(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 581 244**

(51) Int. CI.:

C12P 13/00 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2005 E 05767851 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 1784496**

(54) Título: **Síntesis bioquímica de 1,4-butanodiamina**

(30) Prioridad:

15.07.2004 EP 04077046

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2016

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es:

EPPELMANN, KATRIN;
NOSSIN, PETRUS, MARTINUS, MATHEUS;
RAEVEN, LEON JEAN RENIER MARIE;
KREMER, SUSANNE, MARIA y
WUBBOLTS, MARCEL, GERHARDUS

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Síntesis bioquímica de 1,4-butanodiamina.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la síntesis bioquímica de 1,4-butanodiamina (número CAS 110-60-1; un compuesto también denominado tetrametilendiamina; en la bibliografía bioquímica también se denomina putrescina) en un microorganismo que tiene un nivel incrementado de una actividad de ornitina descarboxilasa en comparación con el nivel natural de la actividad de ornitina descarboxilasa. La ornitina descarboxilasa también se denominará en la presente ODC. Generalmente, se sabe que tales microorganismos que tienen actividad de ODC son capaces de producir poliaminas tales como espermidina y espermina, que son los nombres comunes, respectivamente, para los productos N-(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina y N,N'-bis-(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina. Tales compuestos, así como las propias diversas diaminas cortas tales como, por ejemplo, 1,4-butanodiamina y 1,5-pentanodiamina (también denominada cadaverina), a menudo se denominan poliaminas en estudios bioquímicos, aunque a partir de una definición estrictamente química de las poliaminas se esperaría un número superior de grupos amino. Sin embargo, para los propósitos de la presente solicitud de patente, el término poliaminas se está usando en su significado bioquímico y por lo tanto incluye 1,4-butanodiamina.

El compuesto 1,4-butanodiamina es una importante materia prima para la producción de algunos de los principales plásticos industriales: poliamida-4,6, bien en la forma de un homopolímero o bien copolimerizada, por ejemplo, con alrededor de 5% en peso de monómero de poliamida-6 (caprolactama). El homopolímero poliamida-4,6 (nailon-4,6) se describió tan pronto como en 1938 (documento US-A-2.130.948, Carothers). Es el producto de policondensación de los monómeros 1,4-butanodiamina y ácido adípico. Actualmente, especialmente compuestos de poliamida-4,6 están siendo producidos y vendidos por DSM en Holanda bajo el nombre comercial STANYL®.

Se conoce un número de rutas químicas para la síntesis de 1,4-butanodiamina. Todas estas rutas químicas tienen las desventajas de que los materiales de partida tienen que ser obtenidos a partir de fuentes que se considera que no son renovables. Sin embargo, existe una necesidad sustancial de proporcionar rutas nuevas y factibles para la síntesis de 1,4-butanodiamina partiendo de fuentes de carbono renovables y usando procedimientos bioquímicos (también denominados "biotransformación") en células vivas. En general, se considera que las poliaminas son tóxicas para cualquier célula o microorganismo usados en la producción bioquímica. Por lo tanto, sin embargo, hasta ahora se creía que tales nuevas rutas mediante síntesis bioquímica no eran atractivas.

Esto se puede observar, por ejemplo, a partir de las siguientes referencias: Fukuchi y cols., J. Biol. Chem., Vol. 270 (1995), páginas 18831-18835; y Suzuki y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.91 (1994), páginas 8930-8934.

Fukuchi describe claramente la disminución en la viabilidad celular (y de síntesis de casi todos los tipos de proteínas) debido a la acumulación de espermidina en células de *E. coli* deficientes en espermidina acetiltransferasa (es decir, en células que carecen de la acetiltransferasa SpeG). Se debe apuntar que Limsuwum y cols. (J. Bacteriol. Vol. 182 (2000), páginas 5373-5380) han mostrado que a bajas temperaturas tales problemas se pueden resolver mediante la sobreexpresión de gen *speG* especializado. La espermidina es un producto que está siendo producido en las células a partir de 1,4-butanodiamina como un producto intermedio. Según esto, la biosíntesis de 1,4-butanodiamina también conduce inevitablemente a la formación de espermidina.

Suzuki y cols., por otra parte, también demuestran (en células de ratón), que la sobreexpresión de ODC da como resultado una acumulación de poliaminas, especialmente de espermidina, y que - al añadir pequeñas cantidades de espermidina - ya se observa muerte celular incluso en células que no son deficientes en *speG*. Suzuki y cols. sugieren que esta disminución en la viabilidad celular se debe a una inhibición de la retroalimentación insuficiente de ODC por antizimas y se puede vencer mediante la sobreproducción de una antizima adecuada. A continuación, tal sobreproducción de antizimas también disminuiría la producción de poliaminas en las células y por lo tanto no es factible para la producción de DAB.

Además, como Kashiwagi y cols. describieron en J. Bacteriol. Vol. 170 (1988), páginas 3131-3135, el contenido de poliaminas en *E. coli* se puede ajustar mediante la sobreexpresión de un gen que codifica ornitina descarboxilasa (ODC), en particular de *speC* expresado constitutivamente. Para sus experimentos, el plásmido pODC según se producía por Boyle y cols. (Methods in Enzymology, Vol. 94 (1983), páginas 117-121, se usó en la clonación. Claramente, tal sobreproducción de ornitina descarboxilasa no conducía a niveles fuertemente incrementados de contenido de 1,4-butanodiamina en las células. Con un nivel de 70 veces de ODC, no se observaba un incremento de más de 20% de contenido de 1,4-butanodiamina en las células, independientemente de la cantidad de ornitina añadida a las células. Sin embargo, por otra parte, se observó que las células desarrolladas en presencia de ornitina exhibían un incremento en la excreción de 1,4-butanodiamina. Al nivel de 70 veces de ODC, se encontró en total una producción de 1,4-butanodiamina alrededor de 8,5 veces superior (el título de 1,4-butanodiamina producida era aproximadamente 20-25 mg/l, en total para concentraciones internas y externas, es decir una concentración extremadamente baja). Los autores sugirieron que esta eficacia bastante baja de producción de 1,4-butanodiamina se podría deber a escasez de ornitina, y trataron de resolver esto mediante alimentación externa de ornitina, pero

consiguieron una mejora solo menor. Según esto, parecería imposible proporcionar procedimientos de síntesis bioquímica para la producción de 1,4-butanodiamina con niveles significativamente superiores a 30 mg/l.

Por otra parte, estos estudios mencionados anteriormente no se dirigían a la síntesis de poliaminas (incluyendo 1,4-butanodiamina) como tales, sino más bien intentaron obtener más puntos de vista de las funciones fisiológicas de las poliaminas a nivel molecular. Con niveles superiores de ornitina en las células, presumiblemente también estaría presenta más arginina en las células. Según la enseñanza de Kashiwagi, tales niveles superiores de arginina deben tener un efecto negativo sustancial sobre la formación de 1,4-butanodiamina.

El documento EP-A-0726240 es hasta ahora una de las muy pocas referencias de patente relativas a la síntesis bioquímica de poliaminas, incluyendo 1,4-butanodiamina. Sin embargo, describe la producción de, entre otras cosas, 1,4-butanodiamina mediante la fermentación de productos naturales que contienen proteínas como un componente principal. En dicho procedimiento, los productos naturales se tratan en primer lugar al someterlos a degradación parcial o total y cualesquiera compuestos no deseables (p. ej. Hg, Cr, As, Cd, Se y Pb), inhibidores del crecimiento celular, plaguicidas, antibióticos, detergentes, jabones, grasas, aceites, cianuros y fenoles se retiran a continuación antes de la etapa de fermentación. La putrescina y otras diaminas producidas de tal modo se están (re)utilizando como fertilizantes y abonos, pero contienen un número tan grande de otras sustancias que son inadecuadas como una materia prima para la producción de, por ejemplo, poliamida-4,6.

Según esto, sigue habiendo una necesidad de una ruta biosintética alternativa eficaz para la síntesis de 1,4-butanodiamina con títulos significativamente superiores a alrededor de 30 mg/l, preferiblemente incluso sin la necesidad de alimentación externa de ornitina (costosa). Esta necesidad de una disponibilidad mejorada de 1,4-diaminobutano se basa en su uso pretendido como un material de partida, por ejemplo, para la producción de poliamida-4,6. En general, las rutas hasta 1,4-butanodiamina que son conocidas hasta ahora son bastante laboriosas y engorrosas, y pueden conducir a una calidad de dicho producto que - sin purificación adicional - es difícil de usar en la producción de nailones. Las rutas químicas conocidas hasta 1,4-butanodiamina requieren materiales de partida y reaccionantes relativamente costosos (incluyendo reaccionantes que son difíciles de manejar), y condiciones de reacción relativamente rigurosas de temperatura y presión en un diseño de múltiples etapas y múltiples reactores, así como el uso de sistemas catalíticos costosos. Según esto, sigue habiendo una necesidad de rutas alternativas hasta la 1,4-butanodiamina, preferiblemente a partir de materias primas mucho menos costosas y evitando problemas de manejo de reaccionantes como ácido cianhídrico. Se sabe bien que los materiales que se desarrollan naturalmente, y son así renovables, a partir de producción agrícola son la base de fuentes de carbono tales como glucosa (u otras fuentes de carbono apropiadas y mezclas de las mismas) que se pueden usar en la fermentación. Tales materiales renovables son relativamente económicos y están disponibles abundantemente. En general, se considera que es ventajoso que se puedan usar materiales renovables como materiales de partida para todos los tipos de materiales químicos.

Así, un objetivo de la presente invención es proporcionar posibilidades mejoradas para la producción industrial a gran escala de 1,4-butanodiamina mediante biotransformación.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que este objetivo se consigue mediante un nuevo procedimiento para la síntesis bioquímica de 1,4-butanodiamina en un microorganismo que tiene un nivel incrementado de una actividad de ornitina descarboxilasa (actividad de ODC incrementada) en comparación con el nivel natural de actividad de ornitina descarboxilasa, en donde en el microorganismo también está presente una actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato en comparación con el nivel natural de actividad de formación de N-acetilglutamato en el microorganismo y que 1,4-butanodiamina producida en el microorganismo se excreta a un caldo de fermentación y se recupera del caldo de fermentación. En el procedimiento según la invención, el microorganismo es *Escherichia coli (E. coli)* que está sobreexpresando un gen que codifica N-acetilglutamato sintasa perteneciente a E.C. 2.3.1.1 que tiene al menos 75% de identidad con la secuencia de la N-acetilglutamato sintasa ArgA de *E. coli* y/o un gen que codifica N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetiltransferasa perteneciente a E.C. 2.3.1.35 que tiene al menos 40% de identidad con la secuencia de N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetiltransferasa ArgJ de *Bacillus*.

Según se entiende en la presente solicitud de patente, el término "síntesis bioquímica" (un término que, en el contexto de esta solicitud de patente, se denomina alternativamente "biotransformación") incluye no solo procedimientos que implican - además de un número de etapas de reacción puramente químicas - una o más reacciones biocatalíticas que usan células enteras de cepas de producción adecuadas, sino también procedimientos puramente bioquímicos que usan células enteras de cepas de producción adecuadas. Tales procedimientos puramente bioquímicos, respectivamente, se denominan fermentaciones en el caso de que la síntesis bioquímica empiece a partir de una fuente de carbono adecuada, o se denominan fermentaciones precursoras en el caso de que la biosíntesis empiece a partir de un producto intermedio que ya tiene una cadena principal carbonada a partir de la cual se puede obtener la molécula buscada que se va a sintetizar. Los procedimientos se pueden llevar a cabo bien bajo condiciones aeróbicas o bien bajo condiciones anaeróbicas.

Las reacciones biocatalíticas en la síntesis bioquímica de la presente invención se pueden llevar a cabo bien in vivo o bien in vitro. Generalmente, los procedimientos in vivo son procedimientos llevados a cabo cuando se usan células

vivas (incluyendo también de ese modo el término "células vivas" las llamadas células en reposo); llevándose a cabo habitualmente los procedimientos in vitro, por otra parte, usando lisados celulares o enzimas (parcialmente) purificadas. La síntesis bioquímica según la presente invención se lleva a cabo en un microorganismo. Esto se puede hacer usando células enteras de cepas de producción adecuadas, pero también se puede llevar a cabo usando células permeabilizadas; la diferenciación entre in vivo e in vitro, sin embargo, no tiene mucho sentido para procedimientos que se llevan a cabo con células permeabilizadas o células hospedadoras inmovilizadas. Sin embargo, será evidente que las etapas biocatalíticas individuales del procedimiento de la invención, cuando se llevan a cabo, por ejemplo, al usar enzimas inmovilizadas, etc., se consideran equivalentes a tales etapas en la síntesis bioquímica como se entiende en el contexto de la presente solicitud.

Las ornitina descarboxilasas (es decir enzimas que tienen actividad de descarboxilación de ornitina, u ODC) son enzimas clasificadas en la clase E.C. 4.1.1.17. El nivel de actividad de una ornitina descarboxilasa, si se sobreproduce, se puede comparar fácilmente con el nivel natural (es decir, no sobreproducido) de actividad de ornitina descarboxilasa bajo condiciones estándar (a 37°C en presencia de ornitina y PLP) con extractos libres de células usando el estuche de detección de dióxido de carbono Sigma Diagnostics (Sigma); ensayo descrito en Osterman, A. L. y cols. 1994, Biochemistry 33, p. 13662-13667. Según esto, el experto puede establecer fácilmente si la ODC usada tiene un nivel incrementado de actividad de ornitina descarboxilasa (incrementa la actividad de ODC) en comparación con el nivel natural de la actividad de ornitina descarboxilasa en el microorganismo usado mediante la determinación del contenido de proteína, o al determinar el nivel de ARN. Diversos procedimientos estándar para la determinación del contenido de proteína, por ejemplo métodos colorimétricos así como espectroscópicos, se describen en Lottspeich y Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg / Berlín, ISBN 3-8274-0041-4 (1998), Capítulos 3, 5, 21, 22 y 24. Métodos para la determinación del nivel de proteína así como el nivel de ARN, por ejemplo hibridación "northern", RT-PCR y muchos otros métodos, se describen en J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6 (1989). Sin embargo, muchos otros procedimientos estándar son conocidos por el experto en este campo analítico y no se necesitan mencionar en la presente.

Ornitina descarboxilasas adecuadas que se pueden usar en el procedimiento de la invención son todas las enzimas y mutantes de las mismas que sean capaces de descarboxilar ornitina. Cualquiera de tales enzimas se puede usar en el procedimiento de la invención, con un nivel de actividad incrementado, es decir en forma sobreproducida. Tal nivel de actividad incrementado se puede conseguir por cualquier medio conocido por el experto, por ejemplo por medio de un incremento del número de copias del gen, o al incrementar la actividad endógena o la estructura de las enzimas por medio de mutaciones, o al usar enzimas desreguladas. Sin embargo, y lo más preferiblemente, también se puede conseguir por medio de la sobreexpresión de un gen de ornitina descarboxilasa con eficacia incrementada de transcripción y/o traducción. Además, se ha de apuntar que el término "nivel de actividad incrementado", según se usa en la presente para cualquier actividad enzimática mencionada específicamente, también está destinado a abarcar situaciones tales en las que la actividad de tal enzima, por ejemplo una ornitina descarboxilasa, no está presente en absoluto en la fuente natural del microorganismo en el que está teniendo lugar la reacción, sino que se introduce en el mismo deliberadamente mediante modificación genética.

En el procedimiento según la invención, un nivel de actividad incrementado de formación de N-acetilglutamato (según se define adicionalmente más adelante en la presente, cuando se presenta el análisis de las reivindicaciones dependientes relacionadas) necesita estar presente en comparación con el nivel natural de actividad de formación de N-acetilglutamato en el microorganismo. La comparación de los niveles de actividad incrementado y natural de formación de N-acetilglutamato se puede realizar fácilmente, de forma similar a tal determinación para las ODC, con reacciones de prueba apropiadas bajo condiciones estándar (ensayo descrito en Abadjieva, A., 2001, J. Biol. Chem., 276, p. 42869-42880) dentro de extractores libres de células mediante un radioensayo usando L-[^{14}C]glutamato y acetil-CoA como sustratos.

La 1,4-butanodiamina, según la presente invención, se produce en el microorganismo con actividad de formación incrementada de ODC y N-acetilglutamato mediante biotransformación, y se excreta en el caldo de fermentación que rodea el microorganismo. La 1,4-butanodiamina se excreta en y se recupera del caldo de fermentación.

Según la presente invención, así, se proporciona un procedimiento bioquímico mejorado para la síntesis de 1,4-butanodiamina, y la 1,4-butanodiamina resultante es totalmente adecuada como materia prima, por ejemplo, para la producción de poliamida-4,6.

La formación de 1,4-butanodiamina en las altas cantidades que se producen según la invención es lo más sorprendente, debido al hecho de que se esperaría que un nivel incrementado de actividad de ODC (junto con la actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato), sin que se tome ninguna medida adicional para evitar los efectos negativos de la formación de poliaminas sobre la viabilidad de las células, diera como resultado la muerte de las células.

Según se menciona anteriormente, se puede usar cualquier enzima ODC, en un nivel de actividad incrementado, es decir en forma sobreproducida, en el procedimiento de la invención.

Según la presente invención, se pueden usar todas las ornitina descarboxilasas que tengan suficiente, es decir al menos 30%, más preferiblemente al menos 45% y lo más preferiblemente al menos 65% de identidad con la ODC procedente de la enzima de referencia de *E. coli*, y sean capaces de catalizar la reacción de descarboxilación de ornitina. Se sabe que muchas ODC tienen tal nivel de identidad relativamente alto con la enzima de referencia de *E. coli*.

La determinación de porcentajes de identidad con enzimas de referencia se puede realizar mediante métodos conocidos por el experto, por ejemplo al usar la secuencia proteínica de la enzima de referencia como una "secuencia interrogante" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLAST (versión 2.2) usando los parámetros por defecto del programa respectivo. Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Preferiblemente, la actividad incrementada de ODC se consigue mediante la sobreexpresión de un gen *speF* o *speC* que codifica ornitina descarboxilasa (cada uno perteneciente a E.C. 4.1.1.17) que se origina de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia* y *Shewanella.* La ornitina descarboxilasa *speF* es una ornitina descarboxilasa inducible; la ornitina descarboxilasa *speC* es una ornitina descarboxilasa constitutiva.

Más preferiblemente, el gen que codifica ornitina descarboxilasa se origina de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella typhimutium, Yersinia pestis* y *Shewanella oneidensis.* Hasta ahora, *speC* se ha investigado en la bibliografía mucho más que *speF*. Sin embargo, lo más sorprendentemente, y lo más preferiblemente, los mejores resultados según la presente invención se consiguen cuando el gen que codifica ornitina descarboxilasa es *speF,* más particularmente *speF* que se origina de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimutium* y *Shewanella oneidensis.* Cuando se comparan con resultados con sobreexpresión de gen que codifica ornitina descarboxilasa *speC* constitutivo, con mucho los mejores resultados según la presente invención se están alcanzando en efecto cuando se usa *speF.*

En el contexto de la presente solicitud, cualquier gen que sea homólogo con cualquiera de las susodichas ornitina descarboxilasas y que codifique enzimas que tengan actividad de ornitina descarboxilasa suficientemente comparable con las ornitina descarboxilasas mostradas es adecuado en el procedimiento de la invención. Tales genes equivalentes se pueden obtener adecuadamente por medio de cualquier estrategia de clonación apropiada conocida por el experto, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la parte experimental de la presente. Alternativamente, tales genes de ornitina descarboxilasa equivalentes se pueden obtener mediante construcción deliberada.

El término actividad de formación de N-acetilglutamato representa, en el contexto de la presente solicitud de patente, cualquier actividad enzimática, ya sea debida a una sola enzima o a una combinación de enzimas, capaz de conducir a la formación intracelular de N-acetilglutamato.

Según la presente invención, en particular, se pueden usar todas las N-acetilglutamato sintasas que tengan suficiente, es decir al menos 30%, más preferiblemente al menos 45%, aún más preferiblemente al menos 60% y lo más preferiblemente al menos 75% de identidad con la N-acetilglutamato sintasa procedente de la enzima de referencia de *E. coli*, y sean capaces de catalizar la reacción de formación de N-acetilglutamato. Se conocen muchas N-acetilglutamato sintasas que tienen tal nivel de identidad relativamente alto con la enzima de referencia de *E. coli*.

Preferiblemente, la actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato se alcanza mediante la sobreexpresión bien de un gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintasa (perteneciente a E.C. 2.3.1.1) y/o bien un gen *argJ* que codifica N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa (perteneciente a E.C. 2.3.1.35). Será evidente que cualquier gen que codifique una enzima o mutante de la misma que tenga la misma funcionalidad de una de las enzimas que se mencionan en la presente se considerará equivalente a tal enzima en una de las clases E.C. 2.3.1.1 o 2.3.1.35.

En una de las realizaciones preferidas de la presente invención, la actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato se consigue mediante la sobreexpresión de un gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintasa (perteneciente a E.C. 2.3.1.1) que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia, Photorhabdus* y *Buchnera.* Estas enzimas ArgA requieren la presencia de (o el suministro de) coenzima A para que sean activas en su formación de N-acetilglutamato.

En esta realización, la actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato se consigue mediante la sobreexpresión de un gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella enterica, Yersinia pestis, Photorhabdus luminescens* y *Buchnera aphidicola.*

En otra realización preferida de la presente invención, la actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato se consigue mediante la sobreexpresión de un gen *argJ* que codifica N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa (perteneciente a E.C. 2.3.1.35) que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Bacillus, Listeria, Oceanobacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Thermobifida, Streptomyces* y *Bifidobacterium*.

N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasas adecuadas que se pueden usar en el procedimiento según la invención son N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasas que tengan suficiente, es decir al menos 20%, más preferiblemente al menos 30% y lo más preferiblemente al menos 40% de identidad con la N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa procedente de la especie de referencia *Bacillus* y sean capaces de catalizar la reacción de transferencia de N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetilo. Se sabe que muchas de las N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasas tienen tal nivel de identidad con la enzima de referencia de *Bacillus* correspondiente.

Al contrario que las enzimas ArgA, las enzimas ArgJ no requieren la presencia (o el suministro de) coenzima A para ser activas en su formación de N-acetilglutamato. Según esto, estas enzimas ArgJ son claramente preferidas sobre las enzimas ArgA para el uso en aplicaciones industriales.

En esta otra realización preferida de la presente invención, la actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato se consigue mediante la sobreexpresión de un gen *argJ* que codifica N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa que se que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Oceanobacillus iheyensis, Staphylococcus epidermis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus lactis, Corynebacterium glutamicum, Mycobacterium leprae, Thermobifida fusca, Streptomyces coelicor* y *Bifidobacterium longum.*

En el contexto de la presente solicitud, cualquier gen que sea homólogo con cualquiera de las susodichas actividades de formación de N-acetilglutamato y que codifique enzimas que tienen actividad de formación de N-acetilglutamato suficientemente comparables a las enzimas de formación de N-acetilglutamato mostradas es adecuado en el procedimiento de la invención. Tales genes equivalentes se pueden obtener adecuadamente por medio de cualquier estrategia de clonación adecuada conocida por el experto, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la parte experimental de la presente. Alternativamente, tales genes de formación de N-acetilglutamato equivalentes también se pueden obtener mediante una construcción deliberada.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el procedimiento para la síntesis bioquímica de 1,4-butanodiamina se lleva a cabo en un microorganismo en el que, adicionalmente, también se obtiene una actividad enzimática incrementada para al menos otras dos enzimas por medio de sobreexpresión bien de

(i) un gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa (perteneciente a E.C. 4.1.1.19) y un gen *speB* que codifica agmatinasa (perteneciente a E.C. 3.5.3.11; también denominado gen que codifica agmatina ureahidrolasa); o bien

(ii) un gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa (perteneciente a E.C. 4.1.1.19) y un gen *aguA* que codifica agmatina iminohidrolasa (perteneciente a E.C. 3.5.3.12; también denominado gen de agmatina desiminasa) y un gen *aguB* que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa (perteneciente a E.C. 3.5.1.53) y opcionalmente también un gen *speB* que codifica agmatinasa (perteneciente a E.C. 3.5.3.11).

La ventaja de esta realización adicional es que se forma 1,4-diaminobutano en cantidades aún mayores.

La sobreexpresión, según se entiende en la presente, se puede conseguir mediante cualquier método conocido para el experto; por ejemplo al incrementar la eficacia de traducción y/o transcripción del gen respectivo, pero también mediante cualesquiera otros métodos tales como incrementar el número de copias del gen, o al incrementar la actividad endógena o la estructura de las enzimas por medio de mutaciones, o al usar enzimas desreguladas. Según se entiende en la parte (i) de la realización preferida adicional mencionada en la presente anteriormente, la combinación de SpeA y SpeB de la misma está destinada a representar cualquier combinación funcional (ya sea en una proteína de fusión combinada o como actividades enzimáticas separadas) de SpeA y SpeB. De hecho, esta combinación también se podría denominar SpeAB. La parte (ii) de la misma representa que, en tales combinaciones de SpeA y SpeB, la propia parte SpeB se puede reemplazar por cualquier combinación funcional (ya sea en una proteína de fusión combinada o como actividades enzimáticas separadas) de AguA y AguB.

Janowitz y cols., FEBS Letters 544 (2003), 258-261, han descrito que la agmatina desiminasa AguA está implicada en la ruta de arginina descarboxilasa en plantas superiores. Se sabe además de Nakada y cols., Microbiology, 149 (2003), 707-714, que las conversiones catalizadas por SpeB también se pueden catalizar por enzimas que están presentes en plantas, a saber, mediante la acción combinada de agmatina desiminasa AguA y *N*-carbamoil-putrescina amidohidrolasa AguB. Según esto, en lugar de, o incluso en combinación con, SpeB en el contexto de la presente invención también se pueden usar AguA y AguB. Fuentes de tales genes *aguA* y *aguB* podrían ser

Arabidopsis thaliana y *Lycopersicon esculentum,* pero genes comparables se pueden encontrar en mutantes de *Pseudomonas aeruginosa.*

En el contexto de la presente solicitud, cualquier gen que sea homólogo con cualquiera de las susodichas arginina descarboxilasas, respectivamente agmatinasas o agmatina iminohidrolasas o N-carbamoilputrescina amidohidrolasas, y que codifique tales enzimas respectivas que tienen actividad de arginina descarboxilasa (respectivamente agmatinasa o agmatina iminohidrolasa o N-carbamoilputrescina amidohidrolasa) suficientemente comparable con las enzimas respectivas - según sea el caso - es adecuado en esta realización adicional del procedimiento de la invención. Tales genes equivalentes se pueden obtener adecuadamente por medio de cualquier estrategia de clonación conocida por el experto, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la parte experimental de la misma. Alternativamente, tales genes equivalentes también se pueden obtener mediante construcción deliberada.

Según esto, en esta realización preferida del procedimiento de la presente invención, también se usan combinaciones adicionales de genes sobreexpresados, a saber genes que codifican (i) arginina descarboxilasa y agmatinasa, o (ii) arginina descarboxilasa y agmatina iminohidrolasa y N-carbamoilputrescina amidohidrolasa y opcionalmente agmatinasa.

En esta realización preferida del procedimiento según la presente invención, en particular, se pueden usar todas las arginina descarboxilasas que tengan suficiente, es decir al menos 30%, más preferiblemente al menos 45% de identidad y lo más preferiblemente al menos 65% de identidad con la arginina descarboxilasa procedente de la enzima de referencia de *E. coli* y sean capaces de catalizar la reacción de descarboxilación de arginina. Se conocen muchas arginina descarboxilasas que tienen tal nivel de identidad relativamente alto con la enzima de referencia de *E. coli*.

Por otra parte, en dicha realización, en particular se pueden usar todas las agmatinasas que tengan suficiente, es decir al menos 30%, más preferiblemente al menos 45% y lo más preferiblemente al menos 60% de identidad con la agmatinasa procedente de la enzima de referencia de *E. coli* y sean capaces de catalizar la reacción de agmatinasa. Se conocen muchas agmatinasas que tienen tal nivel de identidad relativamente alto con la enzima de referencia de *E. coli*.

Además, en dicha realización, en particular se pueden usar en el procedimiento todas las agmatina iminohidrolasas y/o N-carbamoilputrescina amidohidrolasas que tengan suficiente, es decir al menos 20%, más preferiblemente al menos 30% y lo más preferiblemente al menos 40%, de identidad con la agmatina iminohidrolasa y/o la N-carbamoilputrescina amidohidrolasa procedente de las enzimas de referencia de *Pseudomonas* y sean capaces de catalizar la reacción de agmatina iminohidrolasa, respectivamente la N-carbamoilputrescina amidohidrolasa. Se conocen muchas agmatina iminohidrolasas y N-carbamoilputrescina amidohidrolasas que tienen tal nivel de identidad relativamente alto con las enzimas de referencia de *Pseudomonas*.

El gen que codifica arginina descarboxilasa sobreexpresado en la realización preferida anterior de la invención es preferiblemente un gen *spe*A de arginina descarboxilasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia, Pasteurella* y *Neisseria.* Más preferiblemente, el gen que codifica arginina descarboxilasa sobreexpresado es preferiblemente un gen *spe*A de arginina descarboxilasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella enterica, Yersinia pestis, Pasteurella multocida* y *Neisseria meningitidis.*

Por otra parte, en esta realización preferida de la invención, el gen que codifica agmatinasa sobreexpresado es preferiblemente un gen *speB* de agmatinasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Salmonella, Proteus, Photorhabdus, Vibrio* y *Neisseria.* Más preferiblemente, el gen que codifica agmatinasa sobreexpresado es un gen *speB* de agmatinasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Salmonella enterica, Proteus mirabilis, Photorhabdus luminescens, Vibrio cholerae* y *Neisseria meningitidis.*

Además, en esta realización preferida adicional de la invención, el gen que codifica agmatina iminohidrolasa sobreexpresado y/o el gen que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa sobreexpresado es preferiblemente un gen *aguA* de agmatina iminohidrolasa y/o un gen *aguB* de N-carbamoilputrescina amidohidrolasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Pseudomonas, Streptococcus, Streptomyces, Azotobacter, Arabidopsis, Novosphingobium* y *Bacillus.* Más preferiblemente, el gen que codifica agmatina iminohidrolasa sobreexpresado y/o el gen que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa sobreexpresado es un gen *aguA* de agmatina iminohidrolasa y/o un gen *aguB* de N-carbamoilputrescina que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus mutans, Streptomyces avermitilis, Azotobacter vinelandii, Arabidopsis thaliana, Novosphingobium aromaticivorans* y *Bacillus cereus.*

El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en cualquier organismo hospedador adecuado. Los hospedadores se pueden seleccionar de los grupos de organismos (o células) de producción generalmente

conocidos por el experto en biosíntesis. Tales organismos pueden ser de origen eucariótico o - como se prefiere más - de origen procariótico. Las células eucarióticas, por ejemplo, pueden ser células procedentes de plantas y hongos y de otros grupos diversos, otros grupos que se denominan colectivamente "Protistas".

En el procedimiento de la invención, se prefiere especialmente que el microorganismo que se va a usar como un hospedador sea capaz de producir los aminoácidos ornitina y/o arginina. Para la mayoría de los microorganismos naturales este requisito se cumple debido a que habitualmente esta capacidad esta disponible en todas las cepas silvestres, ya que la arginina representa un aminoácido esencial.

De estas especies, se prefieren especies de *Escherichia* debido a que son fáciles de manejar mediante manipulación genética a fin de proporcionar cepas con las actividades enzimáticas sobreexpresadas deseadas. Por otra parte, las especies de *Escherichia* ya en la naturaleza contienen casi todas las susodichas actividades enzimáticas (es decir, aparte de los genes *agu* de plantas), de modo que la mayoría de los genes sobreexpresados se pueden usar como genes homólogos.

Los mejores resultados se alcanzan cuando el procedimiento según la invención se lleva a cabo en especies de *Escherichia* en las que, aparte del nivel de actividad incrementado de una ornitina descarboxilasa y de formación de N-acetil glutamato, al menos también se incrementa el nivel de actividad de una arginina descarboxilasa en combinación con una enzima agmatinasa y/o agmatina iminohidrolasa y N-carbamoilputrescina amidohidrolasa. Según se entiende en la presente, para cada una de las enzimas mencionadas, el nivel de actividad incrementado se compara con el nivel natural de actividad de dicha actividad enzimática respectiva en el organismo hospedador.

Estará claro que el procedimiento de la invención se lleva a cabo preferiblemente bajo condiciones de reacción que también son habituales como condiciones de fermentación. Por lo tanto, el procedimiento se puede llevar a cabo discontinuamente, pero también - si se desea - por lotes alimentados. Puede ser conveniente asegurar que el organismo usado como organismo hospedador tenga, o se provea de, un sistema exportador adecuado para el 1,4-diaminobutano formado: Preferiblemente, tal sistema exportador es uno natural.

La presente invención, por supuesto, también se refiere finalmente a todos los vectores, plásmidos y hospedadores que soporten un nivel incrementado de una actividad de ornitina descarboxilasa (actividad de ODC incrementada) en comparación con el nivel natural de la actividad de ornitina descarboxilasa y una actividad incrementada de formación de N-acetilglutamato en comparación con el nivel natural de actividad de formación de N-acetilglutamato. En particular, para las realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a todos los vectores, plásmidos y hospedadores que soporten adicionalmente un nivel de actividad incrementado de una o más de las otras actividades enzimáticas susodichas según las reivindicaciones adjuntas.

La invención se elucidará ahora por medio de algunos resultados experimentales, que de ningún modo pretenden limitar el alcance de la invención.

Parte experimental

Procedimientos generales

Se aplicaron procedimientos estándar para todas las manipulaciones de ADN (Sambrook, J. y cols. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). El ADN se amplificó a partir de ADN cromosómico de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, y cols. (2000), J Bacteriol. 182, 4443-4452), *Bacillus subtilis* ATCC10783 o *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 si no se indica otra cosa. La amplificación por PCR se realizó usando las enzimas de cotejo *SAWADY Pwo-DNA-Polymerase* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemania) o *Platinum Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante, mientras que la verificación de las cepas construidas se llevó a cabo mediante PCR de colonias utilizando la polimerasa de Taq READYMIX (Sigma, Taufkirchen, Alemania). Centros de restricción para la clonación posterior así como mutaciones adicionales se introdujeron con oligonucleótidos adquiridos de MWG-Biotech (Ebersberg, Alemania). Los fragmentos de ADN se purificaron con el MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La preparación de ADN plasmídico se efectuó mediante la utilización de QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La verificación de los plásmidos construidos se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior (Agowa, Berlín, Alemania).

Para una expresión de alto nivel de genes, se usó el vector pJF119EH (Fürste, J. P. y cols. (1986), Gene 48, 119-131) adecuado para la producción de proteína inducida por IPTG basada en el promotor *tac* inducible por isopropil-ß-D-tiogalactopiranósido (IPTG) y el sistema represor *lac* ($lacI^Q$).

Construcción de plásmidos

(i) Construcción del plásmido pDAB2 (pJF119EH-speF)

El gen *speF* que codifica ornitina descarboxilasa (inducible, biodegradante) de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonó en el vector de expresión pJF119EH (Fürste, J. P. y cols. (1986), Gene 48, 119-131). Este vector permite una producción de alto nivel basada en el control de la transcripción de genes clonados bajo el promotor *tac* inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) y el sistema represor *lac* ($lacI^Q$). Para la construcción del plásmido de expresión pDAB2 (pJF119EH-*speF*) el gen codificante se clonó con RBS (sitio de unión ribosómica, por sus siglas en inglés), codón de inicio y parada originales.

El fragmento de ADN que contenía *speF* de 2.247 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de *E. coli* LJ110 (número de registro AE000172; nucleótidos 10242 - 12468) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-GAC CTG CT***G G****TA CC*T AAA ATA AAG AGA TGA AA-3' [SEQ ID: Nº 1]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Kpn*I en cursiva)

y

5'-TCG A*T**C** TAG **A***CT GAC TCA TAA TTT TTC CCC-3' [SEQ ID: Nº 2]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Xba*I en cursiva).

El fragmento se modificó terminalmente con las endonucleasas de restricción *Kpn*I y *Xba*I y se ligó al vector de expresión pJF119EH, que se cortó del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, el plásmido pDAB2 (pJF119EH-*speF*, 7502 pb) se verificó mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

(ii) Construcción del plásmido pDAB4 (pJF119EH-*speC*)

El gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa (constitutivo, biosintético) de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, y cols., véanse los procedimientos generales) se clonó en el vector de expresión pJF119EH (Fürste, J. P. y cols. (1986), véase (i)), permitiendo una fuerte expresión génica basada en el control de la transcripción bajo el promotor *tac* inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) y el sistema represor *lac* ($lacI^Q$). Por lo tanto, el gen codificante se clonó con el codón de inicio y parada originales. Puesto que no se podía determinar el sitio de unión ribosómica (RBS) conservado para *speC* utilizando estudios informáticos, se introdujo un RBS optimizado 7 pb aguas arriba del codón de inicio de *speC* mediante mutagénesis.

El fragmento de ADN que contenía *speC* de 2235 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de *E. coli* LJ110 (número de registro AE000379; nucleótidos 2650 - 4867) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-GAG *CT**C** **TA**G A*CC AGT TTG A**GG A**AT ATC T-3' [SEQ ID: Nº 3]

(mutaciones en negrita, *Xba*I en cursiva)

y

5'-TTT T***GC** AT**G*** CTT ACT TCA ACA CAT AAC CGT AC-3' [SEQ ID: Nº 4]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Sph*I en cursiva).

Después de la modificación terminal con las endonucleasas *Xba*I y *Sph*I, el producto de PCR se ligó en el plásmido pJF119EH, que se cortó del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB4 (pJF119EH-*speC*, 7491 pb) obtenido se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

(iii) Construcción del plásmido pDAB1 (pJF119EH-*argA*)

El gen *argA* de N-acetilglutamato sintasa de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonó en el vector de expresión pJF119EH (Fürste, J. P. *y cols.* (1986), véase (i)). El gen se clonó con el RBS (sitio de unión ribosómica) y el codón de parada originales. Sin embargo, el inicio de la traducción se alteró de GTG a ATG.

El fragmento de ADN que codifica *argA* de 1365 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de *E. coli* LJ110 (número de registro AE000365; nucleótidos 3312 - 4643) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-ATA ***AGA ATT*** CAA AGA GGT GTG CCA TGG TAA AG-3' [SEQ ID: Nº 5]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción EcoRI en cursiva)

y

5'-TTT T***GG TAC*** CTT ACC CTA AAT CCG CCA T-3' [SEQ ID: Nº 6]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Kpn*I en cursiva).

El fragmento se modificó terminalmente usando las endonucleasas de restricción EcoRI y *Kpn*I y posteriormente se ligó en el plásmido de expresión pJF119EH, que se cortó del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB1 (pJF119EH-*argA*, 6627 pb) obtenido se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

(iv) Construcción del plásmido pDAB5 (pJF119EH-*argA*-*speF*)

A fin de permitir la producción en paralelo de la ornitina descarboxilasa SpeF y la N-acetilglutamato sintasa ArgA, el gen que codifica *speF* de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonó en el *argA*-vector de expresión pDAB1 (véase (iii)).

El fragmento de ADN que contenía *speF* (2225 pb) se cortó del plásmido pDAB2 construido (véase A.1) mediante digestión con las endonucleasas *Kpn*I y *Xba*I y se ligó en el plásmido pDAB1 que contenía *argA* (véase (iii)), cortado del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, el plásmido pDAB5 (pJF119EH-*argA*-*speF*, 8841 pb) obtenido para la producción de SpeF y ArgA en paralelo se verificó mediante análisis de restricción.

(v) Construcción del plásmido pDAB6 (pJF119EH-*argA*-*speC*)

A fin de permitir la producción en paralelo de la ornitina descarboxilasa SpeC y la N-acetilglutamato sintasa ArgA, el gen que codifica *speC* de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonó en el *argA*-vector de expresión pDAB1 (véase (iii)1).

Mediante la digestión del plásmido pDAB4 (véase (ii)) construido con los endonucleótidos *Xba*I y *Sph*I, se separó el fragmento de ADN de 2225 pb que contenía el gen *speC* con el RBS optimizado. Posteriormente, el fragmento se ligó en el plásmido pDAB1 que contiene *argA* (véase (i)), que se cortó igualmente. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB6 (pJF119EH-*argA*-*speC*, 8830 pb) obtenido que permitía la expresión en paralelo de *speC* y *argA* se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

(vi) Construcción del plásmido pDAB7 (pJF119EH-*speAB*)

El gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa así como *speB* que codifica la agmatinasa de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonaron en el vector de expresión pJF119EH (Fürste, J. P. *y cols*. (1986), véase (i)). De este modo, se mantuvieron la estructura de operón original de los genes así como el RBS, el codón de inicio y de parada.

El fragmento de ADN que contenía *speAB* de 3079 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de *E. coli* LJ110 (número de registro AE000377; nucleótidos 1190-4247) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-ACA CTT ***TCT AGA*** ATA ATT TGA GGT TCG CTA TG-3' [SEQ ID: Nº 7]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Xba*I en cursiva)

y

5'-CAT **G***GC AT****G C***GG TGC TTA CTC G-3' [SEQ ID: Nº 8]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Sph*I en cursiva).

Después de la modificación terminal con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Sph*I, el fragmento de ADN se ligó en el plásmido de expresión pJF119EH, que se cortó igualmente. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB7 (pJF119EH-*speAB*, 8339 pb) obtenido se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

(vii) Construcción del plásmido pDAB8 (pJF119EH-*speF-speAB*)

A fin de permitir la producción en paralelo de la ornitina descarboxilasa SpeF, la arginina descarboxilasa SpeA y la agmatinasa SpeB, los genes *speAB* de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonaron en el *speF*-vector de expresión pDAB2 (véase (i)).

Mediante la digestión del plásmido pDAB7 (véase (vi)) con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Sph*I, el operón del gen *speAB* que comprendía 3067 pb se separó y se ligó en el plásmido pDAB2 que contenía *speF* (véase (i)), que se cortó del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, el plásmido pDAB8 (pJH119EH-*speFAB*, 10547 pb) obtenido que permitía la producción en paralelo de SpeFAB se verificó mediante análisis de restricción.

(viii) Construcción del plásmido pDAB10 (pJF119EH-*argA-speF-speAB*)

A fin de permitir la producción en paralelo de la ornitina descarboxilasa SpeF, la arginina descarboxilasa SpeA, la agmatinasa SpeB y la N-acetilglutamato sintasa ArgA, los genes *speAB* de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonaron en el *argA-speF*-vector de expresión pDAB5 (véase (iv)).

Mediante la digestión del plásmido pDAB7 (véase (vi)) con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Sph*I, el operón del gen *speAB* que comprendía 3067 pb se separó y se ligó en el plásmido pDAB5 que contenía *argA-speF* (véase (iv)), que se cortó del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, el plásmido pDAB10 (pJH119EH-*argA-speFAB,* 11886 pb) obtenido que permitía la producción en paralelo de ArgA y SpeFAB se verificó mediante análisis de restricción.

(ix) Construcción del plásmido pDAB37 (pJF119EH-*argJBs-speF*)

A fin de permitir la producción en paralelo de la ornitina descarboxilasa SpeF y el gen ArgJ que codifica N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa de *Bacillus subtilis* ATCC 10783, el gen que codifica *argJ* de *B. subtilis* se clonó en el *speF*-vector de expresión pDAB5 (véase (iv)) al reemplazar el gen *argA* presente. El gen se clonó con el RBS y el codón de parada originales.

El fragmento de ADN que contenía *argJ* de 1279 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* ATCC 10783 (número de registro Z99109 (*B. subtilis* subespecie *subtilis* cepa 168, genoma completo (sección 6 de 21)); nucleótidos 184321 - 185600) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-TCA CGC ***GAA TTC*** ATC CAT AGA ACG GGA GAG-3' [SEQ ID: Nº 9]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *EcoRI* en cursiva)

y

5'-CTT CAT TTC ***GGT ACC*** CTT TAT TAC GTG CGA TAG CTC-3' [SEQ ID: Nº 10]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Kpn*I en cursiva). Los oligonucleótidos se construyeron según la secuencia de *argJ* que está presente en el genoma de la cepa *B. subtilis* subespecie *subtilis* cepa 168.

El fragmento de ADN amplificado y el plásmido pDAB5 se restringieron con las endonucleasas *EcoR*I y *Kpn*I. En el caso de pDAB5, se obtuvieron dos fragmentos de 1355 pb y 7486 pb. El fragmento de 7486 pb que comprende el vector pJF119EH y el gen *speF* se aisló y se ligó con fragmento de ADN amplificado. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB37 (pJF119EH-*argJ*Bs-*speC*, 8749 pb) obtenido se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior. Los análisis de secuencia revelaron que el gen *argJ* clonado a partir de B. *subtilis* ATCC 10783 difiere del gen *argJ* presentado para *B. subtilis* subespecie *subtilis* cepa 168. En comparación con la proteína ArgJ de *B. subtilis* subespecie *subtilis* cepa 168 (número de registro CAB12961), la proteína ArgJ codificada a partir del gen *argJ* presente en el plásmido pDAB37 muestra los siguientes intercambios: H72Q, P74A, T75A, L95I, F105L, G110D, H134Q, E142Q, A169T, R181A, T216I, A242G, D255E, N353H, I363L, A380D, D383E.

(x) Construcción del plásmido pDAB38 (pJF119EH-*argJCg-speF*)

A fin de permitir la producción en paralelo de la ornitina descarboxilasa SpeF y el gen ArgJ que codifica N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa procedente de *Corynebacterium glutamicum,* el gen que codifica *argJ* de *C. glutamicum ATCC* 13032 se clonó en el speF-vector de expresión pDAB5 (véase (iv)) al reemplazar el gen argA presente. El gen se clonó con el RBS y el codón de parada originales.

El fragmento de ADN que contenía *argJ* de 1219 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de C. *glutamicum* ATCC 13032 (número de registro NC 006958 (C. *glutamicum* ATCC 13032, genoma completo); nucleótidos 1466650 - 1467869) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-ACA CAT ***CGA ATT*** CAG TAG GAG TTC CAC ATG G-3' [SEQ ID: Nº 11]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *EcoR*I en cursiva)

y

5'-AGT GCT ***GGT ACC*** TTT TAA GAG CTG TAC GC 3' [SEQ ID: Nº 12]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Kpn*I en cursiva).

El fragmento de ADN y el plásmido pDAB5 se restringieron con las endonucleasas *EcoR*I y *Kpn*I. En el caso de pDAB5, se obtuvieron dos fragmentos de 1355 pb y 7486 pb. El fragmento de 7486 pb que comprendía el vector pJF119EH y el gen *speF* se aisló y se ligó con el fragmento de ADN amplificado. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB38 (pJF119EH-*argJCg-speF*, 8679 pb) obtenido se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

(xi) Construcción del plásmido pDAB3 (pJF119EH-$speC_{nRBS}$)

El gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa (constitutiva, biosintética) de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) se clonó en el vector de expresión pJF119EH (Furste, J. P. y cols. (1986), Gene 48, 119-131), permitiendo una fuerte expresión génica basada en el control de la transcripción bajo el promotor *tac* inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) y el sistema represor *lac* ($lacI^Q$). Por lo tanto, el gen codificante *speC* se clonó con el RBS, el codón de inicio y el de parada originales.

El fragmento de ADN que contiene *spe*C_{nRBS} de 2235 pb se amplificó a partir de ADN cromosómico de *E. coli* LJ110 (número de registro AE000379; nucleótidos 2650 - 4867) usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-GAG C***TC TAG*** ACC AGT TTG ACC CAT ATC T-3' [SEQ ID: Nº 13]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Xba*I en cursiva)

y

5'-TTG T***GC*** *AT**G*** *C*TT ACT TCA ACA CAT AAC CGT AC-3' [SEQ ID: Nº 14]

(mutaciones en negrita, sitio de restricción *Sph*I en cursiva).

Después de la modificación terminal con las endonucleasas *Xba*I y *Sph*I, el producto de PCR se ligó en el plásmido pJF119EH, que se cortó del mismo modo. Después de la transformación en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Después de la preparación, la verificación del plásmido pDAB3 (pJF119EH-*speC*$_{nRBS}$, 7491 pb) obtenido se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación posterior.

Experimento comparativo A:

Producción de 1,4-butanodiamina a través de la única sobreexpresión de ornitina descarboxilasa *speC,* con expresión génica inducida por IPTG (matraz agitado)

La influencia de la sobreexpresión del gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa sobre la producción de DAB se investigó con la cepa hospedadora de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) que incluye el plásmido pDAB3 (véase (ix)).

Esta cepa se probó en experimentos en matraz agitado que utilizaban medio salino mínimo que consistía en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (300 mg/l), $CaCl_2$-$2H_2O$ (15 mg/l), KH_2PO_4 (3 g/l), K_2HPO_4 (12 g/l), NaCl (100 mg/l), $(NH_4)_2SO_4$ (5 g/l), citrato Na-$3H_2O$ (1 g/l), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (75 mg/l), tiamina·HCl (vitamina B1) (5 mg/l) así como los oligoelementos $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ (3 mg/l), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1.05 mg/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (3.75 mg/l), H_3BO_3 (0.75 mg/l), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (30 mg/l), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (4,5 mg/l), $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ (3 mg/l) y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (22,5 mg/l). Una solución de reserva de glucosa (500 g/l) se trató en autoclave separadamente y se añadió al medio esterilizado hasta una concentración final de 10 g/l.

Un precultivo de medio salino mínimo que contenía 100 mg/l de ampicilina se inoculó con 1 - 5 µl/ml de solución de reserva y se incubó a 33°C, 180 rpm durante 16 h hasta una OD_{620} de 2. Posteriormente, se usaron 5 ml de este cultivo para la inoculación del cultivo principal que consistía en 50 ml del mismo medio, que se incubó durante 24 h a 33°C y 180 rpm. Desde que las células alcanzaban una $OD_{620\ nm}$ de 1,5 (después de ~ 7 h), la expresión génica se indujo mediante la adición de IPTG 10 µM.

A fin de observar la producción de DAB dependiente del tiempo, se tomaron muestras en diferentes momentos durante el cultivo. Después de la separación de las células utilizando centrifugación, el sobrenadante diluido se analizó mediante HPLC. Aquí, las aminas contenidas se detectaron como derivados de *orto*-ftaldialdehído (OPA) a 230 nm en un instrumento Hewlett-Packard Serie 1100, usando una columna en fase inversa C_{18} (Nucleosil 120-5 C_{18}, Macherey & Nagel, Düren, Alemania) equilibrada hasta 50% de tampón B (tampón A, acetato sódico 0,1 M, pH 7,2; tampón B metanol). Para la separación, se aplicó el siguiente gradiente: gradiente lineal de 1 - 7 min. desde 50% hasta 75% de tampón B con un caudal de 0,5 ml/min, 7 - 13 min. de 75% a 85% de tampón B con un caudal de 0,5 ml/min, 13 - 14,5 min de 85% a 50% de tampón B con un caudal de 1 ml/min, 14,5 - 17 min. de 50% de tampón B con un caudal de 1 ml/min y 17 - 20 min a 50% de tampón B con un caudal de 0,5 ml/min.

Mediante la utilización de sustancias estándar para la calibración, se podían determinar las siguientes concentraciones de DAB (véase la Tabla 1) y se podían verificar mediante espectroscopía de NMR.

Cepa usada	Gen expresado	Concentración de DAB [mg/l]
LJ110 pDAB3	*speC*	50

Tabla 1: Formación de DAB utilizando la sobreproducción de ODC en *E. coli*

Ejemplos:

Mejora de la producción de 1,4-butanodiamina mediante un incremento de la actividad de descarboxilación de ornitina combinado con un incremento de la actividad de formación de N-acetilglutamato

Ejemplo 1. Producción de 1,4-butanodiamina utilizando sobreproducción de ODC así como ArgA (matraz agitado)

La influencia de la producción en paralelo de N-acetilglutamato sintasa ArgA, que cataliza la primera etapa en la biosíntesis de ornitina partiendo de glutamato y ornitina descarboxilasas SpeF o SpeC sobre la producción de DAB se investigó dentro de la cepa hospedadora de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) que incluye el plásmido pDAB5 (véase (iv)) o pDAB6 (véase (v)).

Estas cepas se probaron en experimentos de matraz agitado en medio salino mínimo (véase el Experimento comparativo A). Por lo tanto, un precultivo de medio salino mínimo que contenía 100 mg/l de ampicilina se inoculó con 1 - 5 µl/ml de solución de reserva y se incubó a 33°C, 180 rpm durante 16 h hasta una densidad óptica en 620 nm de 2. Posteriormente, se usaron 5 ml de este cultivo para la inoculación del cultivo principal que consistía en 50 ml del mismo medio, que se incubó durante 24 h a 33°C y 180 rpm. Desde que las células alcanzaban una $OD_{620\ nm}$ de 1,5 (después de ~ 7 h), la expresión génica se indujo mediante la adición de IPTG 10 µM.

A fin de observar la producción de DAB dependiente del tiempo, se tomaron muestras en diferentes momentos durante el cultivo. Después de la separación de las células utilizando centrifugación, el sobrenadante se analizó mediante HPLC (véase el Experimento comparativo A). Mediante la utilización de sustancias estándar para la calibración, se podían determinar las siguientes concentraciones de DAB (véase la Tabla 2).

Cepa usada	genes expresados	Concentración de DAB [mg/l]
LJ110 pDAB5	*argA speF*	893
LJ110 pDAB6	*argA speC*	1064

Tabla 2: Formación de DAB utilizando sobreproducción de ArgA y ODC en paralelo en *E. coli*

Ejemplo 2. Producción de 1,4-butanodiamina utilizando sobreproducción de ODC así como ArgJ (matraz agitado)

La influencia de la producción en paralelo del gen ArgJ que codifica N^2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa a partir bien de *C. glutamicum* o bien de *B. subtilis*, que cataliza la formación de N-acetilglutamato y ornitina a partir de L-glutamato y N-acetilornitina y ornitina descarboxilasas SpeF o SpeC, sobre la producción de DAB se investigó dentro de la cepa hospedadora *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) que incluye el plásmido pDAB37 (véase (ix)) o pDAB38 (véase (x)).

Estas cepas se probaron en experimentos en matraz agitado en medio salino mínimo (véase el Experimento comparativo A). Por lo tanto, un precultivo de medio salino mínimo que contenía 100 mg/l de ampicilina se inoculó con 1 - 5 µl/ml de solución de reserva y se incubó a 33°C, 180 rpm durante 16 h hasta una densidad óptica a 620 nm de 2. Se usaron 5 ml de este cultivo para la inoculación del cultivo principal que consistía en 50 ml del mismo medio, que se incubó durante 24 h a 33°C y 180 rpm. Desde que las células alcanzaban una $OD_{620\ nm}$ de 1,5 (después de ~ 7 h), la expresión génica se indujo mediante la adición de IPTG 50 µM.

A fin de observar la producción de DAB dependiente del tiempo, se tomaron muestras en diferentes momentos durante el cultivo. Después de la separación de las células utilizando centrifugación, el sobrenadante se analizó mediante NMR. Una muestra del sobrenadante de cultivo se ajustó hasta pH 5,8, se liofilizó y se redisolvió en D_2O. ^{1}H-NMR a 600 MHz a 323 K mostraba el espectro de resonancia esperado y la adición de una pequeña cantidad de DAB confirmaba la presencia de DAB. Mediante la utilización de sustancias estándar para la calibración, se podían determinar las siguientes concentraciones de DAB (véase la Tabla 3).

Cepa usada	genes expresados	Concentración de DAB [mg/l]
LJ110 pDAB37	*argJBs speF*	1050
LJ110 pDAB38	*argJCg speF*	1130

Tabla 3: Formación de DAB utilizando sobreproducción de ArgJ y ODC en paralelo en *E. coli*

Ejemplo 3. Mejora de la producción de 1,4-butanodiamina dentro del lote partiendo de ornitina así como arginina (matraz agitado)

Para demostrar la mejora adicional de la formación de DAB partiendo de ornitina así como arginina, se investigó la influencia de la sobreproducción combinada de la ornitina descarboxilasa SpeF, la arginina descarboxilasa SpeA y la agmatinasa SpeB. Además, a fin de asegurar un suministro de precursor apropiado, estas investigaciones se combinaron en un experimento adicional con la sobreproducción de la N-acetilglutamato sintasa ArgA, que cataliza la primera etapa en la biosíntesis de ornitina partiendo de glutamato.

Por lo tanto, se llevaron a cabo cultivos en matraz agitado en medio salino mínimo (véase A.3) mediante la utilización de la cepa hospedadora de *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, *y cols*., véanse los procedimientos generales) que incluye los plásmidos pDAB8 y pDAB10, respectivamente (véanse 2.2 y 2.3). Por lo tanto, un precultivo de medio salino mínimo que contiene 100 mg/l de ampicilina se inoculó con 1 - 5 µl/ml de solución de reserva y se incubó a 33°C, 180 rpm durante 16 h hasta una densidad óptica a 620 nm de 2. Posteriormente, se usaron 5 ml de este cultivo para la inoculación del cultivo principal que consiste en 50 ml del mismo medio, que se incubó durante 24 h a 33°C y 180 rpm. Desde que las células alcanzaban una $OD_{620\ nm}$ de 1,5 (después de ~ 7 h), la expresión génica se indujo mediante la adición de IPTG 10 µM.

A fin de observar la producción de DAB dependiente del tiempo, se tomaron muestras en diferentes momentos durante el cultivo. Después de la separación de las células utilizando centrifugación, el sobrenadante se analizó mediante HPLC (véase el Experimento comparativo A). Mediante la utilización de sustancias estándar para la calibración, se podían determinar las siguientes concentraciones de DAB (véase la Tabla 4).

Cepa usada	gen expresado	Concentración de DAB [mg/l]
LJ110 pDAB8	*speFAB*	1025
LJ110 pDAB10	*argA speFAB*	1433

Tabla 4: Formación de DAB partiendo de ornitina así con arginina en *E. coli*.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> SÍNTESIS BIOQUÍMICA DE 1,4-BUTANODIAMINA

<130> 21371WO

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 32

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 1

gacctgctgg tacctaaaat aaagagatga aa
32

<210> 2

< 211> 30

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 2

tcgatctaga ctgactcata atttttcccc
30

<210> 3

< 211> 28

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 3

gagctctaga ccagtttgag gaatatct
28

<210> 4

< 211> 32

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 4

ttttgcatgc ttacttcaac acataaccgt ac
32

<210> 5

< 211> 32

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 5

ataagaattc aaagaggtgt gccatggtaa ag
32

<210> 6

< 211> 28

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 6

ttttggtacc ttaccctaaa tccgccat
28

<210> 7

< 211> 32

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 7

acactttcta gaataatttg aggttcgcta tg
32

<210> 8

< 211> 22

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 8

catggcatgc ggtgcttact cg
22

<210> 9

< 211> 30

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 9

tcacgcgaat tcatccatag aacgggagag
30

<210> 10

< 211> 36

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 10

cttcatttcg gtacccttta ttacgtgcga tagctc
36

<210> 11

< 211> 31

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 11

acacatcgaa ttcagtagga gttccacatg g
31

<210> 12

< 211> 29

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 12

agtgctggta ccttttaaga gctgtacgc
29

<210> 13

< 211> 28

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 13

gagctctaga ccagtttgac ccatatct
28

<210> 14

< 211> 32

< 212> DNA

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 14

ttttgcatgc ttacttcaac acataaccgt ac
32

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis bioquímica de 1,4-butanodiamina en un microorganismo que tiene un nivel incrementado de actividad de ornitina descarboxilasa (actividad de ODC incrementada) en comparación con el nivel natural de actividad de ornitina descarboxilasa, caracterizado por que el microorganismo es *Escherichia coli (E. coli)* que está sobreexpresando un gen que codifica N-acetilglutamato sintasa perteneciente a E.C. 2.3.1.1 que tiene al menos 75% de identidad con la secuencia de la N-acetilglutamato sintasa ArgA de *E.coli* y/o un gen que codifica N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa perteneciente a E.C. 2.3.1.35 que tiene al menos 40% de identidad con la secuencia de la N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa ArgJ de *Bacillus*, la 1,4-butanodiamina producida en el microorganismo se excreta en un caldo de fermentación y la 1,4-butanodiamina se recupera del caldo de fermentación.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la actividad de ODC incrementada se consigue mediante la sobreexpresión de un gen speF o *speC* que codifica ornitina descarboxilasa, que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia* y *Shewanella.*

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el gen que codifica ornitina descarboxilasa se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella typhimutium, Yersinia pestis* y *Shewanella oneidensis.*

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gen que codifica ornitina descarboxilasa es *speF* que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Salmonella typhimutium* y *Shewanella oneidensis.*

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo está sobreexpresando un gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintasa y/o un gen *argJ* que codifica N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el microorganismo está sobreexpresando un gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia, Phoforhabdus* y *Buchnera.*

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el microorganismo está sobreexpresando un gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella enterica, Yersinia pestis, Photorhabdus luminescens* y *Buchnera aphidicola.*

8. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el microorganismo está sobreexpresando un gen *argJ* que codifica N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Bacillus, Listeria, Oceanobacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Thermobifida, Streptomyces* y *Bifidobacterium.*

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el microorganismo está sobreexpresando un gen que codifica N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Oceanobacillus iheyensis, Staphylococcus epidermis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus lactis, Corynebacterium glutamicum, Mycobacterium leprae, Thermobifida fusca, Streptomyces coelicor* y *Bifidobacterium longum.*

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que adicionalmente también se obtiene una actividad enzimática incrementada para al menos otras dos enzimas por medio de sobreexpresión bien de

(i) un gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa y un gen *speB* que codifica agmatinasa (también denominado gen que codifica agmatina ureahidrolasa); o bien

(ii) un gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa y un gen *aguA* que codifica agmatina iminohidrolasa (también denominado gen que codifica agmatina desiminasa) y un gen *aguB* que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa y opcionalmente también un gen *speB* que codifica agmatinasa.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el gen que codifica arginina descarboxilasa sobreexpresado es un gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia, Pasteurella* y *Neisseria.*

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el gen que codifica arginina descarboxilasa sobreexpresado es un gen *speA* que codifica arginina descarboxilasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas

del grupo que consiste en *Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella enterica, Yersinia pestis, Pasteurella multocida* y *Neisseria meningitidis.*

13. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el gen que codifica agmatinasa sobreexpresado es un gen *speB* que codifica agmatinasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Escherichia, Salmonella*, *Proteus*, *Phoforhabdus*, *Vibrio* y *Neisseria*.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el gen que codifica agmatinasa sobreexpresado es un gen *speB* que codifica agmatinasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli, Salmonella enterica, Proteus mirabilis, Photorhabdus luminescens, Vibrio cholerae* y *Neisseria meningitidis*.

15. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el gen que codifica agmatina iminohidrolasa sobreexpresado y/o el gen que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa sobreexpresado es un gen *aguA* que codifica agmatina iminohidrolasa y/o un gen *aguB* que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa que se origina a partir de uno de los géneros seleccionados del grupo que consiste en *Pseudomonas, Streptococcus, Strepfomyces, Azotobacter, Arabidopsis, Novosphingobium* y *Bacillus.*

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el gen que codifica agmatina iminohidrolasa sobreexpresado y/o el gen que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa sobreexpresado es un gen *aguA* que codifica agmatina iminohidrolasa y/o un gen *aguB* que codifica N-carbamoilputrescina amidohidrolasa que se origina a partir de una de las especies seleccionadas del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Sfreptomyces avermitilis, Azotobacter vinelandii*, *Arabidopsis thaliana*, *Novosphingobium aromaticivorans* y *Bacillus cereus.*

17. Microorganismo de la especie *Escherichia coli (E. coli)* que tiene un nivel incrementado de actividad de ornitina descarboxilasa (actividad de ODC incrementada) en comparación con el nivel natural de la actividad de ornitina descarboxilasa y que sobreexpresa un gen que codifica N-acetilglutamato sintasa perteneciente a E.C. 2.3.1.1 que tiene al menos 75% de identidad con la secuencia de la N-acetilglutamato sintasa ArgA de *E.coli* y/o un gen que codifica N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa perteneciente a E.C. 2.3.1.35 que tiene al menos 40% de identidad con la secuencia de la N2-acetil-L-ornitina:L-glutamato N-acetil transferasa ArgJ de *Bacillus*.

18. Microorganismo según la reivindicación 17 y que tiene un nivel de actividad incrementado de una o más de las actividades enzimáticas adicionales según cualquiera de las reivindicaciones 1-16.