

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 378**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2009 PCT/KR2009/001103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09125924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2009 E 09729276 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2281880**

54 Título: **Microorganismo mutante con capacidad elevada para producir putrescina, y preparación de putrescina usando el mismo**

30 Prioridad:

10.04.2008 KR 20080033125

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

14.11.2016

73 Titular/es:

**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (100.0%)
373-1, Guseong-dong, Yuseong-gu
305-701 Daejeon, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YUP;
QIAN, ZHI GANG;
XIA, XIAOXIA y
JEON, YONG JAE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 589 378 T3

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

Microorganismo mutante con capacidad elevada para producir putrescina, y preparación de putrescina usando el mismo

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a microorganismos mutantes que tienen capacidad elevada para producir putrescina, y a un método para producir putrescina usando los mismos, y más particularmente a microorganismos mutantes que tienen capacidad elevada para producir putrescina en los que los genes implicados en la ruta de degradación o utilización de la putrescina están inactivados o suprimidos, y a un método para producir putrescina con rendimiento elevado cultivando los microorganismos mutantes.

10 TÉCNICA ANTECEDENTE

La putrescina (también conocida como 1,4-butanodiamina), una materia prima importante para la producción de poliamida-4,6, incluyendo nailon-4,6, es producida principalmente a escala industrial mediante la hidrogenación de acrilonitrilo, que se produce mediante adición de cianuro de hidrógeno a acrilonitrilo. Los procedimientos conocidos para la síntesis química de este compuesto requieren como materias primas productos petroquímicos no renovables, y condiciones de reacción relativamente severas de temperatura y presión en un diseño de múltiples etapas y de múltiples reactores, así como el uso de sistemas catalíticos caros. Además, debido a que estas materias primas son muy tóxicas e inflamables, los procedimientos sintéticos químicos conocidos son desventajosos en términos medioambientales. En consecuencia, como una alternativa al procedimiento de producción químico, se requiere un procedimiento para producir putrescina a partir de una fuente de carbono renovable derivada de biomasa.

20 La putrescina es un tipo de poliamina que se encuentra en una variedad de organismos que oscilan desde bacterias hasta animales y plantas. Por ejemplo, se sabe que la putrescina desempeña un papel importante no solamente en la proliferación celular y en el crecimiento normal de las células, sino también en un mecanismo defensivo frente al estrés oxidativo (Tkachenko et al., Arch. Microbiol., 176:155-157, 2001). Mientras tanto, los contenidos intracelulares de poliaminas están fuertemente controlados por su biosíntesis, degradación, captación y excreción (Igarashi y Kashiwagi et al., J. Bacteriol., 170(7):3131-3135, 1988). Como se sabe en la técnica, la concentración de putrescina en *E. coli* es tan extremadamente alta como alrededor de 2,8 g/l. También, los microorganismos tienen una resistencia potencialmente buena a concentraciones elevadas de poliaminas. Por ejemplo, Mimitsuka et al. dieron a conocer que *Corynebacterium glutamicum* puede crecer incluso en presencia de más de 30 g/l de cadaverina. En consecuencia, se han seguido realizando estudios sobre el uso de microorganismos para producir concentraciones elevadas de poliaminas (putrescina).

El documento EP 0726240 A1 describe un método para producir putrescina a través de la fermentación usando productos residuales industriales baratos o materiales que tienen proteína como constituyente principal. Sin embargo, debido a que los materiales descritos son muy complejos, existe un problema por cuanto se han de llevar a cabo muchas etapas de purificación a fin de obtener productos de putrescina y cadaverina. Además, la Publicación de Patente Europea nº 1784496 A1 describe un procedimiento para sintetizar bioquímicamente putrescina mediante crecimiento microbiano en medio salino mínimo que contiene glucosa como fuente de carbono. En esta publicación de patente europea, a fin de mejorar la conversión de ornitina en putrescina, se incrementó la actividad de ornitina descarboxilasa mediante sobreexpresión de un *speC* o *speF* que codifican ornitina descarboxilasa. Sin embargo, cuando se incrementó el contenido de putrescina como resultado de incrementar la ornitina descarboxilasa, hay problemas por cuanto se reduce la biosíntesis de putrescina y se induce la degradación de putrescina (Igarashi y Kashiwagi et al., Biochem. J., 347:297-303, 2000).

Los estudios sobre la degradación y utilización de putrescina y microorganismos son como sigue. Bowman et al. dieron a conocer que la espermidina sintasa, que es el producto del gen *speE*, promueve la biosíntesis de espermidina a partir de putrescina en *E. coli* (Bowman et al., J. Biol. Chem., 248:2480-2486, 1973). La espermidina sintasa (EC:2.5.1.16) está presente en la mayoría de los sistemas celulares para la síntesis de espermidina.

Haywood et al. dieron a conocer que la levadura *Candida boidinii* acetila putrescina a N-acetilputrescina mediante N-acetiltransferasa. La espermidina acetiltransferasa, que es el producto del gen *speG* de *E. coli*, tiene una homología elevada con la N-acetiltransferasa de la levadura, y de este modo debe de poseer putrescina acetiltransferasa (Haywood y Large, Eur J. Biochem., 148:277-283, 1985).

50 Además, Samsonova et al. dieron a conocer otra ruta de degradación de putrescina en la que una acción de acoplamiento de putrescina transaminasa YgJ y deshidrogenasa YdcW de *E. coli* dio como resultado la conversión de putrescina en ácido γ -aminobutírico sin γ -glutamilación (Samsonova et al., BMC Microbiol., 3:2, 2003; Samsonova et al., FEBS Lett., 579:4107-4112, 2005).

Además, Kurihara et al. dieron a conocer que la ruta de degradación de putrescina, la "ruta Puu", implica intermedios γ -glutamilados de *E. coli*. A través de la γ -glutamilación de putrescina en esta ruta, se puede estabilizar γ -aminobutiraldehído, que es un intermedio aldehídico. La γ -glutamilputrescina sintetasa, que es el producto del gen *puuA*, convierte putrescina en γ -glutamil-L-putrescina, a la vez que promueve la primera reacción de esta ruta.

También, se reveló que la ruta catabólica es la principal cuando *E. coli* crece en un medio que contiene putrescina como la única fuente de nitrógeno. Además, se reveló que importador de putrescina *puuP* está implicado en la ruta catabólica y es el importador principal de putrescina cuando *E. coli* crece en un medio que contiene putrescina como la única fuente de nitrógeno (Kurihara et al., J. Biol. Chem., 280:4602-4608, 2005).

5 En consecuencia, los presentes inventores han preparado microorganismos mutantes en los que está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado de un gen (*speE*) que codifica espermidina sintasa, un gen (*speG*) que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen (*argI*) que codifica el monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen (*puuP*) que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina o de microorganismos productores de putrescina. También, los presentes
10 inventores han encontrado que, cuando los microorganismos mutantes se cultivan, pueden producir putrescina con rendimiento elevado, completando de ese modo la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención proporcionar microorganismos mutantes en los que está inactivado o suprimido al menos un gen implicado en la ruta de degradación o utilización de putrescina y que tienen capacidad
15 elevada para producir putrescina, y un método para preparar los microorganismos mutantes.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir putrescina con rendimiento elevado cultivando los microorganismos mutantes.

Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo
20 que consiste en un gen *speE* que codifica espermidina sintasa, un gen *speG* que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen *argI* que codifica monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen *puuP* que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina; y en el que además está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen
25 *puuA* que codifica γ -glutamilputrescina sintasa, un gen *ygjG* que codifica putrescina transaminasa, y un gen *argF* que codifica ornitina carbamoiltransferasa F; y en el que un promotor de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *argECBH* que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, un gen *argD* que codifica acetilornitina aminotransferasa, y un gen *speF-potE* que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, se sustituye por un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*; y seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus*
30 *sp.* y *Escherichia sp.*

La presente invención también proporciona un microorganismo mutante como se describe directamente antes, en el que además se introduce o amplifica un gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa.

La presente invención también proporciona un método para preparar un microorganismo mutante seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.* que tiene la capacidad para producir putrescina, comprendiendo
35 el método: inactivar o suprimir al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *speE* que codifica espermidina sintasa, un gen *speG* que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen *argI* que codifica ornitina carbamoiltransferasa I, y un gen *puuP* que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina, a partir de un microorganismo que tiene una ruta de producción de putrescina; y además se inactiva o suprime al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *puuA*
40 que codifica γ -glutamilputrescina sintasa, un gen *ygjG* que codifica putrescina transaminasa, y un gen *argF* que codifica ornitina carbamoiltransferasa F.

La presente invención también proporciona un método para producir putrescina, comprendiendo el método cultivar dicho microorganismo mutante para producir putrescina, y recoger después putrescina a partir del caldo de cultivo.

Otras características y aspectos de la presente invención serán manifiestos a partir de la siguiente descripción
45 detallada y de las reivindicaciones anejas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra una ruta para la síntesis de putrescina a partir de glucosa.

La FIG. 2 es un diagrama gráfico que muestra la producción de putrescina a partir de células XQ37/pKKS*peC* en fermentación de lote alimentado usando glucosa.
50

La FIG. 3 es un diagrama gráfico que muestra la producción de putrescina a partir de células XQ39 en fermentación de lote alimentado usando glucosa.

La FIG. 4 es un diagrama gráfico que muestra la producción de putrescina a partir de células XQ43 en fermentación de lote alimentado usando glucosa.

La FIG. 5 es un diagrama gráfico que muestra la producción de putrescina a partir de células XQ43/p15SpeC en fermentación de lote alimentado usando glucosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION, Y REALIZACIONES PREFERIDAS

5 Como se usa aquí, el término “inactivado” incluye mutar, sustituir o suprimir parte del gen de interés, o introducir una o más bases en el gen, para reducir la actividad de una enzima, que es expresada por el gen, bloqueando de ese modo parte, o una parte sustancial, de la ruta biosintética en la que está implicada la enzima del gen.

Como se usa aquí, el término “suprimido” incluye mutar, sustituir o suprimir parte o todo el gen de interés, o introducir una o más bases en el gen, de manera que el gen no se expresa o no muestra actividad enzimática, incluso aunque se exprese, bloqueando de ese modo la ruta biosintética en la que está implicado el gen.

10 Como se usa aquí, el término “amplificado” incluye mutar, sustituir o suprimir parte del gen de interés, o introducir una o más bases en el gen, o introducir un gen de otro origen microbiano que codifica la misma enzima, para incrementar la actividad de la enzima correspondiente.

15 La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra una ruta para la síntesis de putrescina a partir de glucosa. Como se muestra en la FIG. 1, en la presente invención se encontró que, cuando se inactivaron o suprimieron los genes (*speE*, *speG*, *argI*, y *puuP*) implicados en la ruta de degradación o utilización de la putrescina de un microorganismo que tiene la capacidad para producir putrescina, el microorganismo mutante pudo producir putrescina con rendimiento elevado. Las actividades reducidas de los genes (*speE*, *speG*, *argI*, y *puuP*) implicados en la ruta de degradación o utilización de la putrescina se pudieron confirmar mediante eficiencia transcripcional y traduccional reducida en comparación con las de los genes de tipo salvaje respectivos.

20 En los Ejemplos de la presente invención, los presentes inventores prepararon microorganismos mutantes en los que se inactivó o suprimió al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un gen (*speE*) que codifica espermidina sintasa, un gen (*speG*) que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen (*argI*) que codifica el monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen (*puuP*) que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina. Se encontró que los microorganismos mutantes preparados tuvieron una capacidad mejorada para producir putrescina.

25 En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *speE* que codifica espermidina sintasa, un gen *speG* que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen *argI* que codifica monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen *puuP* que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina; y en el que además está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *puuA* que codifica γ -glutamilputrescina sintasa, un gen *ygjG* que codifica putrescina transaminasa, y un gen *argF* que codifica ornitina carbamoiltransferasa F; y en el que un promotor de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *argECBH* que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, un gen *argD* que codifica acetilornitina aminotransferasa, y un gen *speF-potE* que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, se sustituye por un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*; y seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.*

35 Se describe además un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen (*speE*) que codifica espermidina sintasa, un gen (*speG*) que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen (*argI*) que codifica el monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen (*puuP*) que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina, y un método para producir el microorganismo mutante.

45 En el microorganismo mutante de la presente invención, se inactiva o suprime al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un gen (*puuA*) que codifica γ -glutamilputrescina sintasa, un gen (*ygjG*) que codifica putrescina transaminasa, y un gen (*argF*) que codifica el monómero de la cadena F de ornitina carbamoiltransferasa.

50 El gen (*argF*) que codifica el monómero de la cadena F de ornitina carbamoiltransferasa es una isoenzima del gen (*argI*) que codifica el monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y el gen (*puuA*) que codifica γ -glutamilputrescina sintasa es un gen vecino del gen (*puuP*) que codifica el importador de putrescina. También, el gen (*ygjG*) que codifica putrescina transaminasa es un gen que está implicado en la degradación de putrescina.

55 En el microorganismo mutante de la presente invención, un gen (*lacI*) que codifica un represor del operón *lac* también puede estar adicionalmente suprimido de manera que la expresión de los genes que codifican las enzimas que están implicadas en la biosíntesis de putrescina está incrementada. Ejemplos de los genes que codifican las enzimas que están implicadas en la biosíntesis de putrescina incluyen *gdhA*, *argA*, *argB*, *argC*, *argD*, *argE*, etc.

En el microorganismo mutante de la presente invención, también se puede introducir o amplificar adicionalmente un

gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa. El gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa se introduce en forma de un vector de expresión que contiene un promotor fuerte. El promotor fuerte se puede seleccionar del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*.

Como el microorganismo en la presente invención, se puede usar *Bacillus sp.* o *Escherichia sp.*

5 En la presente invención, se encontró que, en el caso del microorganismo mutante en el que se ha suprimido el gen implicado en la ruta de degradación o utilización de putrescina, cuando el promotor de un gen (*argECBH*) seleccionado del grupo que consiste en un gen que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, de un gen (*argD*) que codifica acetilornitina aminotransferasa, y de un gen (*speF-potE*) que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina se sustituyó por un promotor fuerte, el microorganismo mutante
10 resultante pudo producir putrescina con mayor rendimiento.

En los Ejemplos de la presente invención, en base al microorganismo mutante en el que se han suprimido los genes (*speE*, *speG*, *argI*, y *puuP*) implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina y el gen (*lacI*) que codifica el represor del operón *lac*, se prepararon los siguientes microorganismos: un microorganismo (XQ33) en el que el promotor de un gen (*argECBH*) que codifica un operón para la biosíntesis de arginina se sustituyó por un
15 promotor fuerte (*trc*); un microorganismo (XQ37) en el que los promotores del gen *argECBH* y un gen (*speF-potE*) que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina se sustituyeron por el promotor fuerte *trc*; un microorganismo mutante (XQ39) en el que el gen *argECBH*, el gen *speF-potE* y el gen (*argD*) que codifica acetilornitina aminotransferasa se sustituyeron por el promotor fuerte *trc*; y un microorganismo mutante (XQ43) en el que los promotores del gen *argECBH*, del gen *speF-potE*, del gen *argD* y del gen (*speC*) que codifica
20 ornitina descarboxilasa se sustituyeron por el promotor fuerte (*trc*). Se encontró que las capacidades de estos microorganismos para producir putrescina se incrementaron abruptamente.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *speE* que codifica espermidina sintasa, un gen *speG* que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen
25 *argI* que codifica monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen *puuP* que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina; y en el que además está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *puuA* que codifica γ -glutamilputrescina sintasa, un gen *ygjG* que codifica putrescina transaminasa, y un gen *argF* que codifica ornitina carbamoiltransferasa F; y en el que un promotor de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en
30 un gen *argECBH* que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, un gen *argD* que codifica acetilornitina aminotransferasa, y un gen *speF-potE* que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, se sustituye por un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*; y seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.*, y un método para producir el microorganismo mutante.

35 En la presente invención, el gen (*argECBH*) que codifica el operón para la biosíntesis de arginina es un operón divergente flanqueado por dos promotores convergentes (*argEp* y *argCBHp*) y que contiene un operador. Los dos promotores están reprimidos por arginina (Charlier y Glansdorff, 2004). De este modo, cuando el promotor nativo del operón *argECBH* se sustituye por el promotor fuerte, se puede incrementar el flujo metabólico hacia ornitina. El gen *argE* es un gen que codifica N-acetilornitinasasa, el gen *argC* es un gen que codifica N-acetilglutamilfosfato reductasa, el gen *argB* es un gen que codifica N-acetilglutamato cinasa, y el gen *argH* es un gen que codifica
40 argininosuccinasa.

El gen (*speF-potE*) que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, que se induce a pH bajo, codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina. De este modo, cuando el promotor nativo del operón *speF-potE* se sustituye por el promotor fuerte, el operón *speF-potE* se puede
45 expresar constitutivamente, y de este modo se puede mejorar la capacidad para producir putrescina.

El promotor del gen (*argD*) que codifica acetilornitina aminotransferasa es reprimido por arginina (Charlier y Glansdorff, 2004). De este modo, cuando el promotor nativo del operón *argD* se sustituye por el promotor fuerte, se puede incrementar el flujo metabólico hacia ornitina.

50 Como se describe anteriormente, en el microorganismo mutante de la presente invención, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en el gen (*puuA*) que codifica γ -glutamilputrescina sintasa, el gen (*ygjG*) que codifica putrescina transaminasa, y el gen (*argF*) que codifica el monómero de la cadena F de ornitina carbamoiltransferasa está inactivado o suprimido.

En el microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, el gen (*lacI*) que codifica el represor del operón *lac* puede estar adicionalmente suprimido.

55 En la presente invención, el gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa se introduce preferiblemente en forma de un vector de expresión que contiene un promotor fuerte.

En la presente invención, el promotor fuerte que se usa en la sustitución del promotor génico y en la introducción del

gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*.

El ejemplo más preferido del microorganismo mutante según la presente invención puede ser un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un gen (*speE*) que codifica espermidina sintasa, un gen (*speG*) que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen (*argI*) que codifica monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen (*puuP*) que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina, está inactivado o suprimido, y en el que el promotor de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un gen (*argECBH*) que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, un gen (*argD*) que codifica acetilornitina aminotransferasa, y un gen (*speF-potE*) que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina se sustituye por un promotor fuerte, y en el que se introduce o amplifica un gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa, en el que dicho microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.*

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir putrescina, comprendiendo el método cultivar dicho microorganismo mutante para producir putrescina, y después recoger putrescina a partir del caldo de cultivo.

En la presente invención, los procedimientos de cultivar el microorganismo mutante y de recoger putrescina a partir del caldo de cultivo se pueden llevar a cabo usando un método de cultivo convencional (cultivo por lotes o cultivo por lote alimentado, conocido en los procedimientos de fermentación previos, y un método para el aislamiento y purificación de putrescina, conocido en la técnica.

En la presente invención, la producción biosintética de putrescina se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, se entenderá que estos ejemplos son para fines ilustrativos solamente, y no se deben de interpretar como limitantes del alcance de la presente invención.

Particularmente, aunque en los siguientes ejemplos solamente se ilustraron tipos específicos de vectores para eliminar los genes según la presente invención y los microorganismos productores de putrescina de *Escherichia sp.* que sirven como células hospedantes, también será obvio para la persona experta en la técnica el uso de otros tipos de vectores y de microorganismos productores de putrescina.

30 Ejemplo 1: Preparación de microorganismo mutante en el que se suprimen los genes implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina

En la presente invención, la supresión de los genes (*puuA*, *puuP*, *ygjG*, *speE*, *speG*, *argF*, y *argI*) en los cromosomas se llevó a cabo mediante recombinación homóloga de cruzamiento doble (Datsenko, K.A., y Wanner, B.L. Proc. Natl. Acad. Sci., 97:6640-6645, 2000). Se preparó un casete *lox71*-marcador de cloranfenicol (*CmR*)-*lox66* mediante PCR usando cebadores que contienen 50 nucleótidos homólogos a las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del gen diana. Como molde en las reacciones de PCR, se usó *pECmulox* (Kim, J.M., Lee, K.H. y Lee, S.Y., FEMS Microbiol. Lett., 278: 78-85, 2008) que comprende el casete *lox71-CmR-lox66*. Los productos de la PCR se transformaron en células electrocompetentes que contienen λ recombinasa. Las colonias se seleccionaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contienen 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (*cm*) (Sambrook, J., Fritsch E.F., y Maniatis, T., Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000). La sustitución génica exitosa con *Cm^R* se confirmó mediante PCR directa de colonias. El marcador antibiótico se eliminó mediante un plásmido auxiliar *pJW168* que tiene un origen de replicación sensible a la temperatura y que expresa *cre* recombinasa inducible mediante IPTG (Palmeros et al., Gene, 247(1):255-264, 2000).

1-1: Preparación de la cepa WL3110

La PCR se llevó a cabo usando el plásmido *pECmulox* como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 1 y 2, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *lacI*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en *E. coli* (W3110) electrocompetente que contiene λ recombinasa, preparando así una cepa WL3110 (*W3110* Δ *lacI*).

SEQ ID NO: 1: 5'-GTGAAACCAAGTAACGTTATACGATRTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTC

TTAGATTGGCAGCATTACACGTCTTG-3'

SEQ ID NO: 2: 5'-TCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA

50 ATGCACTTAACGGCTGACATGGG-3'

1-2: Preparación de la cepa XQ08

ES 2 589 378 T3

La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 3 y 4, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *speE*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en la cepa WL3110 preparada en el Ejemplo 1-1, preparando así una cepa XQ08 (W3110 *lacI* (W3110) *speE*).

SEQ ID NO: 3: 5'-CGCCTGAATAATTTTCGGTTGAGAGATGGCGTAAGGCGTCGTTATCTGT

5 CGGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 4: 5'-ATGTTGCGCCCTTTTTTTACGGGTGTTAACAAAGGAGGTATCAACCCA

TGCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

1-3: Preparación de la cepa XQ17

10 La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 5 y 6, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *puuA*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en la cepa WL3110 preparada en el Ejemplo 1-1, preparando así una cepa XQ17 (W3110 *lacI* (W3110) *putcA*).

SEQ ID NO: 5: 5'-GATGAAACAACCCCGCAAGGGGTATTACGCGTTTTTCAACATCCACTC

AAG AACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 6: 5'-CGAGCGGAAAACAAACCAAAGGCGAAGAATCATGGAAACCAATATCGT

TGCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

1-4: Preparación de la cepa XQ22

15 La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 6 y 7, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *puuP*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en la cepa XQ17 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *puuA*) preparada en el Ejemplo 1-3, preparando así una cepa XQ22 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA*).

SEQ ID NO: 6: 5'-CGAGCGGAAAACAAACCAAAGGCGAAGAATCATGGAAACCAATATCGT

TGCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

SEQ ID NO: 7: 5'-TCACCATCATACAACGGCACTTTGCGATAGCGGCGGATCAGATACCA

20 TAAGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

1-5: Preparación de la cepa XQ23

25 La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 8 y 9, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *speE*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en la cepa WL3110 preparada en el Ejemplo 1-1, preparando así una cepa XQ23-1 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE*).

SEQ ID NO: 8: 5'-CGCCTGAATAATTTTCGGTTGAGAGATGGCGTAAGGCGTCGTTATCTG

TCGGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 9: 5'-ATGTTGCGCCCTTTTTTTACGGGTGTTAACAAAGGAGGTATCAACCC

ATGCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

30 La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 10 y 11, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *speG*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en la cepa XQ23-1 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE*), preparando así una cepa XQ23-2 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG*).

SEQ ID NO: 10: 5'-GAATGTAAGGACACGTTATGCCAAGCGCCACAGTGTTAAGCTACG

CCCGGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 11: 5'-CTATTGTGCGGTCCGGCTTCAGGAGAGTCTGACCCGGTGTTTTGTGCT

CTGCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 12 y 13, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *argI*. Después, se llevó a cabo la PCR usando como molde el producto de la PCR obtenido y los cebadores de SEQ ID NOS: 14 y 15, obteniendo así un producto de la PCR final. El producto de la PCR final obtenido se electroporó en la cepa XQ23-2 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG*), preparando así una cepa XQ23 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI*).

SEQ ID NO: 12: 5'-TAATGTGATGCCGGGATGGTTTGTATTTCCCGGCATCTTTATAGCGA

TAGGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 13: 5'-CCATATAAATTGAATTTTAATTCATTGAGGCGTTAGCCACAGGAGGG

ATCCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

SEQ ID NO: 14: 5'-ATAGCAATAGAACACTTTGGGTGGAAGAATAGACCTATCACTGCATA

10 AAATAATGTGATGCCGGGATGGTT-3'

SEQ ID NO: 15: 5'-CCACCTTTGTGACAAAGATTTATGCTTTAGACTTGCAAATGAATAAT

CATCCATATAAATTGAATTTTAA-3'

1-6: Preparación de la cepa XQ26

El producto de la PCR preparado en el Ejemplo 1-3, en el que se ha suprimido el gen *puuA*, y el producto de la PCR preparado en el Ejemplo 1-4, en el que se ha suprimido el gen *puuP*, se electroporaron en la cepa XQ23 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI*), preparando así una cepa XQ26 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA*).

1-7: Preparación de la cepa XQ27

La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 16 y 17, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *ygiG*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en la cepa XQ23-2 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG*) preparado en el Ejemplo 1-5, preparando así una cepa XQ27-1 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *ygiG*). Después, el producto de la PCR preparado en el Ejemplo 1-3, en el que se ha suprimido el gen *puuA*, y el producto de la PCR preparado en el Ejemplo 1-4, en el que se ha suprimido el gen *puuP*, se electroporaron en la cepa XQ27-1 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *ygiG*), preparando así una cepa XQ27 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *ygiG* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA*).

SEQ ID NO: 16: 5'-CTGCAATACTTAAATCGGTATCATGTGATACGCGAGCCTCCGGAGCA

TATGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 17: 5'-CGTCGTATCGCCATCCGATTTGATATTACGCTTCTTCGACACTTACT

CGCCCCGATAGGCCACTAGTGGA-3'

1-8: Preparación de la cepa XQ29

El producto de la PCR preparado en el Ejemplo 1-7, en el que se ha suprimido el gen *ygiG*, se electroporó en la cepa XQ26 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA*) preparada en el Ejemplo 1-6, preparando así una cepa XQ29 (W3110 (W3110) *bacl* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *ygiG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA*).

La PCR se llevó a cabo usando el plásmido pECmulox como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 1 y 2, obteniendo así un producto de la PCR en el que se ha suprimido el gen *lacI*. Después, el producto de la PCR obtenido se electroporó en *E. coli* (W3110) electrocompetente que contiene λ recombinasa, preparando así una cepa WL3110 (W3110 (W3110) *lacI*).

Ejemplo 2: Sustitución del promotor

A fin de mejorar la capacidad para producir putrescina, el promotor de la cepa mutante (XQ26) preparado en el Ejemplo 1 se sustituyó por un promotor fuerte (*trc*).

2-1: Preparación de la cepa XQ33

La sustitución del promotor nativo del operón *argECBH* por el promotor *trc* se llevó a cabo de la siguiente manera. Se generó un fragmento de ADN de *lox71*-marcador de antibiótico marcador de cloranfenicol-*lox66* fusionado

mediante la primera reacción de PCR con los cebadores de SEQ ID NOS: 18 y 19 usando pECmulox como molde.

SEQ ID NO: 18: 5'-TATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGT
CAACAGCTGACTATAGAACGCGGCCG-3'

SEQ ID NO: 19: 5'-TATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGT
CAACAGCTCCGCATAGGCCACTAGTGGA-3'

- 5 A fin de introducir el promotor *trc*, se llevó a cabo la segunda reacción de PCR con los cebadores de SEQ ID NOS: 20 y 21 usando como molde el producto de la primera PCR. A fin de introducir regiones homólogas en el producto de la PCR final, se llevó a cabo la tercera reacción de PCR con los cebadores de SEQ ID NOS: 22 y 23 usando como molde el producto de la segunda PCR.

SEQ ID NO: 20: 5'-CGCTGGCACCCACAATCAGCGTATTCAACATGGTCTGTTTCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA-3'

SEQ ID NO: 21: 5'-TCTCGATAAATGGCGGTAATTTGTTTTTCATGGTCTGTTTCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA-3'

- 10 SEQ ID NO: 22: 5'-ATGTTTCATATGCGGATGGCGATTACATAGGTCAGTCTGTGCGCC
AGCGTAGCCGCTGGCACCCACAATCAGC-3'

SEQ ID NO: 23: 5'-TCGAGTGCCTCTCCGTGGCGCTTATTGAAGGTGTGGCAATCAGAGC
GCGGTAAATCTCGATAAATGGCGGTAAT-3'

- 15 El producto de la PCR final se electroporó en la cepa XQ26 (*W3110* (*W3110*) *lacI* (*W3110*) *speE* (*W3110*) *speG* (*W3110*) *argI* (*W3110*) *puuP* (*W3110*) *puuA*) preparada en el Ejemplo 1-1, construyendo así un microorganismo recombinante. Después, las células del microorganismo mutante se cultivaron en una placa de agar que contiene cloranfenicol, mientras que las células en las que se produjo recombinación homóloga doble se seleccionaron en la placa de agar, preparando así una cepa XQ33 (*W3110* (*W3110*) *lacI* (*W3110*) *speE* (*W3110*) *speG* (*W3110*) *argI* (*W3110*) *puuP* (*W3110*) *puuA* *PargECBH::Ptrc*). Después, la sustitución de la cepa preparada con el promotor *trc* se confirmó mediante análisis de la secuencia de ADN.

2-2: Preparación de la cepa XQ37

- 20 La sustitución del promotor nativo del operón *speF-potE* por el promotor *trc* se llevó a cabo de la siguiente manera. La primera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 19 y 24 usando el plásmido pECmulox como molde.

SEQ ID NO: 24: 5'-ACTAAGGGCACTTCAGCGTACAGGTCTTCCTGACTCTCTGTAGACAC
TATAGAACGCGGCCG-3'

- 25 La segunda reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 25 y 26 usando como molde el producto de la primera PCR. La tercera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 27 y 28 usando como molde el producto de la segunda PCR.

SEQ ID NO: 25: 5'-AGCTTCGACTTTCCTTCTTCAATGCCCGTTAGTCTACCGACTAAGG
GCACTTCAGCGTA-3'

SEQ ID NO: 26: 5'-AATCACTAACC GCAATTTTAAATTTTGACATGGTCTGTTTCTGTG
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA-3'

SEQ ID NO: 27: 5'-AAGGCGGACA ACTCATATTATGAAGTTTGCTCATCGCAATAGCTTCG
ACTTTCCTTCT-3'

- 30 SEQ ID NO: 28: 5'-CGACTTTCATTAATGTAGATACATTCTCGCTGCGTGGAACAGTC
CGGGCAAGAATCACTAACC GCAATTTTAA-3'

El producto de la PCR final se electroporó en la cepa XQ33 (*W3110* (*W3110*) *lacI* (*W3110*) *speE* (*W3110*) *speG* (*W3110*) *argI* (*W3110*) *puuP* (*W3110*) *puuA* *PargECBH::Ptrc*) preparada en el Ejemplo 2-1, construyendo así un

microorganismo recombinante. Después, las células del microorganismo recombinante se cultivaron en una placa de agar que contiene cloranfenicol, mientras que las células en las que se produjo la recombinación homóloga doble se seleccionaron en la placa de agar, preparando así una cepa XQ37 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc*). La sustitución con el promotor *trc* se confirmó mediante análisis de la secuencia de ADN.

5

2-3: Preparación de la cepa XQ39

La sustitución del promotor nativo del operón *argD* por el promotor *trc* se llevó a cabo de la siguiente manera. La primera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 19 y 29 usando el plásmido pECmulox como molde.

SEQ ID NO: 29: 5'-CAACTGCTGGCTAATTCCTGCATCGCTGATTCTGATTGGACACTA

10 TAGAACGCGGCCG-3'

La segunda reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 30 y 31 usando como molde el producto de la primera PCR. La tercera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 32 y 33 usando como molde el producto de la segunda PCR.

SEQ ID NO: 30: 5'- GCAGTTCATCCAGAAAGTATTCTTAGCGAACAAGGACATCAACTG
CTGGCTAATTCCT-3'

SEQ ID NO: 31: 5'- CGCGTGTAATTGCTGTTTGTTC AATTGCCATGGTCTGTTTCCTGTG

15 TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA-3'

SEQ ID NO: 32: 5'- TTATGGGGATTCGCCATCGCCAGTGGGATCTGGAAGGTGTGCAGTT
CCATCCAGAAAGTA-3'

SEQ ID NO: 33: 5'- CGGAGCATAAATCGGCAGGATCACTTCATCGAAAGTCGCGCGTGTA
ATTGCTGTTTGT-3'

El producto de la PCR final se electroporó en la cepa XQ37 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc*) preparada en el Ejemplo 2-2, preparando así una cepa XQ39 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc PargD::Ptrc*). Después, las células del microorganismo recombinante se cultivaron en una placa de agar que contiene cloranfenicol, mientras que las células en las que se produjo recombinación homóloga doble se seleccionaron en la placa de agar. La sustitución con el promotor *trc* se confirmó mediante análisis de secuencia de ADN.

20

25 2-4: Preparación de la cepa XQ43

La sustitución del promotor nativo del gen *speC* por el promotor *trc* se llevó a cabo de la siguiente manera. La primera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 19 y 36 usando el plásmido pECmulox como molde.

SEQ ID NO: 36: 5'-TTTGCCCGATGCACGCCATCTCCTTACATTCTCTCGCTTATCGCCG
TTTCGACACTATAGAACGCGGCCG-3'

30 La segunda reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 37 y 38 usando como molde el producto de la primera PCR. La tercera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 39 y 40 usando como molde el producto de la segunda PCR.

SEQ ID NO: 37: 5'-TGCCATGATTGCGCGAATTTTCTCCTCTCTGTACGGAGTTTGCCCG
ATGCACGCCAT-3'

SEQ ID NO: 38: 5'- TACTGGCGGCAATATTCATTGATTTTCATGGTCTGTTTCCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAT-3'

SEQ ID NO: 39: 5'- GATGGCTTGTGTTTCGCAAAGTCTGGCTTGCACGCTTTAGCGAA

35 AGGTGCCATGATTGCGCGAATTT-3'

SEQ ID NO: 40: 5'- ATCTCCCAACGCCACCACGCGACGATGAGAAGAAAGTCGGGATAACC

AGTTCACTACTGGCGGCAATATTCATTGA-3'

El producto de la PCR final se electroporó en la cepa XQ39 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA* *PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc PargD::Ptrc*) preparada en el Ejemplo 2-3, preparando así una cepa XQ43 (W3110 (W3110) *lacI* (W3110) *speE* (W3110) *speG* (W3110) *argI* (W3110) *puuP* (W3110) *puuA* *PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc PargD::Ptrc PspeC::Ptrc*). Después, las células del microorganismo recombinante se cultivaron en una placa de agar que contiene cloranfenicol, mientras que las células en las que se produjo recombinación homóloga doble se seleccionaron en la placa de agar. La sustitución con el promotor *trc* se confirmó mediante análisis de secuencia de ADN.

Ejemplo 3: Producción de putrescina usando microorganismos mutantes

Cada una de las cepas mutantes (mutantes de *E. coli* K12 WL3110) de la Tabla 1, preparadas en los Ejemplos 1 y 2, se cultivó en un matraz en medio R mínimo que contiene 4 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 13,5 g/l de KH₂PO₄, 1,7 g/l ácido cítrico, 0,7 g/l de MgSO₄·7H₂O y disolución de metales en trazas al 0,5% (v/v) (Lee, S.Y. y Chang, H.N., *Biotechnol. Lett.*, 15: 971-974, 1993). La disolución de metales en trazas contenía (por litro): 5 M de HCl, 10 g de FeSO₄·7H₂O, 2,25 g de ZnSO₄·7H₂O, 1 g de CuSO₄·5H₂O, 0,5 g de MnSO₄·5H₂O, 0,23 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, 2 g de CaCl₂·2H₂O, y 0,1 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄. De forma separada, una disolución que contiene glucosa (100 g/l) se esterilizó y se añadió al medio esterilizado hasta una concentración final de 10 g/l.

Se inocularon en medio mínimo 100 µl de cada uno de los cultivos celulares activados en medio LB, y después se cultivaron a 30°C a 220 rpm durante 24 horas, hasta que la OD₆₀₀ máxima alcanzó 5. Después, se añadió 1 ml del caldo de cultivo a un matraz con deflectores de 350 ml que contiene 50 ml del mismo medio, y entonces se cultivó a 30°C a 220 rpm durante 15 horas. Las células se separaron mediante centrifugación, y el sobrenadante se analizó mediante HPLC. Las aminas contenidas en el sobrenadante se detectaron mediante derivación con offtaldialdehído (OPA) en un sistema de Hewlett Packard 1100 Series (230 nm) usando una columna de fase inversa C18 (tampón A: 45% de acetato de sodio 0,1 M, pH 7,2; tampón B: metanol. El análisis se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 1-6 min.: equilibración con 100% de tampón A, 6-10 min.: gradiente lineal desde 0 hasta 30% de tampón B, 10-15 min.: gradiente desde 30% hasta 50% de tampón B, 15-19 min.: gradiente desde 50% hasta 100% de tampón B, 19-23 min.: gradiente hasta 100% de tampón B, y 23-25 min.: gradiente desde 100% hasta 30% de tampón B, 25-28 min.: desde 30% de B hasta 100% de A con un caudal de 0.8 ml/min.). Aquí, se usó un patrón para la calibración, y las concentraciones medidas de putrescina se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Cepa	Genotipo	Concentración de putrescina (mg/l)
WL3110	W3110 Δ <i>lacI</i>	0
XQ08	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i>	0,65
XQ17	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>puuA</i>	0
XQ22	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i>	0,6
XQ23	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>spaE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>argI</i>	1,8
XQ26	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>argI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i>	8,5
XQ27	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>ygjG</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i>	4,2
XQ29	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>ygjG</i> Δ <i>argI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i>	8,5
XQ33	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>argI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i> <i>PargECBH::Ptrc</i>	28,3
XQ37	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>argI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i> <i>PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc</i>	510
XQ39	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>argI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i> <i>PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc PargD::Ptrc</i>	820
XQ43	W3110 Δ <i>lacI</i> Δ <i>speE</i> Δ <i>speG</i> Δ <i>argI</i> Δ <i>puuP</i> Δ <i>puuA</i> <i>PargECBH::Ptrc PspeF-potE::Ptrc PargD::Ptrc PspeC::Ptrc</i>	827

Como se puede ver en la Tabla 1, en los microorganismos mutantes en los que se han suprimido los genes (*puuP*,

puuA, *speE*, *speG*, y *argI*) implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina, las capacidades de los microorganismos mutantes para producir putrescina se incrementaron dependiendo del tipo y número de los genes suprimidos. También, se pudo observar que las capacidades de los microorganismos mutantes para producir putrescina aumentaron adicionalmente cuando los promotores del gen (*argECBH*) que codifica el operón para la biosíntesis de arginina, del gen que codifica acetilornitina aminotransferasa, del gen (*speF-potE*) que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, y del gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa, se sustituyeron por el promotor fuerte.

Ejemplo 4: Amplificación del gen (*speC*) que codifica ornitina descarboxilasa

4-1: Preparación del plásmido pKKSpeC

La ornitina descarboxilasa que codifica el gen *speC* de *E. coli* W3110 biosintética constitutiva se clonó en el vector de expresión pKK223-3 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que usa el promotor tac para la expresión génica. La PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 34 y 35 usando como molde el ADN genómico de *E. coli* W3110 (derivado de *E. coli* K-12, λ^- , F⁻, prototrófico) preparando así un fragmento de *speC* (2156 pb).

SEQ ID NO: 34: 5'-CAGCGAATTCATGAAATCAATGAATATTGCC-3'

SEQ ID NO: 35: 5'-CATTCTGCAGTTACTTCAACACATAACCGTA-3'

A continuación, el fragmento de *speC* preparado (2156 pb) y el plásmido pKK223-3 se trataron con enzimas de restricción (EcoRI y PstI), y después con T4 ADN ligasa, y el fragmento de *speC* y el plásmido pKK223-3, digeridos con las enzimas de restricción, se fusionaron entre sí, preparando así un vector plasmídico recombinante pKKSpeC de número de copias elevado.

4-2: Preparación del plásmido p15SpeC

La ornitina descarboxilasa que codifica el gen *speC* de *E. coli* W3110 biosintética constitutiva se clonó en el vector de expresión pTac15K (origen p15A, pocas copias, KmR; lote KAISTMBEL), que usa el promotor tac para la expresión génica. La PCR se llevó a cabo con los cebadores de SEQ ID NOS: 34 y 35 usando como molde el ADN genómico de *E. coli* W3110 (derivado de *E. coli* K-12, λ^- , F⁻, prototrófico) preparando así un fragmento de *speC* (2156 pb).

A continuación, el fragmento de *speC* preparado (2156 pb) y el plásmido pTac15K se trataron con enzimas de restricción (EcoRI y PstI), y después con T4 ADN ligasa, y el fragmento de *speC* y el plásmido pTac15K, digeridos con las enzimas de restricción, se fusionaron entre sí, preparando así un vector plasmídico recombinante p15SpeC de número de copias bajo.

4-3: Preparación de la cepa WL3110/pKKSpeC

El vector pKKSpeC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa WL3110 preparada en el Ejemplo 1-1, obteniendo de este modo una cepa WL3110/pKKSpeC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

4-4: Preparación de la cepa XQ17/pKKSpeC

El vector pKKSpeC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa XQ17 preparada en el Ejemplo 1-3, obteniendo así una cepa XQ17/pKKSpeC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

4-5: Preparación de la cepa XQ22/pKKSpeC

El vector pKKSpeC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa XQ22 preparada en el Ejemplo 1-4, obteniendo así una cepa XQ22/pKKSpeC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

4-6: Preparación de la cepa XQ26/pKKSpeC

El vector pKKSpeC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa XQ26 preparada en el Ejemplo 1-6, obteniendo así una cepa XQ26/pKKSpeC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

4-7: Preparación de la cepa XQ33/pKKSpeC

El vector pKKSpeC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa XQ33 preparada en el Ejemplo 2-1, obteniendo así una cepa XQ33/pKKSpeC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

4-8: Preparación de la cepa XQ37/pKKSpcC

El vector pKKSpcC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa XQ37 preparada en el Ejemplo 2-2, obteniendo así una cepa XQ37/pKKSpcC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

5 4-9: Preparación de la cepa XQ39/pKKSpcC

El vector pKKSpcC preparado en el Ejemplo 4-1 se introdujo en la cepa XQ39 preparada en el Ejemplo 2-3, obteniendo así una cepa XQ39/pKKSpcC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

4-10: Preparación de la cepa XQ43/pKKSpcC

10 El vector p15SpeC preparado en el Ejemplo 4-2 se introdujo en la cepa XQ43 preparada en el Ejemplo 2-4, obteniendo así una cepa XQ43/pKKSpcC. Después, la cepa preparada se cultivó en medio sólido de agar que contiene ampicilina, mientras que se seleccionaron los microorganismos mutantes recombinantes.

Ejemplo 5: Producción de putrescina usando microorganismo mutante en el que se ha amplificado el gen (speC) que codifica ornitina descarboxilasa

15 Cada una de las cepas mutantes preparadas en el Ejemplo 4 se cultivaron en un matraz de agitación que contiene el mismo medio como se describe en el Ejemplo 3. Se inocularon en medio mínimo 100 µl de cada uno de los cultivos celulares activados en medio LB, y después se cultivaron a 30°C a 220 rpm durante 30 horas, hasta que la OD₆₀₀ máxima alcanzó 5. A continuación, se añadió 1 ml del caldo de cultivo a un matraz con deflectores de 350 ml que contiene 50 ml del mismo medio, y entonces se cultivó a 30°C a 220 rpm durante 27 horas. Las células se separaron mediante centrifugación, y el sobrenadante se analizó mediante HPLC en las mismas condiciones como se describen en el Ejemplo 3. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa/plásmido	Concentración de putrescina (mg/l)
WL3110/pKKSpcC	220
XQ17/pKKSpcC	368
XQ22/pKKSpcC	400
XQ26/pKKSpcC	433
XQ33/pKKSpcC	910
XQ37/pKKSpcC	1100
XQ39/pKKSpcC	1189
XQ43/p15SpeC	1317

25 Como se puede observar en la Tabla 3, las capacidades productoras de putrescina de los microorganismos mutantes (WL3110/pKKSpcC, XQ17/pKKSpcC, XQ22/pKKSpcC, XQ26/pKKSpcC, XQ33/pKKSpcC, XQ37/pKKSpcC, XQ39/pKKSpcC y XQ43/p15SpeC) que tienen actividades reducidas de degradación y utilización de putrescina se incrementaron significativamente en comparación con las de los microorganismos mutantes (WL3110, XQ17, XQ22, XQ26, XQ33, XQ37, XQ39 y XQ43) de la Tabla 1 en los que no se introdujo pKKSpcC ni p15SpeC, cuando se coexpresaron con ornitina descarboxilasa speC.

30 **Ejemplo 6: Preparación de putrescina mediante cultivo de lote alimentado de la cepa XQ37/pKKSpcC**

35 El potencial de actividad reducida de degradación y utilización de putrescina se analizó junto con la actividad de descarboxilasa en fermentación de lote alimentado. La fermentación de lote alimentado se llevó a cabo en un fermentador de 6,6 litros (Bioflo 3000; New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) tras añadir 10 g/l de glucosa a 2 litros de medio R mínimo. Se añadió 1 ml del cultivo de XQ37/pKKSpcC activado en medio LB a un matraz con deflectores de 350 ml que contiene 50 ml del mismo medio, y entonces se cultivó a 30°C a 220 rpm durante 24 horas, hasta que la OD₆₀₀ máxima alcanzó 5. Subsiguientemente se usaron 200 ml del precultivo para la inoculación en el fermentador. El oxígeno disuelto en el caldo fermentado se mantuvo con aire saturado al 20% incrementando automáticamente una velocidad de agitación de 850 rpm. Cuando el pH del caldo fermentado se incrementó en alrededor de 0,2 unidades de pH desde un pH fijo de 6,8 como resultado del agotamiento de la glucosa, se añadió

automáticamente la disolución que contiene glucosa a fin de incrementar la concentración de glucosa hasta más de 3 g/l. La disolución que contiene glucosa contenía 500 g/l de glucosa y 200 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A lo largo de todo el período de fermentación, excepto por un tiempo corto cuando el pH se incrementó debido al agotamiento de la glucosa, el pH del caldo fermentado se mantuvo a un pH de 6,8 añadiendo disolución de amoníaco al 28% (v/v). El caldo fermentado se muestreó y se centrifugó para separar las células, y el sobrenadante se analizó mediante HPLC de la misma manera como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 2. Como se muestra en la FIG. 2, la cepa XQ37/pKKSpc produjo 14,3 g/l de putrescina durante 55,8 horas tras la inoculación, y la productividad máxima de putrescina fue $0,28 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 47 horas después de la inoculación.

Ejemplo 7: Producción de putrescina mediante cultivo de lote alimentado de la cepa XQ39

La fermentación de lote alimentado se llevó a cabo de la misma manera como se describió en el Ejemplo 6, excepto que se usó la cepa XQ39 en lugar de la XQ37/pKKSpc. El caldo fermentado se analizó mediante HPLC, y los resultados del análisis se muestran en la FIG. 3. Como se muestra en la FIG. 3, la cepa XQ39 produjo 14,7 g/l durante 36 horas tras la inoculación, y la productividad máxima de putrescina fue $0,42 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 31 horas después de la inoculación.

Ejemplo 8: Producción de putrescina mediante cultivo de lote alimentado de la cepa XQ43

La cepa XQ43 se cultivó en un matraz en 50 ml de R/2 mínimo (que contiene 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6,75 g/l de KH_2PO_4 , 0,85 g/l de ácido cítrico, 0,7 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, disolución de metales en trazas al 0,5% (v/v)) (Qian et al., Biotechnol, and Bioeng, 101(3): 587-601, 2008) suplementado con 3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La disolución de metales en trazas contenía (por litro): 5 M de HCl, 10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 0,1 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. De forma separada, una disolución que contiene glucosa (100 g/l) se esterilizó y se añadió al medio esterilizado hasta una concentración final de 10 g/l. Se añadió 1 ml del cultivo de XQ43 activado en medio LB a un matraz con deflectores de 350 ml que contiene 50 ml del medio descrito anteriormente, y entonces se cultivó a 37°C a 220 rpm durante 24 horas, hasta que la OD_{600} del cultivo alcanzó 3,3. Subsiguientemente se usaron 200 ml del precultivo para la inoculación en un fermentador. El oxígeno disuelto en el cultivo se mantuvo con aire saturado al 20% incrementando automáticamente una velocidad de agitación de 1000 rpm.

La fermentación de lote alimentado de la cepa XQ43 se llevó a cabo en un fermentador de 6,6 litros (Bioflo 3000; New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) tras añadir 10 g/l de glucosa. Cuando el pH del caldo fermentado se incrementó en alrededor de 0,01 unidades de pH desde un pH fijo de 6,8 como resultado del agotamiento de la glucosa, se añadió automáticamente una disolución que contiene glucosa a fin de incrementar la concentración de glucosa hasta más de 2 g/l. La disolución que contiene glucosa contenía 522 g/l de glucosa, 8 g/l de MgSO_4 y 170 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A lo largo de todo el período de fermentación, excepto por un tiempo corto cuando el pH se incrementó debido al agotamiento de la glucosa, el pH del caldo fermentado se mantuvo a 6,8 añadiendo disolución 10 M de KOH. El caldo fermentado se muestreó y se centrifugó para separar las células, y el sobrenadante se analizó mediante HPLC de la misma manera como se describió en el Ejemplo 3. Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 4. Como se muestra en la FIG. 4, la cepa XQ43 produjo 18,0 g/l de putrescina durante 30 horas tras la inoculación, y la productividad máxima de putrescina fue $0,63 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 28 horas después de la inoculación.

Ejemplo 9: Producción de putrescina mediante cultivo de lote alimentado de la cepa XQ43/p15SpeC

La fermentación de lote alimentado se llevó a cabo de la misma manera como se describió en el Ejemplo 8, excepto que se usó la cepa XQ43/p15SpeC en lugar de la XQ43. El caldo fermentado se analizó mediante HPLC, y los resultados del análisis se muestran en la FIG. 5. Como se muestra en la FIG. 5, la cepa XQ43/p15SpeC produjo 21,7 g/l de putrescina durante 37 horas después de la inoculación, y la productividad máxima de putrescina fue $0,58 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tras 37 horas después de la inoculación.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Como se describió con detalle anteriormente, la presente invención proporciona microorganismos mutantes que tienen la capacidad para producir putrescina. Estos microorganismos mutantes son útiles para producir un rendimiento elevado de putrescina que se usa en un amplio intervalo de aplicaciones industriales.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Korea Advanced Institute of science and Technology
- <120> MICROORGANISMOS MUTANTES QUE TIENEN CAPACIDAD ELEVADA PARA PRODUCIR PUTRESCINA, Y MÉTODO PARA PRODUCIR PUTRESCINA USANDO LOS MISMOS
- <130> 20693EP
- <140> PCT/KR2009/001103
- < 141> 2009-03-05

ES 2 589 378 T3

<150> 10-2008-0033125
< 151> 2008-04-10
<160> 40
<170> PatentIn versión 3.2
5 <210> 1
< 211> 73
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
10 < 223> cebador 1
<400> 1
gtgaaaccag taacgttata cgatrtcgca gagtatgccg gtgtctctta gattggcagc 60
attacacgtc ttg 73
<210> 2
< 211> 70
15 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 2
<400> 2
tcactgcccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg cacttaacgg 60
20 ctgacatggg 70
<210> 3
< 211> 70
< 212> ADN
< 213> Artificial
25 <220>
< 223> cebador 3
<400> 3
cgcctgaata atttcggttg agagatggcg taaggcgtcg ttatctgtcg gacactatag 60
aacgcggccg 70
<210> 4
30 < 211> 70
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 4

ES 2 589 378 T3

<400> 4
 atgttgcgcc ctttttttac ggggtgtaac aaaggaggta tcaacccatg ccgcataggc 60
 cactagtgga 70
 <210> 5
 < 211> 70
 5 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 5
 <400> 5
 gatgaaacaa ccccgcaagg ggtattacgc gtttttcaac atccactcaa gacactatag 60
 10 aacgcggccg 70
 <210> 6
 < 211> 70
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 15 <220>
 < 223> cebador 6
 <400> 6
 cgagcggaaa acaaaccaaa ggccaagaat catggaaacc aatatcgttg ccgcataggc 60
 cactagtgga 70
 <210> 7
 20 < 211> 70
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 7
 25 <400> 7
 tcaccatcat acaacggcac tttgcatag cggcggatca gataccataa gacactatag 60
 aacgcggccg 70
 <210> 8
 < 211> 70
 < 212> ADN
 30 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 8
 <400> 8

ES 2 589 378 T3

cgctgaata atttcggttg agagatggcg taaggcgtcg ttatctgtcg gacactatag 60
 aacgcggccg 70
 <210> 9
 < 211> 70
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 9
 <400> 9
 atgttgccg ctttttttac gggtgtaac aaaggaggta tcaacccatg ccgcataggc 60
 cactagtgga 70
 10 <210> 10
 < 211> 69
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> cebador 10
 <400> 10
 aatgtaagga cacgttatgc caagcggcca cagtgttaag ctacggccgg acactataga 60
 acgcggccg 69
 <210> 11
 < 211> 70
 20 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 11
 <400> 11
 ctattgtgcg gtcggcttca ggagagtctg acccggtgtt ttgtgctctg ccgcataggc 60
 cactagtgga 70
 25 <210> 12
 < 211> 70
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 30 <220>
 < 223> cebador 12
 <400> 12

ES 2 589 378 T3

	taatgtgatg ccgggatggt ttgtatttcc cggcatcttt atagcgatag gacactatag	60
	aacgcggccg	70
	<210> 13	
	< 211> 70	
	< 212> ADN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador 13	
	<400> 13	
	ccatataaat tgaattttaa ttcattgagg cgttagccac aggagggatc ccgcataggc	60
	cactagtgga	70
10	<210> 14	
	< 211> 71	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> cebador 14	
	<400> 14	
	atagcaatag aacactttgg gtggaagaat agacctatca ctgcataaaa taatgtgatg	60
	ccgggatggt t	71
	<210> 15	
	< 211> 70	
20	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador 15	
	<400> 15	
	ccacctttgt gacaaagatt tatgcttttag acttgcaaat gaataatcat ccatataaat	60
25	tgaattttaa	70
	<210> 16	
	< 211> 70	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
30	<220>	
	< 223> cebador 16	
	<400> 16	

ES 2 589 378 T3

ctgcaatact taaatcggta tcatgtgata cgcgagcctc cggagcatat gacactatag 60
 aacgcggccg 70
 <210> 17
 < 211> 70
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 17
 <400> 17
 cgtcgtatcg ccatccgatt tgatattacg cttcttcgac acttactcgc ccgcataggc 60
 cactagtgga 70
 10 <210> 18
 < 211> 75
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> cebador 18
 <400> 18
 tatccgctca caattccaca cattatacga gccggatgat taattgtcaa cagctgacac 60
 tatagaacgc ggccg 75
 <210> 19
 < 211> 75
 20 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 19
 <400> 19
 tatccgctca caattccaca cattatacga gccggatgat taattgtcaa cagctccgca 60
 taggccacta gtgga 75
 25 <210> 20
 < 211> 75
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 30 <220>
 < 223> cebador 20
 <400> 20

ES 2 589 378 T3

cgctggcacc cacaatcagc gtattcaaca tggctctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 60
 gctcacaatt ccaca 75
 <210> 21
 < 211> 75
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 21
 <400> 21
 tctcgataaa tggcggtaat ttgtttttca tggctctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 60
 gctcacaatt ccaca 75
 10 <210> 22
 < 211> 75
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> cebador 22
 <400> 22
 atgttcatat gcggatggcg atttacaatag gtcactagct ctgcgccagc gtagccgctg 60
 gcacccacaa tcagc 75
 <210> 23
 < 211> 75
 20 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 23
 <400> 23
 tcgagtgctt cttccgtggc gcttattgaa ggtgtggcaa tcagagcgcg gtaaattctcg 60
 25 ataaatggcg gtaat 75
 <210> 24
 < 211> 62
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 30 <220>
 < 223> cebador 24
 <400> 24

ES 2 589 378 T3

actaagggca cttcagcgta caggtcttcc tgactctctg tagacactat agaacgcggc 60
 cg 62
 <210> 25
 < 211> 60
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 25
 <400> 25
 agcttcgact tcacttct caatgcccg tagtctaccg actaagggca cttcagcgta 60
 10 <210> 26
 < 211> 75
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> cebador 26
 <400> 26
 aatcactaac cgcaatTTTT aattttgaca tgggtctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 60
 gctcacaatt ccaca 75
 <210> 27
 < 211> 60
 20 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 27
 <400> 27
 25 aaggcggaca actcatatta tgaagttgc tcatcgcaat agcttcgact tcacttct 60
 <210> 28
 < 211> 77
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 30 <220>
 < 223> cebador 28
 <400> 28
 cgactttcat taatgtagat acattctcgc tgcgtggtaa aacagtccgg gcaagaatca 60
 ctaaccgcaa tttttaa 77
 <210> 29

ES 2 589 378 T3

< 211> 60
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
5 < 223> cebador 29
<400> 29
caactgctgg ctaatttct gcatcgctga tttctgattg gacactatag aacgcgccg 60
<210> 30
< 211> 60
10 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 30
<400> 30
15 gcagttccat ccagaaagta ttcttagcga acaaggacat caactgctgg ctaatttct 60
<210> 31
< 211> 75
< 212> ADN
< 213> Artificial
20 <220>
< 223> cebador 31
<400> 31
cgcggtgaat tgctgtttgt tcaattgccca tggctctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 60
gctcacaatt ccaca 75
<210> 32
25 < 211> 60
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 32
30 <400> 32
ttatggggat tcgcatcgc cagtgggatc tggaaggtgt gcagttccat ccagaaagta 60
<210> 33
< 211> 58
< 212> ADN
35 < 213> Artificial
<220>

ES 2 589 378 T3

< 223> cebador 33
<400> 33
cggagcataa atcggcagga tcactcatc gaaagtcgcg cgtgtaattg ctgtttgt 58
<210> 34
5 < 211> 31
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 34
10 <400> 34
cagcgaattc atgaaatcaa tgaatattgc c 31
<210> 35
< 211> 31
< 212> ADN
15 < 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 35
<400> 35
cattctgcag ttactcaac acataaccgt a 31
20 <210> 36
< 211> 70
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
25 < 223> cebador 36
<400> 36
tttgcccgat gcacgccatc tccttacatt ctctcgctta tcgccgtttc gacactatag 60
aacgcggccg 70
<210> 37
< 211> 57
30 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> cebador 37
<400> 37
35 tgccatgatt gcgcgaattt tctcctctct gtacggagtt tgcccgatgc acgccat 57
<210> 38

ES 2 589 378 T3

< 211> 75
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 5 < 223> cebador 38
 <400> 38
 tactggcggc aatattcatt gatttcatgg tctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 60
 cacaattcca cacat 75
 <210> 39
 < 211> 69
 10 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador 39
 <400> 39
 gatggcttgt ttgttcgcaa agtcctggct tgcacgcttt agcgaaagggt gccatgattg 60
 15 cgcgaattt 69
 <210> 40
 < 211> 75
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 20 <220>
 < 223> cebador 40
 <400> 40
 atctccaac gccaccacgc gacgatgaga agaaagtcgg gataccagtt cactactggc 60
 ggcaatattc attga 75

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *speE* que codifica espermidina sintasa, un gen *speG* que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen *argI* que codifica monómero de la cadena I de ornitina carbamoiltransferasa, y un gen *puuP* que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina; y en el que además está inactivado o suprimido al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *puuA* que codifica γ -glutamylputrescina sintasa, un gen *ygjG* que codifica putrescina transaminasa, y un gen *argF* que codifica ornitina carbamoiltransferasa F; y en el que un promotor de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *argECBH* que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, un gen *argD* que codifica acetilornitina aminotransferasa, y un gen *speF-potE* que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, se sustituye por un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*; y seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.*
2. El microorganismo mutante de la reivindicación 1, en el que además se introduce o amplifica un gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa.
3. Un método para preparar un microorganismo mutante seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.* que tiene la capacidad para producir putrescina, comprendiendo el método: inactivar o suprimir al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *speE* que codifica espermidina sintasa, un gen *speG* que codifica espermidina N-acetiltransferasa, un gen *argI* que codifica ornitina carbamoiltransferasa I, y un gen *puuP* que codifica el importador de putrescina, que están implicados en la ruta de degradación o utilización de putrescina, a partir de un microorganismo que tiene una ruta de producción de putrescina; y además se inactiva o suprime al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *puuA* que codifica γ -glutamylputrescina sintasa, un gen *ygjG* que codifica putrescina transaminasa, y un gen *argF* que codifica ornitina carbamoiltransferasa F.
4. Un método para preparar un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina según la reivindicación 3, que comprende además introducir o amplificar un gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa, antes o después de la inactivación o supresión.
5. El método para preparar un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina según la reivindicación 3, que comprende además sustituir un promotor de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen *argECBH* que codifica un operón para la biosíntesis de arginina, un gen *argD* que codifica acetilornitina aminotransferasa, y un gen *speF-potE* que codifica ornitina descarboxilasa inducible y el antiportador de putrescina/ornitina, por un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor *trc*, un promotor *tac*, un promotor T7, un promotor *lac* y un promotor *trp*.
6. El método para preparar un microorganismo mutante que tiene la capacidad para producir putrescina según la reivindicación 5, que comprende además introducir o amplificar un gen *speC* que codifica ornitina descarboxilasa.
7. Un método para producir putrescina, comprendiendo el método: cultivar el microorganismo mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para producir putrescina, y recuperar putrescina del caldo de cultivo.

FIG. 1

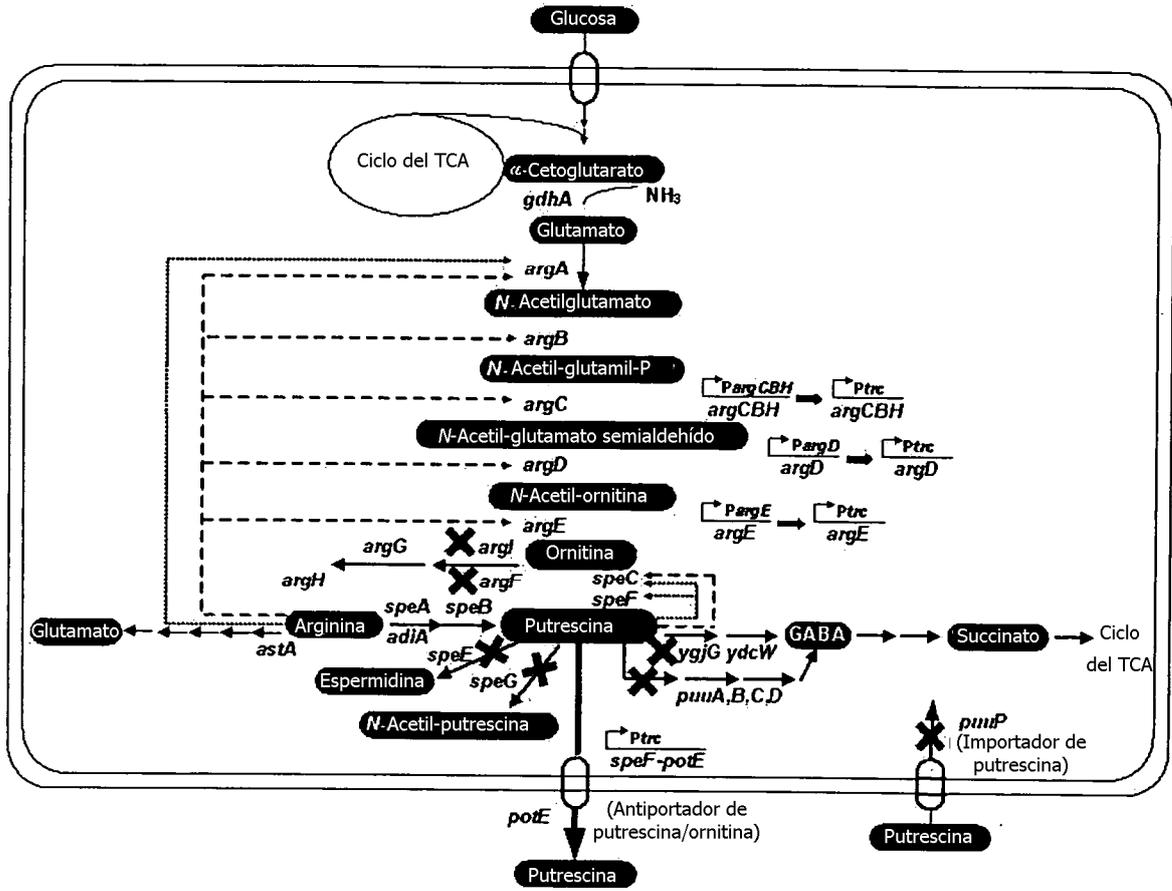


FIG. 2

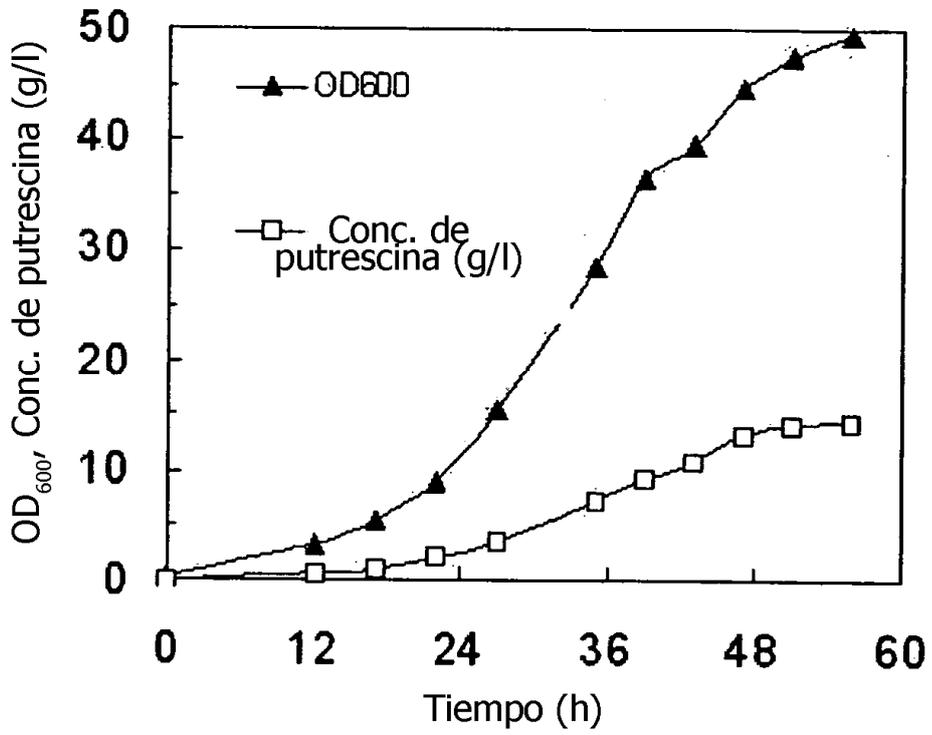


FIG. 3

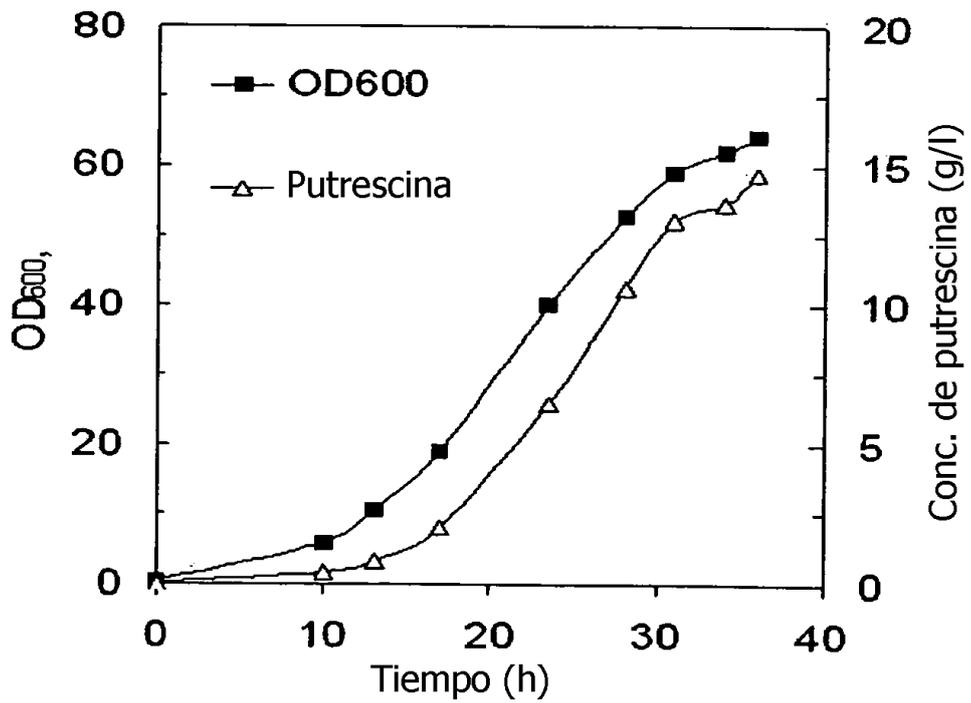


FIG. 4

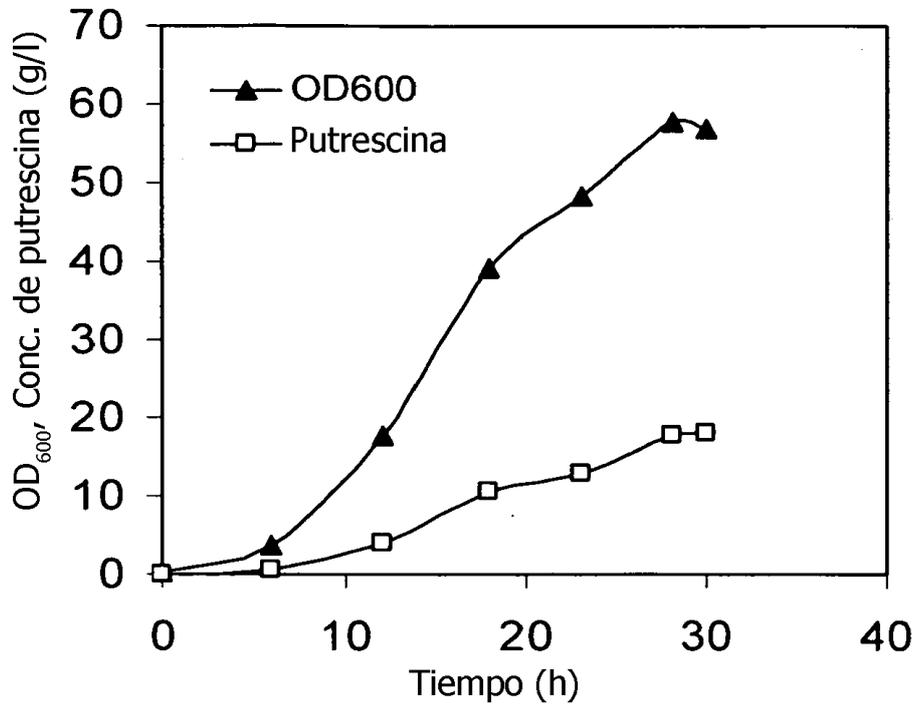


FIG. 5

