

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 887**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

C12P 13/02 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2007 PCT/EP2007/052783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2007 WO07113127**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2007 E 07727257 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2013353**

54 Título: **Procedimiento la producción de cadaverina**

30 Prioridad:

30.03.2006 EP 06112029

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

02.12.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**ZELDER, OSKAR;
JEONG, WEOL KYU;
KLOPPROGGE, CORINNA;
HEROLD, ANDREA y
SCHRÖDER, HARTWIG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 592 887 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

Procedimiento la producción de cadaverina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de cadaverina. Más particularmente, esta invención se refiere al uso de microorganismos recombinantes que comprenden moléculas de ADN en una forma desregulada que son esenciales para producir cadaverina.

Técnica anterior

- El documento JP 2002223770 divulga un método para producir cadaverina por medio de introducción de un gen de descarboxilación de lisina y/o un gen antiportador de lisina-cadaverina en un microorganismo que produce lisina.
- 10 El documento JP 2004222569 divulga un método para producir cadaverina por medio del cultivo de bacterias corineformes recombinantes que tienen actividad descarboxilasa de L-lisina y auxotrofia homoserina.

Sumario de la invención

- 15 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de cadaverina por medio de la construcción de un microorganismo recombinante que tiene una lisina descarboxilasa sobreexpresada, una actividad de diamina acetiltransferasa subregulada y al menos un gen desregulado seleccionado de genes que son esenciales en la ruta biosintética de lisina, y que cultiva dicho microorganismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de poliamidas que comprenden un paso, como se mencionó anteriormente, para la producción de cadaverina y que reaccionan tal cadaverina con un ácido dicarboxílico.

20 Descripción detallada de la invención

En la descripción que sigue, se usan un número de términos extensivamente. Se proporcionan definiciones en la presente memoria para facilitar el entendimiento de la invención.

El término cadaverina indica 1,5-diaminopentano.

- 25 **Promotor.** Una secuencia de ADN que dirige la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Típicamente, un promotor está localizado en la región 5' de un gen, proximal al codón de inicio de un gen estructural. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un gen que induce. En contraste, la tasa de transcripción no es regulada por un gen que induce, si el promotor es un promotor constitutivo.

- 30 **Potenciador.** Un elemento promotor. Un potenciador puede aumentar la eficiencia con la cual un gen particular se transcribe en ARNm independientemente de la distancia o la orientación del potenciador en relación al sitio de inicio de la transcripción.

Expresión. La expresión es un procedimiento por el cual un polipéptido es producido desde un gen estructural. El procedimiento implica la transcripción de un gen en ARNm y la traducción de tal ARNm en polipéptidos.

- 35 **Vector de clonación.** Una molécula de ADN, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o bacteriófago, que tienen la capacidad de replicarse autónomamente en una célula anfitriona y que es usada para transformar células para manipulación de genes. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción en los cuales las secuencias extranjeras de ADN se pueden insertar de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que es adecuado para el uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación.
- 40 Los genes marcadores típicamente incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina.

- 45 **Vector de expresión.** Una molécula de ADN que comprende un gen estructural clonado que codifica una proteína extranjera que proporciona la expresión de la proteína extranjera en el anfitrión recombinante. Típicamente, la expresión del gen clonado es ubicado bajo el control de (es decir, vinculada operablemente a) ciertas secuencias regulatorias tales como secuencias promotoras y potenciadoras. Las secuencias promotoras pueden ser ya sea constitutivas o inducibles.

Anfitrión recombinante. Un anfitrión recombinante puede ser cualquier célula procariota o eucariota que contiene ya sea un vector de clonación o un vector de expresión. Este término también indica que incluye aquellas células

procariotas o eucariotas que han sido genéticamente diseñadas para contener los genes clonados en el cromosoma o genoma de la célula anfitriona. Para ejemplos de anfitrionas adecuadas, véase Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) ["Sambrook"].

5 Como es usada en la presente memoria, una proteína sustancialmente pura indica que la proteína purificada deseada es esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, como se evidencia por una sola banda después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El término "sustancialmente pura" se indica además para describir una molécula que es homogénea por una o más características de pureza u homogeneidad usadas por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, una lisina
10 descarboxilasa sustancialmente pura mostrará características constantes y reproducibles dentro de desviaciones experimentales estándar para parámetros tales como los siguientes: peso molecular, migración cromatográfica, composición de aminoácidos, secuencia de aminoácidos, terminal N bloqueado o no bloqueado, perfil de elución de HPLC, actividad biológica, y otros parámetros. El término, sin embargo, no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas de lisina descarboxilasa con otros compuestos. Adicionalmente, el término no pretende excluir
15 proteínas de fusión de lisina descarboxilasa aisladas de un anfitrión recombinante.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de cadaverina mediante la construcción de un microorganismo recombinante que tiene un gen de lisina descarboxilasa subregulado, un actividad de diamina acetiltransferasa subregulada y al menos un gen desregulado seleccionado del grupo (i) que consiste en aspartoquinasa sobrerregulada, aspartato semialdehído deshidrogenasa
20 sobrerregulada, dihidrodipicolinato sintasa sobrerregulada, dihidrodipicolinato reductasa sobrerregulada, tetrahidrodipicolinato succinilasa sobrerregulada, succinil-amino-cetopimelato transaminasa sobrerregulada, succinil-diamino-pimelato desuccinilasa sobrerregulada, diaminopimelato epimerasa sobrerregulada, diaminopimelato deshidrogenasa sobrerregulada, arginil-ARNt sintetasa sobrerregulada, diaminopimelato
25 descarboxilasa sobrerregulada, piruvato carboxilasa sobrerregulada, fosfoenolpiruvato carboxilasa sobrerregulada, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobrerregulada, transcetolasa sobrerregulada, transaldolasa sobrerregulada, 6-fosfogluconolactonasa sobrerregulada, fructosa 1,6-bisfosfatasa sobrerregulada, homoserina deshidrogenasa subregulada, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa subregulada, succinil-CoA sintetasa subregulada, metilmalonil-CoA mutasa subregulada, a condición de que si la aspartoquinasa es desregulada como gen (i) al menos un segundo gen (i) diferente de aspartoquinasa debe ser desregulado, y cultivar dicho microorganismo.

30 Las metodologías de la presente invención presentan microorganismoS recombinantes, preferiblemente que incluyen vectores o genes (por ejemplo, genes de tipo silvestre y/o multados) como se describe en la presente memoria y/o cultivados en una forma que resulta en la producción de cadaverina.

El término microorganismo "recombinante" incluye un microorganismo (por ejemplo, bacterias, células de levadura, células de hongos, etc.) que ha sido genéticamente alterado, modificado o diseñado (por ejemplo, genéticamente diseñado) tal que exhibe un genotipo y/o fenotipo alterado, modificado o diferente (por ejemplo, cuando la modificación genética afecta a las secuencias de ácido nucleico que codifican del microorganismo) en comparación con el microorganismo de origen natural del que se deriva.

El término "desregulado" incluye la expresión de un producto de gen (por ejemplo, lisina descarboxilasa) a un nivel más bajo o más alto que el expresado antes de la manipulación del microorganismo o en un microorganismo comparable que no ha sido manipulado. En una realización, el microorganismo puede ser genéticamente manipulado (por ejemplo, diseñado genéticamente) para expresar un nivel de producto de gen a un nivel más bajo o más alto que el expresado antes de la manipulación del microorganismo o en un microorganismo comparable que no ha sido manipulado. La manipulación genética puede incluir, pero no está limitada a, alterar o modificar secuencias regulatorias o sitios asociados con la expresión de un gen particular (por ejemplo, mediante la eliminación de promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples), que modifica la ubicación cromosómica de un gen particular, que altera las secuencias de ácido nucleico adyacentes a un gen particular tal como un sitio de unión de ribosoma o terminador de transcripción, que disminuye el número de copias de un gen particular, que modifica proteínas (por ejemplo, proteínas reguladoras, supresores, potenciadores, activadores de la transcripción y similares) implicados en la transcripción de un gen particular y/o traducción de un producto de gen particular, o cualquier otro medio convencional de desregulación de la expresión de una rutina de gen
50 gen particular en la técnica (que incluye pero no está limitada al uso de moléculas de ácido nucleico antisentido, u otros métodos para noquear o bloquear expresión de la proteína objetivo).

El término "actividad de gen desregulado", por ejemplo lisina descarboxilasa desregulada, también indica que la actividad del gen, por ejemplo una actividad de lisina descarboxilasa, es introducida en un microorganismo donde
55 la actividad de gen respectiva, por ejemplo la actividad de lisina descarboxilasa, no ha sido observada antes, por ejemplo mediante la introducción de un gen heterólogo, por ejemplo un gen de lisina descarboxilasa en una o más copias en el organismo preferiblemente por medio de ingeniería genética.

La lisina descarboxilasa cataliza la descarboxilación de L-lisina en cadaverina. La enzima ha sido clasificada como E.C. 4.1.1.18. Las enzimas aisladas de *Escherichia coli* que tienen actividad de lisina descarboxilasa son el producto de gen *cadA* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Entrada b4131) y el producto de gen *ldcC* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Entrada JW0181).

- 5 Las secuencias de aminoácidos de *cadA* de *E. coli* son divulgadas en SEQ ID NO: 1 y de *ldcC* de *E. coli* son divulgadas en SEQ ID NO:2.

Las moléculas de ADN que codifican el gen de lisina descarboxilasa de *E. coli* pueden ser obtenidas mediante cribado de ADNc o librerías genómicas con sondas de polinucleótidos que tienen secuencias nucleótidas traducidas en reversa de la secuencia aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.

- 10 Alternativamente, los genes de lisina descarboxilasa de *E. coli* pueden ser obtenidos mediante la síntesis de moléculas de ADN que usan oligonucleótidos cebadores mutuamente largos. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., (edc.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, páginas 8.2.8 a 8.2.13 (1990) ["Ausubel"]. También, véase Wosnick et al., *Gene* 60:115 (1987); y Ausubel et al. (edc.), SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 3ra edición, páginas 8-8 a 8-9 (John Wiley & Sons, Inc. 1995). Las técnicas establecidas que usan la
15 reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la habilidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos 2 kilobases en longitud. Adang et al., *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993); Bambot et al., *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993); Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Vol. 15: PCR PROTOCOLS: CURRENT METHODS AND APPLICATIONS, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993); Holowachuk et al., *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995).
20

- Las variantes de lisina descarboxilasa de *E. coli* pueden ser producidas de tal manera que contienen cambios conservativos de aminoácidos, comparada con la enzima progenitora. Es decir, las variantes pueden ser obtenidas de tal manera que contengan una o más sustituciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en las que un aminoácido alquilo es sustituido por un aminoácido alquilo en la secuencia de aminoácidos de lisina
25 descarboxilasa, un aminoácido aromático es sustituido por un aminoácido aromático en la secuencia de aminoácidos de lisina descarboxilasa de *E. coli*, un aminoácido que contiene sulfuro es sustituido por un aminoácido que contiene sulfuro en la secuencia de aminoácidos de lisina descarboxilasa de *E. coli*, un aminoácido que contiene hidróxido es sustituido por un aminoácido que contiene hidróxido en la secuencia de aminoácidos de lisina descarboxilasa de *E. coli*, un aminoácido ácido es sustituido por un aminoácido ácido en la
30 secuencia aminoácidos de lisina descarboxilasa de *E. coli*, un aminoácido básico es sustituido por un aminoácido básico en la secuencia aminoácidos de lisina descarboxilasa de *E. coli*.

- Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una "sustitución conservativa de aminoácidos" es ilustrada por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada una de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) cisteína y metionina, (4) serina y treonina, (5) aspartato y
35 glutamato, (6) glutamina y asparagina, y (7) lisina, arginina e histidina.

- Los cambios conservativos en aminoácidos en la lisina descarboxilasa de *E. coli* pueden ser introducidos por sustitución de nucleótidos para los nucleótidos citados en SEQ ID NO: 1 o NO: 2. Tales variantes de "aminoácidos conservativos" puede ser obtenidas, por ejemplo, por mutagénesis dirigida de oligonucleótidos, mutagénesis enlazador de escaneo, mutagénesis que usa la reacción en cadena de la polimerasa, y similares. Ausubel et al.,
40 supra, en páginas 8.0.3-8.5.9; Ausubel et al. (eds.), SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 3ra edición, páginas 8-10 a 8-22 (John Wiley & Sons, Inc. 1995). También véase generalmente, McPherson (ed.), DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991). La habilidad de tales variantes para convertir L-lisina a cadaverina puede ser determinada usando un ensayo de actividad enzimática estándar, tal como el ensayo descrito en la presente memoria.

- 45 Las lisina descarboxilasas preferidas de acuerdo con la invención son las lisina descarboxilasas de *E. coli* y sus genes equivalentes, que tienen hasta 80%, preferiblemente 90% y más preferida 95% y 98% de identidad de secuencia (basado en secuencias de aminoácidos) con el producto de gen "original" correspondiente y tienen todavía la actividad biológica de lisina descarboxilasa. Estos genes equivalentes pueden ser fácilmente construidos mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos, eliminaciones o inserciones por métodos conocidos en la
50 técnica.

Otra realización preferida de la invención son las lisina descarboxilasas de *E. coli* (SEQ ID NO: 1 y NO: 2) que son retraducidas en ADN mediante la aplicación del uso de codones de *Corynebacterium glutamicum*. Estas secuencias de polinucleótidos de lisina descarboxilasa son útiles para la expresión de lisina descarboxilasa en microorganismos del género *Corynebacterium*, especialmente *C. glutamicum*.

- 55 Adicionalmente al gen de lisina descarboxilasa desregulado del microorganismo de acuerdo con la invención debe

tener al menos un gen desregulado seleccionado del grupo (i). El grupo (i) es un grupo de genes que juega un papel clave en la biosíntesis de lisina y consiste en los genes de aspartoquinasa, aspartato semialdehído deshidrogenasa, dihidrodipicolinato sintasa, dihidrodipicolinato reductasa, tetrahidrodipicolinato succinilasa, succinil-amino-cetopimelato transaminasa, succinil-diamino-pimelato desuccinilasa, diaminopimelato epimerasa, diaminopimelato deshidrogenasa, arginil-ARNt sintetasa, diaminopimelato descarboxilasa, piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, 6-fosfogluconolactonasa, fructosa 1,6-bifosfatasa, homoserina deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, succinil-CoA sintetasa, metilmalonil-CoA mutasa.

Al menos un gen del grupo (i) debe ser desregulado de acuerdo con el procedimiento inventivo. Preferiblemente más de un gen del grupo (i), por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez genes están desregulados en el microorganismo de acuerdo con la invención.

Los genes y productos de genes del grupo (i) son conocidos en la técnica. El documento EP 1108790 divulga mutaciones en genes de homoserina deshidrogenasa y piruvato carboxilasa que tienen un efecto benéfico en la productividad de corinebacterias recombinantes en la producción de lisina. El documento WO 00/63388 divulga mutaciones en el gen de aspartoquinasa que tiene un efecto benéfico en la productividad de corinebacterias recombinantes en la producción de lisina. Los documentos EP 1108790 y WO 00/63388 son incorporados por referencia con respecto a las mutaciones en estos genes descritos anteriormente.

Son mencionadas en la tabla abajo para cada gen/producto de gen posibles formas de desregulación del gen respectivo. La literatura y documentos citados en la fila "Desregulación" de la tabla son incorporados en la presente memoria por referencia con respecto a la desregulación de gen. Las formas mencionadas en la tabla son realizaciones preferidas de una desregulación del gen respectivo.

Tabla 1

Enzima (producto de gen)	Gen	Desregulación
Aspartoquinasa	ask	Inhibición de retroalimentación de liberación por mutación de puntual (Eggeling et al., (eds.), Handbook of Corynebacterium glutamicum, páginas 20.2.2 (CRCpress, 2005)) y amplificación)
Aspartato semialdehído deshidrogenasa	asd	Amplificación
Dihidrodipicolinato sintasa	dapA	Amplificación
Dihidrodipicolinato reductasa	dapB	Amplificación
Tetrahidrodipicolinato succinilasa	dapD	Amplificación
Cetopimelato succinil- amino- transaminasa	dapC	Amplificación
Succinil- diamino- pimelato desuccinilasa	dapE	Amplificación
Diaminopimelato deshidrogenasa	ddh	Amplificación
Diaminopimelato epimerasa	dapF	Amplificación
Arginil –ARNt sintetasa	argS	Amplificación
Diaminopimelato descarboxilasa	lysA	Amplificación
Piruvato carboxilasa	pycA	Inhibición de retroalimentación de liberación por mutación de puntual (EP1108790) y amplificación
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	ppc	Amplificación
Glucosa-6 -fosfato deshidrogenasa	zwf	Inhibición de retroalimentación de liberación por mutación de puntual (US2003/0175911) y amplificación
Transcetolasa	tkt	Amplificación
Transaldolasa	tal	Amplificación
6-fosfogluconolactonasa	pgl	Amplificación
Fructosa 1,6- bifosfatasa	fbp	Amplificación
Homoserina deshidrogenasa	hom	Atenuación por mutación puntual (EP1108790)
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	pck	Noquear o silenciar por mutación u otros
Succinil- CoA sintetasa	sucC	Atenuación por mutación puntual (WO 05/58945)

Metilmalonil -CoA mutasa

Atenuación por mutación puntual (WO
05/58945)

- 5 La forma de desregulación de los genes de aspartoquinasa, aspartato semialdehído deshidrogenasa, dihidrodipicolinato sintasa, dihidrodipicolinato reductasa, tetrahidrodipicolinato succinilasa, succinil-aminoacetopimelato transaminasa, succinil-diamino-pimelato desuccinilasa, diaminopimelato epimerasa, diaminopimelato deshidrogenasa, arginil-ARNt sintetasa, diaminopimelato descarboxilasa, piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, 6-fosfogluconolactonasa, fructosa 1,6-bifosfatasa es una "sobre" mutación que aumenta la actividad de genes por ejemplo por amplificación de genes que usan señales de expresión fuertes y/o mutaciones puntuales que mejoran la actividad enzimática.
- 10 La forma de desregulación de los genes de homoserina deshidrogenasa, fofoenolpiruvato carboxoquinasa, succinil-CoA sintetasa, metilmalonil-CoA mutasa es una "sub" mutación que disminuye la actividad del gen por ejemplo por supresión del gen o interrupción, que usa señales de expresión débiles y/o mutaciones puntuales que destruyen o disminuyen la actividad enzimática.
- Si la aspartoquinasa es desregulada como un miembro del grupo (i) del gen, al menos un segundo miembro (i) del gen -diferente de aspartoquinasa -debe ser desregulado.
- 15 Se debe observar que una porción significativa de la cadaverina producida en el microorganismo de acuerdo con el procedimiento inventivo se acetila. Con el fin de bloquear esta reacción de acetilación que es atribuida a una diamina acetiltransferasa dependiente de acetil-CoA y con el fin de incrementar el rendimiento de cadaverina de diamina acetiltransferasa del microorganismo productor necesita ser subregulada, especialmente por disminución de su actividad, por ejemplo por eliminación o interrupción del gen.
- 20 Para expresar los genes desregulados de acuerdo con la invención, la secuencia de ADN que codifica la enzima debe ser unidad operablemente a las secuencias regulatorias que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y después, es introducida en ya sea una célula anfitriona procariota o eucariota. Adicionalmente a las secuencias regulatorias transcripcionales, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias regulatorias de traducción y un gen marcador que es adecuado para la selección de células que llevan el vector de expresión.
- 25 Los promotores adecuados para la expresión en un anfitrión procariota pueden ser reprimibles, constitutivos, o inducibles. Los promotores adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_L del bacteriófago lambda, los promotores trp, recA, golpe de calor, lacUV5, tac, lpp-lacλpr, phoA, gal, trc y lacZ de E. coli, los promotores específicos α-amilasa y el σ²⁸ de B. subtilis, los promotores de los bacteriófagos de Bacillus, los promotores de Streptomyces, el promotor del bacteriófago lambda, el promotor bla del gen β-lactamasa pBR322, y el promotor CAT del gen de la cloranfenicol acetiltransferasa. Los promotores de procariotas son revisados por Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277 (1987); Watson et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, 4ta Ed., Benjamin Cummins (1987); Ausubel et al., supra, y Sambrook et al., supra.
- 30 Un promotor preferido para la expresión de la lisina descarboxilasa de E. coli es el promotor sodA de C. glutamicum.
- 35 Los métodos para las proteínas de expresión en anfitriones procariotas son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Williams et al., "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," en DNA CLONING 2: EXPRESSION SYSTEMS, 2da Edición, Glover et al. (edc.), páginas 15-58 (Oxford University Press 1995). También véase, Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995); y Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria," en PROTEIN ENGINEERING: PRINCIPLES AND PRACTICE, Cleland et al. (edc.), páginas 101-127 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).
- 40 Un vector de expresión puede ser introducido en las células anfitrionas bacterianas que usan una variedad de técnicas que incluyen la transformación de cloruro de calcio, electroporación, y similares. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 3ra edición, páginas 1-1 a 1-24 (John Wiley & Sons, Inc. 1995).
- 45 Un aspecto importante de la presente invención implica cultivar o el cultivo de los microorganismos recombinantes descritos en la presente memoria, tal que se produce un compuesto deseado de cadaverina. El término "cultivar" incluye mantener y/o hacer crecer un microorganismo vivo de la presente invención (por ejemplo, mantener y/o hacer crecer un cultivo o cepa). En una realización, un microorganismo de la invención es cultivado en un medio
- 50

líquido. En otra realización, un microorganismo de la invención es cultivado en un medio sólido o medio semisólido) que comprende nutrientes esenciales o benéficos para el mantenimiento y/o crecimiento del microorganismo.

5 Las fuentes de carbono que pueden ser usadas incluyen azúcares y carbohidratos, tales como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos, tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como por ejemplo glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como por ejemplo ácido acético. En una realización preferida, la glucosa, la fructosa o la sacarosa se utilizan como fuentes de carbono. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como una
10 mezcla.

Las fuentes de nitrógeno que pueden ser usadas comprenden compuestos orgánicos que contienen hidrógeno, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, harina de soja y urea o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una
15 mezcla. Las fuentes de fósforo que pueden utilizarse son ácido fosfórico, dihidrógeno de fosfato de potasio o hidrógeno de fosfato de dipotasio o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio del cultivo debe contener adicionalmente sales metálicas, tales como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, las sustancias promotoras de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas también pueden ser usadas adicionalmente a las sustancias establecidas anteriormente.
20 Los precursores adecuados pueden ser añadidos adicionalmente al medio del cultivo. Las sustancias de alimentación establecidas pueden ser añadidas al cultivo como un lote individual o ser alimentadas apropiadamente durante el cultivo.

Preferiblemente, los microorganismos de la presente invención son cultivados bajo pH controlado. El término "pH controlado" incluye cualquier pH que resulta en la producción de la sustancia química fina deseada, por ejemplo, cadaverina. En una realización, los microorganismos son cultivados a un pH de aproximadamente 7. En otra realización, los microorganismos son cultivados en un pH de entre 6,0 y 8,5. El pH deseado puede ser mantenido por cualquier número de métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco, o agua de amoníaco, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, son usados para controlar apropiadamente el pH del cultivo.
25

También preferiblemente, microorganismos de la presente invención son cultivados bajo aireación controlada. El término "aireación controlada" incluye aireación suficiente (por ejemplo, oxígeno) que resulta en la producción de la sustancia química fina deseada, por ejemplo, cadaverina. En una realización, la aireación es controlada mediante la regulación de los niveles de oxígeno en el cultivo, por ejemplo, mediante la regulación de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Preferiblemente, la aireación del cultivo es controlada mediante la agitación del cultivo. La agitación puede ser proporcionada por una hélice o equipo de agitación mecánico similar, al girar o agitar el recipiente de crecimiento (por ejemplo, fermentado) o por varios equipos de bombeo. La aireación puede ser controlada adicionalmente mediante el paso de aire estéril u oxígeno a través del medio (por ejemplo, a través de la mezcla de fermentación). También preferiblemente, los microorganismos de la presente invención son cultivados sin exceso de espuma (por ejemplo, a través de adición o agentes antiespumantes tales como ésteres de poliglicol de ácido graso).
30
35
40

Adicionalmente, los microorganismos de la presente invención pueden ser cultivados bajo temperaturas controladas. El término "temperatura controlada" incluye cualquier temperatura que resulta en la producción de la sustancia química fina deseada, por ejemplo, cadaverina. En una realización, las temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15°C y 95°C. En una realización, las temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15°C y 70°C. Las temperaturas preferidas están entre 20°C y 55°C, más preferiblemente entre 30°C y 45°C o entre 30°C y 50°C.
45

Los microorganismos pueden ser cultivados (por ejemplo, mantenidos y/o cultivados) en medio líquido y preferiblemente son cultivados, ya sea continuamente o intermitentemente, mediante métodos de cultivo convencionales tales como cultivo en pie, cultivo de tubo de ensayo, cultivo con agitación (por ejemplo, cultivo con agitación rotativa, cultivo en matraz de agitación, etc.), cultivo giratorio de aireación, o fermentación. En una realización preferida, los microorganismos son cultivados en matraces de agitación. En una realización más preferida, los microorganismos son cultivados en un fermentador (por ejemplo, un procedimiento de fermentación). Los procedimientos de fermentación de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, lotes, lotes de alimentación y métodos continuos de fermentación. El término "procedimiento de lote" o "fermentación de lote" se refiere a un sistema cerrado en el cual la composición del medio, nutrientes, aditivos suplementarios y similares, es configurada al principio de la fermentación y no es sujeta a alteración durante la fermentación, sin embargo, se pueden hacer intentos para controlar factores tales como concentración de pH y oxígeno para prevenir el exceso de
50
55

acidificación de medios y/o muerte de microorganismos. El término fermentación de "procedimiento de lote de alimentación" o "lote de alimentación" se refiere a fermentación de lote con la excepción que uno o más sustratos o suplementos son añadidos (por ejemplo, añadidos en incrementos o continuamente) a medida que la fermentación avanza. El término "procedimiento continuo" o "fermentación continua" se refiere a un sistema en el cual un medio de fermentación es añadido continuamente a un fermentador y una cantidad igual del medio usado o "condicionado" es simultáneamente eliminada, preferiblemente para la recuperación de la cadaverina deseada. Se han desarrollado una variedad de tales procedimientos y son bien conocidos en la técnica.

La metodología de la presente invención puede incluir adicionalmente un paso de recuperación de cadaverina. El término "recuperación" de cadaverina incluye extracción, cosecha, aislamiento o purificación del compuesto a partir de medios de cultivo. La recuperación del compuesto puede ser ejecutado de acuerdo con cualquier metodología de aislamiento o purificación convencional conocida en la técnica que incluye, pero no está limitada a, tratamiento con una resina convencional (por ejemplo, resina de intercambio de anión o catión, resina de adsorción no iónica, etc.), el tratamiento con un adsorbente convencional (por ejemplo, carbón activado, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, etc.), alteración del pH, extracción con solventes (por ejemplo, con un solvente convencional tal como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares) destilación, diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste del pH, liofilización y similares. Por ejemplo la cadaverina puede ser recuperada del medio de cultivo mediante la eliminación de microorganismos. El caldo de biomasa eliminado es entonces pasado a través o sobre una resina de intercambio de catión para eliminar cationes no deseados y después a través o sobre una resina de intercambio de anión para eliminar aniones inorgánicos no deseados y ácidos orgánicos que tienen acidez mas fuerte que la cadaverina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de poliamidas (por ejemplo nylon®) que comprende un paso como se mencionó anteriormente para la producción de cadaverina. La cadaverina es reaccionada en una manera conocida con ácidos di-, tri- o policarboxílicos para conseguir poliamidas. Preferiblemente la cadaverina es reaccionada con ácidos di carboxílicos que contienen 4 a 10 carbonos tales como ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido sebáico, etc. El ácido y dicarboxílico es preferiblemente un ácido libre.

Ejemplos

1. Clonación del gen de lisina descarboxilasa

Se usaron los cebadores de PCR, WKJ12/WKJ13 y WKJ35/WKJ34, con el ADN cromosómico de E. coli como una plantilla para amplificar los fragmentos de ADN contienen los genes cadA y ldcC, respectivamente. Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados, digeridos con enzimas de restricción, Asp718/NdeI para cadA y XhoI/Spel para ldcC, y ligadas al vector pClik5aMCS digerido con las mismas enzimas de restricción que resultan en pClik5aMCS cadA y pClik5aMCS ldcC, respectivamente.

Para aumentar la expresión del gen ldcC, el promotor C. glutamicum sodA (Psod) fue sustituido en frente del codón de inicio del gen. Los fragmentos de ADN que contienen el promotor sodA y la región de codificación del gen ldcC fueron amplificados para cada ADN cromosómico usando cebadores PCR, WKJ31/OLD47 para Psod y WKJ33/WKJ34 para ldcC, y usados como plantilla para la fusión de PCR con cebadores WKJ31/WKJ34. El fragmento de PCR fusionado fue purificado, digerido con XhoI y Spel, e insertado entre sitios de escisión de XhoI y Spel del vector pClik5aMCS para construir pClik5aMCS Psod-ldcC.

Cebadores de oligonucleótidos usados:

WKJ12 caagctccttcgagctggca

WKJ13 gggtaacgtaaaccagagaa

WKJ31 gagagagactcgagtagctgccaattattccggg

WKJ33 acgaaaggatTTTTaccatgaacatcattgccattatg

WKJ34 ctctctcactagtgctcaatcacatattgccca

WKJ35 gagagagactcgagccggaagcgatggcgcatc

OLD47 gggtaaaaaatccttcgtag

2. Construcción de la cadena de producción de cadaverina

Para construir una cadena de producción de cadaverina, un productor de lisina LU11271, que fue derivado de

cadena ATCC13032 de tipo silvestre de *C. glutamicum* mediante la incorporación de mutación puntual T311I en el gen de aspartoquinasa, la duplicación del gen de diaminopimelato deshidrogenasa e interrupción del gen de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fue transformada con los plásmidos recombinantes que tienen los genes de lisina descarboxilasa.

5 3. Producción de cadaverina en cultivo con matraz de agitación

Los experimentos de matraz de agitación fueron ejecutados en las cadenas recombinantes para ensayar la producción de cadaverina. El mismo medio de cultivo y condiciones como en la producción de lisina se emplearon como se describió en el documento WO2005059139. Se ensayaron en paralelo para el control de la cadena anfitriona y cadena recombinante que tienen pClik5aMCS. Las cadenas fueron precultivadas en agar CM durante la noche a 30°C. Las células cultivadas se recogieron en un microtubo que contiene 1,5 ml de NaCl al 0,9 % y se determinó la densidad celular mediante la absorbancia a 610 nm después del vórtice. Para el cultivo principal se inocularon células suspendidas para llegar a 1,5 del DO inicial en 10 ml del medio de producción contenido en una autoclave de 100 ml de matraz Erlenmeyer que tiene 0,5 g de CaCO₃. El cultivo principal fue ejecutado en un agitador rotatorio (Infors AJ118, Bottmingen, Suiza) con 200 rpm por 48-78 horas a 30°C. Las concentraciones de cadaverina se determinaron usando HPLC (sistema Agilent 1100 Series LC).

En el caldo cultivado con todas las cadenas recombinantes que contienen los genes de lisina descarboxilasa, se acumuló una cantidad significativa de cadaverina. Por el contrario, se observó disminución marcada en la productividad de lisina. Considerando la conversión completa de lisina a cadaverina, se debe producir el mismo número de moléculas de lisina. Sin embargo, la cantidad de cadaverina acumulada fue menor que la de lisina producida por la cadena anfitriona, por otro lado, una cantidad considerable de subproducto, acetilcadaverina, se acumuló de forma concomitante que resultó en la disminución de la producción de azúcar. Adicionalmente al análisis de HPLC, se identificaron la cadaverina y acetilcadaverina mediante el método espectrométrico de masas.

4. Identificación de la enzima que forma acetilcadaverina

Para identificar la proteína de la enzima que forma acetilcadaverina se ejecutó la purificación. La cadena ATCC13032 de *C. glutamicum* o algunos de los derivados cultivados en líquido CM se recogieron, se lavaron y suspendieron en volumen de 0,5 de amortiguador estándar que consiste en 50 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 0,02 % de Brij 35, mezcla de inhibidor de proteína (Complete, Roche) y 20 % de glicerol. Se interrumpió la suspensión celular usando un microfluidizador (M-110EH, Microfluidics Co.) seguida por filtración usando un microfiltrador (MF42, Satorius).

Se purificó la enzima del filtrado mediante la aplicación a unas series de columnas de Q Sepharosa (Amersham Bioscience, 50 x 300 mm, gradiente lineal de 0,0-0,5 de M-NaCl en amortiguador Tris (pH 7,5) de 10 mM, 10 ml/min de caudal), Phenyl Sepharose (Amersham Bioscience, 50 x 300 mm, gradiente lineal de 1,5-0,0 de acetato de amonio M en amortiguador Tris (pH 7,5) de 10 mM, 10 ml/min de caudal), Superdex (Amersham Bioscience, 26 x 600 mm, amortiguador Tris (pH 7,5) de 10 mM, 4 ml/min de caudal), Mono-Q (Amersham Bioscience, 5 x 50 mm, gradiente lineal de 0,0-0,5 M-NaCl en amortiguador Tris (pH 7,5) de 10 mM, 1 ml/min de caudal) and Superose (Amersham Bioscience, 15 x 300 mm, amortiguador Tris (pH 7,5) de 10 mM, 0,3 ml/min de caudal). A lo largo de los pasos de purificación, se monitoreo la actividad enzimática de la acetiltransferasa en los fragmentos y en la presencia de acetilcadaverina en la mezcla de reacciones enzimáticas. Se determinó la actividad enzimática mediante el control del incremento de absorción en 412 nm debido a la generación de TNB (ácido tionitrobenzoico) en un volumen total de 1 ml bajo las siguientes condiciones:

Tris-HCl (pH 7,8) de 10 mM, 0,1 mM de DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)), 0,25 mM de acetil CoA, 5 mM de cadaverina, solución enzimática

Se calcularon actividades específicas usando el coeficiente de extinción molar de 13,6 mM⁻¹ x cm⁻¹ para TNB.

Se cargaron las fracciones con tienen actividad enzimática de la columna de Superosa en gel SDS-PAGE. Se digirieron las manchas de proteína con tripsina (Roche, Mannheim) como fue descrito por Hermann et al. (Electrophoresis (2001), 22, 1712-1723) después de la escisión de gel de Coomassie manchado. (Thermo Electron) después de la separación nano-HPLC de los péptidos (empaquetados LC, columna RP18, longitud 15 cm, i.d. 75 µm), usando el software MASCOT (David et al. (1999) Electrophoresis, 20, 3551-3567). Consecuentemente, se identificó una acetiltransferasa (Número de acceso Genebank: NP_600742) como una enzima potencial que forma acetilcadaverina.

5. Construcción del plásmido e interrupción del gen de acetiltransferasa

Para la interrupción cromosómica del gen que codifica la acetiltransferasa identificada se construyó un plásmido recombinante que permite la manipulación libre del marcador por dos eventos de recombinación homólogos

5 consecutivos. Los fragmentos de ADN que contienen las regiones de la corriente arriba y corriente abajo del gen se amplificaron del AND cromosómico de *C. glutamicum* usando unos conjuntos de cebadores de PCR, WKJ203/WKJ205 para la corriente arriba y WKJ206/WKJ204 para la corriente abajo, y se usaron como plantillas para la fusión de PCR con WKJ203/WKJ204 de cebadores de PCR para hacer el fragmento fundido tal que se elimina la región media. Se purificó el producto de la fusión de PCR, digerido con XhoI y SpeI, e insertado en el vector pClikintsacB, que hace la integración de las secuencias en el locus genómico de *C. glutamicum* (Becker et al (2005), Applied and Environmental Microbiology, 71 (12), p.8587-8596), digerido con las mismas enzimas de restricción.

10 Se usó el plásmido después para interrumpir la región de codificación nativa del gen de acetiltransferasa. Se usó la cadena LU11271 LdcC en la cual el gen LdcC fue integrado en el locus bioD del cromosoma y que produce tanto cadaverina como acetilcadaverina. Dos eventos consecutivos de recombinación, uno en cada una de las regiones de corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, son necesarios para interrumpir la secuencia media del gen. Se confirmaron los mutantes interrumpidos por PCR con cebadores WKJ203/WKJ204 y análisis de hibridación Southern.

15 Cebadores de oligonucleótidos usados:

WKJ203 gctcctcgaggcattgtatactgcgaccact

WKJ204 cggtagctagtagtaggagccaagacatgg

WKJ205 cgattccgtgattaagaagcgcttcaaccagaacatcgac

WKJ206 gtcgatgttctggtgaagcgcttcttaacacggaatcg

20 6. Efecto en la formación de acetilcadaverina y productividad de cadaverina

Para analizar el efecto de la interrupción del gen de acetiltransferasa en la formación de acetilcadaverina y productividad de cadaverina, se ejecutaron experimentos en matraz de agitación en los mutantes interrumpidos. Se usaron el mismo medio de cultivo y condiciones como en la producción de cadaverina (véase abajo). Los mutantes interrumpidos no mostraron acumulación de acetilcadaverina. Esto indica que únicamente la acetiltransferasa identificada es responsable de la formación de acetilcadaverina. Consecuentemente, se mejoró la productividad de cadaverina mediante la interrupción del gen resultante en la eliminación de la formación de acetilcadaverina.

La secuencia de genes y la secuencia de polipéptidos de acetiltransferasa son divulgadas abajo:

Secuencia de genes de acetiltransferasa

ATGAGTCCCACCGTTTTGCCTGCTACACAAGCTGACTTCCCTAAGATCGTTCGATGTT-
 CTGGTTGAAGCATTCGCCAACGATCCAGCATTTTTACGATGGATCCCGCAGCCGGAC-
 CCCGGTTCAGCAAAGCTTCGAGCACTTTTCGAACTGCAGATTGAGAAGCAGTAT-
 GCAGTGGCGGGAAATATTGATGTGCGCGTGATTCTGAGG-
 GAGAAATCGTCGGCGTTCGCGTTATGGGATCGGCCAGATGGTAATCACAGTGCCAAA-
 GATCAAGCAGCGATGCTCCCCCGGCTCGTCTCCATTTTTCGGGATCA-
 AGGCTGCGCAGGTGGCGTGGACGGATTTGAGTTCGGCTCGTTTTCCACCCCAAATT-
 CCCCCATTGGTACCTCTACACCGTGGCAACATCTAGTTCTGCCCCTGGAACGGGTGTT-
 GGCAGTGCCTTCTTAATCACGGAATCGCTCGCGCGGGTGATGAAGCTATCTATTTG-
 GAGGCGACGTCGACTCGTGC GGCTCAACTATATAACCGTCTGGGATTTGTGCCCTT-
 GGGTTATATCCCCTCAGATGATGATGGCACTCCTGAACTGGCGATGTGGAAAC-
 CGCCAGCGATGCCAACTGTTTAA

30 Secuencia de proteína

MSPTVLPATQADFPKIVDVLVEAFANDPAFLRWIPQDPGSAKLRAL-
 FELQIEKQYAVAGNIDVARDSEGEIVGVALWDRPDGNHSAKDQAAMLPRVLSIF-
 GIKAAQVAWTDLSSARFHPKFPHWYLYTVATSSSARGTGVGSALLNHGIARAG-
 DEAIYLEATSTRAAQLYNRLGFVPLGYIPSDDDGTPELAMWKPPAMPTV

Listado de secuencias

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Proceso para la producción de cadaverina

<130> PF57813

<160> 2

5 <170> PatentIn version 3,1

<210> 1

<211> 715

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 1

Met Asn Val Ile Ala Ile Leu Asn His Met Gly Val Tyr Phe Lys Glu
1 5 10 15

Glu Pro Ile Arg Glu Leu His Arg Ala Leu Glu Arg Leu Asn Phe Gln
20 25 30

Ile Val Tyr Pro Asn Asp Arg Asp Asp Leu Leu Lys Leu Ile Glu Asn
35 40 45

Asn Ala Arg Leu Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Lys Tyr Asn Leu
50 55 60

Glu Leu Cys Glu Glu Ile Ser Lys Met Asn Glu Asn Leu Pro Leu Tyr
65 70 75 80

Ala Phe Ala Asn Thr Tyr Ser Thr Leu Asp Val Ser Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Arg Leu Gln Ile Ser Phe Phe Glu Tyr Ala Leu Gly Ala Ala Glu Asp
100 105 110

Ile Ala Asn Lys Ile Lys Gln Thr Thr Asp Glu Tyr Ile Asn Thr Ile
115 120 125

Leu Pro Pro Leu Thr Lys Ala Leu Phe Lys Tyr Val Arg Glu Gly Lys
130 135 140

Tyr Thr Phe Cys Thr Pro Gly His Met Gly Gly Thr Ala Phe Gln Lys
145 150 155 160

Ser Pro Val Gly Ser Leu Phe Tyr Asp Phe Phe Gly Pro Asn Thr Met
165 170 175

ES 2 592 887 T3

Lys Ser Asp Ile Ser Ile Ser Val Ser Glu Leu Gly Ser Leu Leu Asp
 180 185 190
 His Ser Gly Pro His Lys Glu Ala Glu Gln Tyr Ile Ala Arg Val Phe
 195 200 205
 Asn Ala Asp Arg Ser Tyr Met Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ala Asn
 210 215 220
 Lys Ile Val Gly Met Tyr Ser Ala Pro Ala Gly Ser Thr Ile Leu Ile
 225 230 235 240
 Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Leu Thr His Leu Met Met Met Ser Asp
 245 250 255
 Val Thr Pro Ile Tyr Phe Arg Pro Thr Arg Asn Ala Tyr Gly Ile Leu
 260 265 270
 Gly Gly Ile Pro Gln Ser Glu Phe Gln His Ala Thr Ile Ala Lys Arg
 275 280 285
 Val Lys Glu Thr Pro Asn Ala Thr Trp Pro Val His Ala Val Ile Thr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Phe Ile Lys Lys
 305 310 315 320
 Thr Leu Asp Val Lys Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr
 325 330 335
 Thr Asn Phe Ser Pro Ile Tyr Glu Gly Lys Cys Gly Met Ser Gly Gly
 340 345 350
 Arg Val Glu Gly Lys Val Ile Tyr Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Leu
 355 360 365
 Leu Ala Ala Phe Ser Gln Ala Ser Met Ile His Val Lys Gly Asp Val
 370 375 380
 Asn Glu Glu Thr Phe Asn Glu Ala Tyr Met Met His Thr Thr Thr Ser
 385 390 395 400
 Pro His Tyr Gly Ile Val Ala Ser Thr Glu Thr Ala Ala Ala Met Met
 405 410 415
 Lys Gly Asn Ala Gly Lys Arg Leu Ile Asn Gly Ser Ile Glu Arg Ala
 420 425 430

ES 2 592 887 T3

Ile Lys Phe Arg Lys Glu Ile Lys Arg Leu Arg Thr Glu Ser Asp Gly
435 440 445

Trp Phe Phe Asp Val Trp Gln Pro Asp His Ile Asp Thr Thr Glu Cys
450 455 460

Trp Pro Leu Arg Ser Asp Ser Thr Trp His Gly Phe Lys Asn Ile Asp
465 470 475 480

Asn Glu His Met Tyr Leu Asp Pro Ile Lys Val Thr Leu Leu Thr Pro
485 490 495

Gly Met Glu Lys Asp Gly Thr Met Ser Asp Phe Gly Ile Pro Ala Ser
500 505 510

Ile Val Ala Lys Tyr Leu Asp Glu His Gly Ile Val Val Glu Lys Thr
515 520 525

Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr
530 535 540

Lys Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ala Leu Thr Asp Phe Lys Arg Ala Phe
545 550 555 560

Asp Leu Asn Leu Arg Val Lys Asn Met Leu Pro Ser Leu Tyr Arg Glu
565 570 575

Asp Pro Glu Phe Tyr Glu Asn Met Arg Ile Gln Glu Leu Ala Gln Asn
580 585 590

Ile His Lys Leu Ile Val His His Asn Leu Pro Asp Leu Met Tyr Arg
595 600 605

Ala Phe Glu Val Leu Pro Thr Met Val Met Thr Pro Tyr Ala Ala Phe
610 615 620

Gln Lys Glu Leu His Gly Met Thr Glu Glu Val Tyr Leu Asp Glu Met
625 630 635 640

Val Gly Arg Ile Asn Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val
645 650 655

Pro Leu Val Met Pro Gly Glu Met Ile Thr Glu Glu Ser Arg Pro Val
660 665 670

Leu Glu Phe Leu Gln Met Leu Cys Glu Ile Gly Ala His Tyr Pro Gly
675 680 685

ES 2 592 887 T3

Phe Glu Thr Asp Ile His Gly Ala Tyr Arg Gln Ala Asp Gly Arg Tyr
 690 695 700

Thr Val Lys Val Leu Lys Glu Glu Ser Lys Lys
 705 710 715

<210> 2

<211> 713

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 2

Met Asn Ile Ile Ala Ile Met Gly Pro His Gly Val Phe Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

Glu Pro Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ala Leu Val Ala Gln Gly Phe Gln
 20 25 30

Ile Ile Trp Pro Gln Asn Ser Val Asp Leu Leu Lys Phe Ile Glu His
 35 40 45

Asn Pro Arg Ile Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Glu Tyr Ser Leu
 50 55 60

Asp Leu Cys Ser Asp Ile Asn Gln Leu Asn Glu Tyr Leu Pro Leu Tyr
 65 70 75 80

Ala Phe Ile Asn Thr His Ser Thr Met Asp Val Ser Val Gln Asp Met
 85 90 95

Arg Met Ala Leu Trp Phe Phe Glu Tyr Ala Leu Gly Gln Ala Glu Asp
 100 105 110

Ile Ala Ile Arg Met Arg Gln Tyr Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Asn Ile
 115 120 125

Thr Pro Pro Phe Thr Lys Ala Leu Phe Thr Tyr Val Lys Glu Arg Lys
 130 135 140

Tyr Thr Phe Cys Thr Pro Gly His Met Gly Gly Thr Ala Tyr Gln Lys
 145 150 155 160

Ser Pro Val Gly Cys Leu Phe Tyr Asp Phe Phe Gly Gly Asn Thr Leu
 165 170 175

Lys Ala Asp Val Ser Ile Ser Val Thr Glu Leu Gly Ser Leu Leu Asp
 180 185 190

ES 2 592 887 T3

His Thr Gly Pro His Leu Glu Ala Glu Glu Tyr Ile Ala Arg Thr Phe
 195 200 205

Gly Ala Glu Gln Ser Tyr Ile Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn
 210 215 220

Lys Ile Val Gly Met Tyr Ala Ala Pro Ser Gly Ser Thr Leu Leu Ile
 225 230 235 240

Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Leu Ala His Leu Leu Met Met Asn Asp
 245 250 255

Val Val Pro Val Trp Leu Lys Pro Thr Arg Asn Ala Leu Gly Ile Leu
 260 265 270

Gly Gly Ile Pro Arg Arg Glu Phe Thr Arg Asp Ser Ile Glu Glu Lys
 275 280 285

Val Ala Ala Thr Thr Gln Ala Gln Trp Pro Val His Ala Val Ile Thr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Trp Ile Lys Gln
 305 310 315 320

Thr Leu Asp Val Pro Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr
 325 330 335

Thr His Phe His Pro Ile Tyr Gln Gly Lys Ser Gly Met Ser Gly Glu
 340 345 350

Arg Val Ala Gly Lys Val Ile Phe Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Met
 355 360 365

Leu Ala Ala Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ile His Ile Lys Gly Glu Tyr
 370 375 380

Asp Glu Glu Ala Phe Asn Glu Ala Phe Met Met His Thr Thr Thr Ser
 385 390 395 400

Pro Ser Tyr Pro Ile Val Ala Ser Val Glu Thr Ala Ala Ala Met Leu
 405 410 415

Arg Gly Asn Pro Gly Lys Arg Leu Ile Asn Arg Ser Val Glu Arg Ala
 420 425 430

Leu His Phe Arg Lys Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu Glu Ser Asp Gly

ES 2 592 887 T3

	435					440					445				
Trp	Phe	Phe	Asp	Ile	Trp	Gln	Pro	Pro	Gln	Val	Asp	Glu	Ala	Glu	Cys
	450					455					460				
Trp	Pro	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Gln	Trp	His	Gly	Phe	Asn	Asp	Ala	Asp
465					470					475					480
Ala	Asp	His	Met	Phe	Leu	Asp	Pro	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Leu	Thr	Pro
				485					490						495
Gly	Met	Asp	Glu	Gln	Gly	Asn	Met	Ser	Glu	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	Ala
			500					505					510		
Leu	Val	Ala	Lys	Phe	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Thr
		515					520						525		
Gly	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr
	530					535					540				
Lys	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Thr	Glu	Phe	Lys	Arg	Ser	Tyr
545					550					555					560
Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Ile	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Asp	Leu	Tyr	Ala	Glu
				565					570						575
Asp	Pro	Asp	Phe	Tyr	Arg	Asn	Met	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly
			580					585						590	
Ile	His	Lys	Leu	Ile	Arg	Lys	His	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Met	Leu	Arg
		595					600						605		
Ala	Phe	Asp	Thr	Leu	Pro	Glu	Met	Ile	Met	Thr	Pro	His	Gln	Ala	Trp
	610					615						620			
Gln	Arg	Gln	Ile	Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Thr	Ile	Ala	Leu	Glu	Gln	Leu
625					630					635					640
Val	Gly	Arg	Val	Ser	Ala	Asn	Met	Ile	Leu	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gly	Val
				645					650					655	
Pro	Leu	Leu	Met	Pro	Gly	Glu	Met	Leu	Thr	Lys	Glu	Ser	Arg	Thr	Val
			660					665					670		
Leu	Asp	Phe	Leu	Leu	Met	Leu	Cys	Ser	Val	Gly	Gln	His	Tyr	Pro	Gly
		675					680					685			

ES 2 592 887 T3

Phe Glu Thr Asp Ile His Gly Ala Lys Gln Asp Glu Asp Gly Val Tyr
690 695 700

Arg Val Arg Val Leu Lys Met Ala Gly
705 710

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de cadaverina mediante la construcción de un microorganismo recombinante que tiene un gen de descarboxilasas de lisinas sobre reguladas, una actividad de diamina acetiltransferasa subregulada y al menos un gen desregulado seleccionado del grupo (i) que consiste en aspartoquinasa
5 sobre regulada, aspartato semialdehído deshidrogenasa sobre regulada, dihidrodipicolinato sintasa sobre regulada, dihidrodipicolinato reductasa sobre regulada, tetrahidrodipicolinato succinilasa sobre regulada, succinil-amino-cetopimelato transaminasa sobre regulada, succinil-diamino-pimelato desuccinilasa sobre regulada, diaminopimelato epimerasa sobre regulada, diaminopimelato deshidrogenasa sobre regulada, arginil-ARNt sintetasa sobre regulada, diaminopimelato descarboxilasa sobre regulada, piruvato carboxilasa sobre regulada,
10 fosfoenolpiruvato carboxilasa sobre regulada, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobre regulada, transcetolasa sobre regulada, transaldolasa sobre regulada, 6-fosfogluconolactonasa sobre regulada, fructosa 1,6-bifosfatasa sobre regulada, homoserina deshidrogenasa subregulada, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa subregulada, succinil-CoA sintetasa subregulada, metilmalonil-CoA mutasa subregulada, a condición de que si la aspartoquinasa es desregulada como gen (i) al menos un segundo gen (i) diferente de aspartoquinasa debe ser desregulado, y
15 cultivar dicho microorganismo.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo pertenece al género *Corynebacterium*.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la lisina descarboxilasa sobre regulada es heteróloga para aquel microorganismo.
20
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante tiene una lisina descarboxilasa de *Escherichia*.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la lisina descarboxilasa tiene la secuencia de polipéptido de SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia de polipéptido con una actividad de lisina descarboxilasa que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 1 o 2.
25
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen desregulado seleccionado del grupo (i) de la reivindicación 1 es una diaminopimelato deshidrogenasa sobre regulada.
8. Procedimiento de producción de una poliamida que comprende la producción de cadaverina de acuerdo con la reivindicación 1 y la reacción de aquella cadaverina con un ácido dicarboxílico.
9. Un microorganismo recombinante que tiene un gen de lisina descarboxilasa sobre regulada, una actividad de diamina acetiltransferasa y al menos un gen desregulado seleccionado del grupo (i) que consiste en aspartoquinasa subregulada, aspartato semialdehído deshidrogenasa sobre regulada, dihidrodipicolinato sintasa sobre regulada, sobre regulada dihidrodipicolinato reductasa, tetrahidrodipicolinato succinilasa sobre regulada, succinilamino-cetopimelato transaminasa sobre regulada, succinil-diamino-pimelato desuccinilasa sobre regulada,
35 diaminopimelato epimerasa sobre regulada, diaminopimelato deshidrogenasa sobre regulada, arginil-ARNt sintetasa sobre regulada, diaminopimelato descarboxilasa sobre regulada, piruvato carboxilasa sobre regulada, fosfoenolpiruvato carboxilasa sobre regulada, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobre regulada, transcetolasa sobre regulada, transaldolasa sobre regulada, 6-fosfogluconolactonasa sobre regulada, fructosa 1,6-bifosfatasa sobre regulada, homoserina deshidrogenasa subregulada, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa subregulada, succinil-CoA sintetasa subregulada, metilmalonil-CoA mutasa subregulada, a condición de que si la aspartoquinasa es desregulada como gen (i) al menos un segundo gen (i) diferente de aspartoquinasa debe ser desregulado.
40
10. Un microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la lisina descarboxilasa es de *Escherichia*.
11. Un microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el gen desregulado
45 seleccionado del grupo (i) de la reivindicación 9 es un diaminopimelato deshidrogenasa sobre regulada.