattaccgcg tcg 23

<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl13032 hisG N215R -R

<400> 6  
cgacgcggta atccagcatg agg 23

<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl-hisG-G233H/T235Q-F

<400> 7  
caggcttatc ccacccacag gtatccccac 30

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl-hisG-G233H/T235Q-R

<400> 8  
gtggggatac ctgtgggtgg gataagcctg 30

<210> 9  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl-hisG-N215K-F

<400> 9  
gctggattac aaggtcgacc gcgac 25

<210> 10  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl-hisG-N215K-R

<400> 10  
gtcgcggtcg accttgtaat ccagc 25

<210> 11  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl-hisG-L231F/T235A-F

<400> 11  
accccaggct tctccggccc agcagtatcc ccaact 35

<210> 12  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Cgl-hisG-L231F/T235A-R

<400> 12  
agtggggata ctgctgggcc ggagaagcct ggggt

35

<210> 13  
<211> 281  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> HisG

<400> 13  
Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala  
1 5 10 15  
Met Glu Ile Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Arg Gly Asp Ser Lys  
20 25 30  
Ser Leu Asn Val Phe Asp Glu Ala Asn Asn Val Glu Phe Phe Phe Leu  
35 40 45  
Arg Pro Lys Asp Ile Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Gln Leu Asp Leu  
50 55 60  
Gly Ile Thr Gly Arg Asp Leu Ala Arg Asp Ser Gln Ala Asp Val His  
65 70 75 80  
Glu Val Leu Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Thr Phe Arg Tyr Ala Ala  
85 90 95  
Pro Ala Asp Glu Glu Trp Ser Ile Glu Lys Leu Asp Gly Lys Arg Ile  
100 105 110  
Ala Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Ala Ala Arg Gly  
115 120 125  
Leu Ser Ala Glu Val Leu Arg Leu Asp Gly Ala Val Glu Val Ser Ile  
130 135 140  
Lys Leu Gly Val Ala Asp Ala Ile Ala Asp Val Val Ser Thr Gly Arg  
145 150 155 160  
Thr Leu Arg Gln Gln Gly Leu Ala Pro Phe Gly Glu Val Leu Cys Thr  
165 170 175  
Ser Glu Ala Val Ile Val Gly Arg Lys Asp Glu Lys Val Thr Pro Glu  
180 185 190

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Gln | Ile | Leu | Leu | Arg | Arg | Ile | Gln | Gly | Ile | Leu | His | Ala | Gln | Asn |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Phe | Leu | Met | Leu | Asp | Tyr | Asn | Val | Asp | Arg | Asp | Asn | Leu | Asp | Ala | Ala |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Thr | Ala | Val | Thr | Pro | Gly | Leu | Ser | Gly | Pro | Thr | Val | Ser | Pro | Leu | Ala |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Arg | Asp | Asn | Trp | Val | Ala | Val | Arg | Ala | Met | Val | Pro | Arg | Arg | Ser | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asn | Ala | Ile | Met | Asp | Lys | Leu | Ala | Gly | Leu | Gly | Ala | Glu | Ala | Ile | Leu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Ala | Ser | Glu | Ile | Arg | Ile | Ala | Arg | Ile |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     |     |     |

## 申請專利範圍

1. 一種 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體，其在 SEQ ID NO：13 的胺基酸序列中的位置 215 以精胺酸取代天冬醯胺酸，位置 233 以組胺酸取代甘胺酸，以及位置 235 以麩醯胺酸取代蘇胺酸。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體，其中該 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體係由 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列組成。
3. 一種多核苷酸，其編碼如申請專利範圍第 1 項所述的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體。
4. 一種載體，包含編碼如申請專利範圍第 1 項所述的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體的多核苷酸。
5. 一種生產組胺酸的棒狀桿菌屬微生物，其中該微生物包含如申請專利範圍第 1 項所述的 ATP 磷酸核糖基轉移酶變體，或經如申請專利範圍第 4 項所述的載體轉形。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述的棒狀桿菌屬微生物，其中該棒狀桿菌屬微生物為麩胺酸棒狀桿菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。
7. 一種生產組胺酸的方法，包括：

在培養基中培養如申請專利範圍第 5 項所述的生產組胺酸的棒狀桿菌屬微生物；以及

從培養的微生物或該培養基回收組胺酸。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述的方法，其中該棒狀桿菌

屬微生物為麩胺酸棒狀桿菌。