

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 764**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2013 PCT/KR2013/000263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13105827**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2013 E 13736043 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2803721**

54 Título: **Microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada de producción de putrescina y un procedimiento para producir putrescina utilizando el mismo**

30 Prioridad:

11.01.2012 KR 20120003634

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

21.02.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, SU JIN;
CHOI, HYANG;
KANG, MIN SUN;
JHON, SUNG HOO;
LEE, KYOUNG MIN;
UM, HYE WON y
YANG, YOUNG LYEOL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 764 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 recombinante que tiene una capacidad mejorada de producción de putrescina y un procedimiento para producir putrescina utilizando el mismo

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a microorganismos recombinantes que tienen un aumento de la productividad de putrescina modificando el mismo para debilitar la capacidad de descomponer la putrescina y un procedimiento de producción de putrescina utilizando los mismos.

Técnica antecedente

- 10 La putrescina (o 1,4-butanodiamina) es un tipo de poliamina, tal como la espermidina y espermina, y se encuentra en bacterias gram-negativas y hongos. Como la putrescina está presente en un amplio intervalo de concentraciones en distintas especies, se espera que tenga un papel importante en el metabolismo de los microorganismos. La putrescina se produce principalmente por síntesis química mediante acrilonitrilo y succinonitrilo a partir del propileno. La síntesis química utiliza las sustancias derivadas de petroquímicos como materiales de partida y utiliza químicos tóxicos, y por lo tanto no es bueno medioambientalmente y tiene un problema de agotamiento de aceite. Con el fin
15 de resolver estos problemas, se han hecho muchas investigaciones para desarrollar un procedimiento de biosíntesis de putrescina utilizando microorganismos que sean mejores ambientalmente y reduzcan el consumo de energía. De acuerdo con el conocimiento actual, la putrescina se puede biosintetizar mediante dos rutas a partir de microorganismos. En una ruta, se produce ornitina a partir de glutamato y la ornitina se descarboxila para sintetizar putrescina. En la otra ruta, la arginina se sintetiza a partir de ornitina, se produce agmatina a partir de arginina y entonces se sintetiza la putrescina a partir de agmatina. Además, hay otros procedimientos para sintetizar putrescina en las que las enzimas conocidas implicadas en las rutas sintéticas de putrescina se transforman en un microorganismo diana. Por ejemplo, el documento WO09/125924 desvela un procedimiento de producción de putrescina con alto rendimiento inactivando la ruta implicada en la descomposición y utilización de la putrescina presente en *E. coli*, inactivando la ruta en la que la ornitina, un precursor de putrescina, se convierte en arginina, y aumentando la ruta biosintética de ornitina. Un artículo publicado en 2009 desvela un procedimiento de producción de putrescina a alta concentración introduciendo la proteína que convierte ornitina en putrescina en cepas de *Corynebacterium* que no son capaces de producir putrescina y aumentando la actividad de las mismas (Qian y col.,
20 Biotechnol Bioeng, 104:4, 651-662, 2009).

- 30 La putrescina producida se puede descomponer por los microorganismos o utilizarse en otro metabolismo. Por ejemplo, la espermidina sintasa (EC: 2.5.1.16, speE) que se expresa en *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum* sintetiza espermidina a partir de la putrescina, y acetiltransferasa (N-acetiltransferasa) que se expresa en *Candida boidinii* acetila la putrescina a N-acetilputrescina. Se sabe que la putrescina se puede producir a altas concentraciones en la cepa de *E. coli* que se modifica para que tenga debilitada la actividad de espermidina acetiltransferasa (EC: 2.3.1.57. speG) que presenta una alta homología con la acetiltransferasa anterior (Patente Coreana N° 1188432).
35

- Aunque la enzima que acetila la putrescina a N-acetilputrescina en el microorganismo del género *Corynebacterium* no se ha identificado todavía, se sabe que cuando se elimina el gen conocido que codifica NCgl1469, que es una histona acetiltransferasa HPA2 y acetiltransferasa relacionada, la N-acetilación de cadaverina, un tipo de diamina, está específicamente reducida (Kind y col., Appl Environ Microbiol, 76:15, 5175-5180, 2010). Sin embargo, se
40 informó de que la NCgl1469 no utiliza putrescina y 1,3-diaminopropano como sustrato. En otras palabras, se presumía que la NCgl1469 tenía una actividad específica solo sobre la cadaverina de entre todas las diaminas diferentes. Por otra parte, se sabe que la NCgl1469 presenta la actividad de acetil glutamato sintasa y ornitina acetiltransferasa en *Corynebacterium glutamicum* para producir ornitina y arginina a altas concentraciones, y cuando la NCgl1469 se sobre-expresa en *Corynebacterium glutamicum*, se puede producir ornitina y arginina con alto
45 rendimiento (Patente Coreana N° 1174267). De igual manera, la actividad de NCgl1469 es específica para el glutamato y cadaverina, y se conoce el efecto de la NCgl1469 en el aumento de productividad de ornitina. Por ejemplo, el documento WO2007/113127 A1 desvela un procedimiento para la producción de cadaverina utilizando un microorganismo recombinante que tiene una lisina descarboxilasa no regulada y al menos un gen no regulado seleccionado de entre los genes que son esenciales en la ruta biosintética de la lisina. Sin embargo no se ha
50 identificado aún si la NCgl1469 está asociada con la producción de putrescina.

Divulgación

Problemas técnicos

- Los presentes inventores identificaron que la putrescina se puede producir con alto rendimiento debilitando la actividad del NCgl1469 en un microorganismo del género *Corynebacterium* que se ha modificado para producir
55 putrescina, completando de esta manera la presente invención.

Solución técnica

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una capacidad aumentada para producir putrescina por debilitamiento de la actividad de NCgl1469 en comparación con la actividad endógena del mismo.

- 5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción de putrescina con alto rendimiento utilizando el microorganismo del género *Corynebacterium*.

Efecto ventajoso

- 10 En la presente invención, se prepara una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con capacidad aumentada para producir putrescina debilitando la actividad de NCgl1469 en comparación con la actividad endógena del mismo, y se puede producir putrescina que se utiliza ampliamente en la industria a altas concentraciones utilizando el mismo.

Descripción de las figuras

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que demuestra la ruta biosintética de putrescina en *Corynebacterium glutamicum* y genes relacionados.

Mejor modo

- 15 Con el fin de conseguir los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo modificado del género *Corynebacterium* que tiene una capacidad aumentada para producir putrescina, en el que la actividad de la proteína NCgl1469 que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 está debilitada o eliminada en comparación con la actividad endógena del mismo, y en el que la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) está introducida adicionalmente en este.

- 20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “proteína NCgl1469” se refiere a la proteína definida como histona acetiltransferasa HPA2 o acetiltransferasa relacionada en *Corynebacterium glutamicum*, que se ha informado, sin la identificación de la función específica, a acetilato glutamato y cadaverina (Patente Coreana N° 10-1174267, Hwang y col., J Ind Microbiol Biotechnol, 37:11, 1131-1136, 2010, Kind y col., Appl Environ Microbiol, 76:15, 5175-5180, 2010).

- 25 La proteína NCgl1469 de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20. Sin embargo, no se limita a estas ya que puede haber una diferencia en la secuencia de aminoácidos de la proteína que presenta la actividad anterior dependiendo de la especie o cepa microbiana. En otras palabras, puede ser una proteína o variante artificial con una secuencia de aminoácidos que comprende sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o más localizaciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, a condición de que ayude a aumentar la productividad de putrescina debilitando la actividad de la proteína que se propone en la presente invención. En el presente documento, “varias” pueden ser diferentes, dependiendo de la localización o tipo en la estructura tridimensional de los restos de aminoácidos de la proteína, pero significa específicamente 2 a 20, preferentemente 2 a 10, y más preferentemente 2 a 5. Además, la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión del aminoácido incluye las producidas por la mutación natural o variante artificial, se basa en la diferencia en el individuo o especie del microorganismo.

- 40 La proteína NCgl1469 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 y la proteína NCgl1469 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, que tiene una homología del 99 % con la secuencia de aminoácidos anterior, tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20.

- 45 El polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la presente invención puede comprender la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína, a condición de que tenga una actividad similar a la proteínas NCgl1469 de la presente invención, con un 80 % o más, preferentemente 90 % o más, más preferentemente un 95 % o más, y particularmente preferentemente un 97 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, y más preferentemente con la secuencia de polinucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, respectivamente.

El término “homología” se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos y se puede determinar por el procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, utilizando BLAST 2.0 para computar los parámetros como una puntuación, identidad y similitud.

- 50 Además, la secuencia de polinucleótido de la presente invención se puede hibridar con el polinucleótido de las SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19 o la sonda preparada a partir de las mismas en “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones que permiten la hibridación específica entre el polinucleótido y que se describe específicamente, por ejemplo, en Molecular Cloning (A Laboratory Manual, J. Sambrook y col., Editores, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) o Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y

col., Editores, John Wiley & Sons, Inc., New York), que describe, por ejemplo, la hibridación en el tampón de hibridación de 65 °C (3,5 x SSC, un 0,02 % de Ficoll, un 0,02 % de polivinilpirrolidona, un 0,02 % de albúmina sérica bovina, 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7), un 0,5 % de SDS, 2 mM de EDTA). El SSC es 0,15 M de cloruro sódico /0,15 M de citrato sódico de pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se suministra el ADN se limpia con 2 x SSC a temperatura ambiente y luego se limpia con 0,1 a 0,5 x SSC/0,1 x SDS a una temperatura de 68 °C.

En la presente invención, el debilitamiento de la actividad de NCgl1469 significa que la actividad de NCgl1469 está reducida o eliminada en comparación con la actividad endógena de esta. La actividad de la proteína NCgl1469 se puede debilitar por 1) una eliminación parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína, 2) una reducción de la expresión del polinucleótido modificando una secuencia reguladora de la expresión, 3) una modificación de la secuencia de polinucleótido en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína o 4) una combinación de los mismos.

En el procedimiento anterior, se puede llevar a cabo una eliminación completa o parcial de un polinucleótido que codifica la proteína sustituyendo el polinucleótido que codifica una proteína diana endógena en el cromosoma por un polinucleótido con una eliminación parcial de una secuencia de nucleótidos o por un gen marcador, con un vector para la inserción genética en el cromosoma. La longitud de la eliminación "parcial" es diferente dependiendo del tipo de polinucleótido, pero específicamente es de 2 pb a 300 pb, preferentemente de 2 pb a 100 pb, y más preferentemente de 2 pb a 5 pb.

También, la reducción de la expresión del polinucleótido modificando una secuencia reguladora de la expresión se puede llevar a cabo induciendo mutaciones en la secuencia reguladora de la expresión mediante la eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de la secuencia de nucleótidos o una combinación de las mismas para debilitar adicionalmente la actividad de la secuencia reguladora de la expresión, o sustituyendo la secuencia reguladora de la expresión con la secuencia que tiene una actividad más débil. La secuencia reguladora de la expresión incluye una secuencia promotora codificante, una secuencia operadora, un sitio de unión al ribosoma y la secuencia que controla la terminación de la transcripción y traducción.

Además, la modificación de la secuencia de polinucleótido en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína se puede llevar a cabo induciendo mutaciones en la secuencia mediante la eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de la secuencia de nucleótidos o una combinación de los mismos para debilitar adicionalmente la actividad de la secuencia, o sustituyendo la secuencia de polinucleótido con la secuencia modificada para que tenga una actividad menor de la proteína.

Entre tanto, se puede modificar adicionalmente un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad aumentada para producir putrescina de la presente invención para debilitar la actividad de la ornitina carbamoil transferasa (ArgF) implicada en la síntesis de arginina a partir de ornitina y la actividad de la proteína (NCgl1221) implicada en la liberación de glutamato en comparación con la actividad endógena de la misma por acumulación de ornitina, un precursor de la putrescina, en la célula.

También, el microorganismo del género *Corynebacterium* se puede modificar adicionalmente para aumentar la actividad de la acetil glutamato sintasa para convertir el glutamato en acetil glutamato, la actividad de la ornitina acetil transferasa (ArgJ) para convertir la acetil ornitina en ornitina, la actividad de la acetil glutamato cinasa (ArgB) para convertir acetil glutamato en acetil glutamil fosfato, la actividad de acetil gamma glutamil fosfato reductasa (ArgC) para convertir el acetil glutamil fosfato en acetil glutamato semialdehído, y la actividad de acetil ornitina amino transferasa (ArgD) para convertir el acetil glutamato semialdehído en acetil ornitina.

Además, la cepa de *Corynebacterium*, DAB12- a NCgl1469, con una capacidad aumentada para producir putrescina se comparó con las actividades endógenas de la misma, aumentando de esta manera la ruta biosintética de ornitina, un precursor de la putrescina.

En este caso, las ArgF, NCgl1221, ODC, ArgC, ArgJ, ArgB y ArgD pueden tener, pero no se limitan específicamente a, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, respectivamente, o las secuencias de aminoácidos con un 80 % o más, preferentemente un 90 % o más, más preferentemente un 95 % o más, y más preferentemente un 97 % o más de homología con la misma.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ornitina descarboxilasa (ODC)" se refiere a una enzima que produce putrescina utilizando ornitina, y la ODC necesita fosfato de piridoxal (piridoxal 5'-fosfato, PLP) como coenzima, está presente en la mayoría de bacterias Gram-negativas y puede estar presente en algunas de las bacterias intestinales tales como Lactobacilos de bacterias Gram- positivas. La *E. coli* tiene dos tipos de genes que codifican ODC, una de las cuales, speC, se expresa continuamente a cierta concentración, y la otra, speF, se induce su expresión en condiciones específicas (la presencia de ornitina mayor de ciertas concentraciones y pH bajo). Dependiendo de las especies, algunas especies, como la *E. coli*, tienen dos tipos de ODC, y otras tienen solo un tipo. Las especies tales como *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter* sp., *Salmonella* sp., y *Enterobacter* sp. tienen dos tipos de ODC (speC, speF), y las cepas de *Yersinia* sp., *Klebsiella* sp., *Erwinia* sp., tienen un tipo de ODC (speC). En el caso de lactobacilos, la ODC se expresa en un tipo de gen (speF), y se sabe que es inducido para expresarse en condiciones de pH bajo o abundante en ornitina e histidina.

La actividad de la ODC se puede introducir en el microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* de la presente invención utilizando genes que codifican la ODC derivada de distintas especies.

El polinucleótido que codifica ODC puede incluir, pero no se limita a, el polinucleótido que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 de la secuencia de aminoácidos con un 70 % o más, preferentemente un 80 % o más preferentemente un 90 % de homología con la misma.

Además, la introducción de la actividad de ornitina descarboxilasa (ODC) en los microorganismos se puede llevar a cabo por distintos procedimientos bien conocidos en la técnica, y, por ejemplo, se pueden utilizar el procedimiento para insertar el polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifican la ODC en el cromosoma, el procedimiento para introducir el polinucleótido en los microorganismos por la introducción del sistema de vector, el procedimiento para insertar el polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la ODC y un promotor con actividad mejorada o la modificación de la región superior de la secuencia de nucleótido que codifica la ODC y el procedimiento para insertar el polinucleótido que introduce la mutación de la secuencia de nucleótidos que codifica la ODC, y más preferentemente, si se introduce la secuencia de nucleótidos que codifican la ODC, se puede utilizar un promotor CJ7 conocido como promotor para controlar la expresión del mismo.

Además, el aumento de la actividad de ArgC, ArgJ, ArgB y ArgD se puede conseguir por 1) un aumento del número de copias del polinucleótido que codifica la enzima, 2) una modificación de la secuencia reguladora de la expresión para aumentar la expresión del polinucleótido, 3) una modificación de la secuencia del polinucleótido para aumentar la actividad de la enzima o 4) una combinación de los mismos.

En el procedimiento 1), el aumento del número de copias del polinucleótido que codifica la enzima se puede conseguir uniendo operativamente el polinucleótido al vector o insertando el mismo en el cromosoma de la célula huésped. Más específicamente, el número de copias de polinucleótido de la célula huésped se puede aumentar introduciendo un vector que sea capaz de replicarse y funcionar independientemente, en el que el polinucleótido que codifica la enzima de la presente invención está unido operativamente, o introduciendo el vector capaz de insertar el polinucleótido en el cromosoma de la célula huésped, en el que el polinucleótido está unido operativamente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a la construcción de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que codifica la proteína diana unido operativamente a la secuencia reguladora apropiada para expresar la proteína diana en el huésped apropiado. La secuencia reguladora incluye el promotor que puede iniciar la transcripción, cualquiera secuencia operadora para controlar la transcripción, la secuencia que codifica el sitio de unión al ribosoma del ARNm apropiado, y la secuencia de control de la terminación de la transcripción y la traducción. El vector se puede transfectar en un huésped adecuado, y entonces se puede replicar o puede funcionar independientemente del genoma del huésped, y se puede integrar en el propio genoma.

En la presente invención, cualquier vector que se pueda replicar en el huésped puede utilizarse sin ninguna limitación específica a condición de que se conozca en la técnica. Ejemplos de los vectores utilizados comúnmente son plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos en su estado natural o estado recombinante. Por ejemplo, se pueden utilizar pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, y Charon21A como vector fago o cósmido, y se pueden utilizar el sistema pBR, el sistema pUC, el sistema pBluescriptII, el sistema pGEM, el sistema pTZ, el sistema pCL y el sistema pET como un vector plásmido. El vector que se puede utilizar en la presente invención no está particularmente limitado y se pueden utilizar los vectores de expresión conocidos. Preferentemente, se pueden utilizar los vectores pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC. Más preferentemente, se pueden utilizar los vectores pACYC177, pCL, pCC1BAC.

Además, el vector que puede insertar el polinucleótido que codifica la proteína diana que se transforma en una célula huésped puede ser preferentemente, por ejemplo, un vector lanzadera (Publicación de Patente Coreana N° 1992-0000933) que es capaz de replicarse por sí mismo tanto en bacterias *E. coli* como en Corineformes, pero no se limita a estos.

Además, el polinucleótido que codifica la proteína diana en el cromosoma se puede sustituir por un nuevo polinucleótido utilizando un vector para la inserción genética cromosómica. La inserción del polinucleótido en el cromosoma se puede conseguir por cualquier procedimiento o conocido en la técnica, por ejemplo, por recombinación homóloga. Como el vector de la presente invención se puede insertar en el cromosoma induciendo una recombinación homóloga, el marcador genético se puede incluir adicionalmente para confirmar una inserción genética satisfactoria en el cromosoma. Un marcador genético es para explorar las células que están transformadas con el vector, en otras palabras, para determinar si el polinucleótido diana está insertado. Se pueden utilizar marcadores que pueden proporcionar fenotipos seleccionables tales como resistencia a fármacos, auxotrofia, resistencia a agentes tóxicos o expresión de proteínas de superficie. En un ambiente tratado con un agente de selección, solo las células que expresan el marcador genético pueden sobrevivir o aparecerán células con un fenotipo diferente, y por lo tanto se pueden seleccionar las células transformadas satisfactoriamente mediante este procedimiento.

Como se utiliza en el presente documento, el término "transfección" se refiere a la introducción del vector que comprende un polinucleótido que codifica la proteína diana en la célula huésped de manera que se pueda expresar

la proteína codificada por el polinucleótido. El polinucleótido transfectado incluye todos los polinucleótidos que codifican proteínas diana que se pueden expresar en la célula huésped independientemente de la localización, sea insertados en el cromosoma de la célula huésped o localizados fuera del cromosoma. Además, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN que codifican la proteína diana. El polinucleótido se puede introducir de cualquier forma a condición de que se pueda introducir en la célula huésped y se exprese. Por ejemplo, el polinucleótido se puede introducir en una célula huésped en forma de casete de expresión que es una construcción genética que comprende todos los elementos necesarios para la auto-expresión. El casete de expresión incluye normalmente un promotor unido operativamente al polinucleótido, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión capaz de auto-replicación. Además, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped en su forma propia y unirse operativamente a las secuencias necesarias para la expresión en la célula huésped.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a la conexión funcional entre la secuencia promotora que inicia o media la transcripción de polinucleótido que codifica la proteína diana y el polinucleótido.

Además, el procedimiento 2) de modificación de la secuencia reguladora de la expresión para aumentar la expresión del polinucleótido de la presente invención se puede llevar a cabo induciendo la mutación de la secuencia mediante la eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de la secuencia de nucleótidos o una combinación de las mismas, o por la sustitución de la secuencia de nucleótidos con actividad aumentada. La secuencia reguladora de la expresión incluye el promotor, la secuencia operadora, la secuencia codificante de sitios de unión ribosómicos, y secuencia para controlar la terminación de transcripción y traducción.

Se puede unir un fuerte promotor heterólogo a la unidad de expresión superior del polinucleótido en vez de los promotores originales y ejemplos de un promotor fuerte son el promotor pcj7, promotor lysCP1, promotor EF-Tu, promotor groEL, promotor aceA o aceB, etc., y más preferentemente el promotor lysCP1 o promotor pcj7 derivado de *Corynebacterium* que se une operativamente para aumentar la expresión de polinucleótido que codifica la enzima. En el presente documento el promotor lysCP1, es un promotor mejorado mediante la sustitución de la secuencia de nucleótidos de la región promotora del polinucleótido que codifica la aspartato cinasa y la aspartato semialdehído deshidrogenasa, es lo suficientemente fuerte para aumentar la actividad de la enzima correspondiente 5 veces en comparación con el tipo silvestre mediante el aumento de expresión del gen de aspartato cinasas (Publicación de Patente internacional N° 2009-906689). Además, se identificó que el promotor pcj7 se expresaba en *Corynebacterium ammoniagenes* y *Escherichia* y que tenía una fuerte actividad promotora, al buscar el área con la secuencia promotora fuerte en *Corynebacterium ammoniagenes*, y se puede expresar en *Corynebacterium glutamicum* así como con alta intensidad (Patente Coreana N° 0620092).

Además, el procedimiento 3) de modificación de la secuencia de polinucleótido en el cromosoma que codifica la enzima de la presente invención puede llevarse a cabo induciendo la mutación de la secuencia mediante eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de secuencia de nucleótidos o una combinación de las mismas para aumentar la actividad de la secuencia, o por sustitución de la secuencia de nucleótidos con actividad aumentada.

El microorganismo de la presente invención, que es un microorganismo con capacidad aumentada para producir putrescina, incluye un microorganismo procarionta, en el que se expresa la proteína con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, y puede ser por ejemplo, el microorganismo de *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Yersinia* sp., *Klebsiella* sp., *Erwinia* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Selenomonas* sp., y *Vibrio* sp.

El microorganismo de la presente invención es preferentemente el microorganismo del género *Corynebacterium* y puede ser más preferentemente el *Corynebacterium glutamicum*.

En un ejemplo de la presente invención, el microorganismo del género *Corynebacterium* de número de acceso KCCM111138P (Publicación de Patente Coreana N° 2012-0064046), que tiene la capacidad de producir putrescina de una alta concentración mediante la ruta de generación de putrescina aumentada, que estaba mutada. Específicamente la cepa productora de putrescina KCCM111138P es la cepa de sobre-producción de putrescina, en la que el gen que codifica la ornitina carbamoil transferasa (ArgF) para acumular ornitina y el gen que codifica el exportador de glutamato (NCgl1221) para aumentar el glutamato intracelular se habían eliminado en las cepas ATCC13032, el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (speC) se introdujo, y el nivel de expresión de los genes de biosíntesis de ornitina (argCJBD) está aumentado.

En otro ejemplo de la presente invención, el *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 basado en la cepa DAB12-a productora de putrescina basada en el mismo genotipo que KCCM11138P se mutó. Específicamente, la cepa DAB12-a que comprende la cepa ATCC13869 obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en la que el gen que codifica la carbamoil transferasa (ArgF) y el gen que codifica la proteína NCgl1221 para liberar glutamato se han eliminado, el gen (speC) que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC) derivado de *E. coli* se introdujo, y el promotor del operón genético de biosíntesis de ornitina (argCJBD) se sustituyó con el promotor mejorado.

En un ejemplo de la presente invención, la cepa de *Corynebacterium glutamicum* con una capacidad aumentada para producir putrescina se preparó debilitando o eliminando la actividad de la proteína NCgl1469 expuesta en la SEQ ID NO: 18 en el microorganismo de *Corynebacterium glutamicum* KKCM1138P (Publicación de Patente Coreana N° 2012-0064046), con una capacidad para producir putrescina con una concentración alta por la eliminación de argF y NCgl1221, introducción de speC y aumento de argCJDB (refiérase a la Figura 1).

La cepa con la actividad de la proteína NCgl1469 eliminada se llamó *Corynebacterium glutamicum* CC01-0163, depositada en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (al que se hace referencia de aquí en adelante como "KCCM") con el número de depósito KCCM11240P de 26 de diciembre de 2011. El resultado del cultivo de la cepa que presenta no producción de N-acetil putrescina, la productividad de putrescina está mejorada con un nivel de mejora similar al nivel de no producción de N-acetil putrescina, y por lo tanto la NCgl1469 tiene actividad de acetilar la putrescina.

Además, La cepa de *Corynebacterium glutamicum*, DAB12-aΔNCgl1469, con un aumento de capacidad para producir putrescina se preparó eliminando la actividad de la proteína NCgl1469 expuesta en la SEQ ID NO: 20 en la cepa DAB12-a productora de putrescina, y el resultado del cultivo de la cepa mostraba que la N-acetil putrescina no se produce y la productividad de putrescina aumenta.

Entre tanto, la presente invención se prefiere al procedimiento de producción de putrescina que comprende el cultivo del microorganismo para producir un cultivo celular, un microorganismo del género *Corynebacterium* que aumenta la capacidad para producir putrescina en el que la actividad de la proteína NCgl1469 que tiene una secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20 está debilitada o eliminada en comparación con la actividad endógena de la misma; y aislar la putrescina del cultivo celular obtenido. En una realización, el microorganismo del género *Corynebacterium* es el *Corynebacterium glutamicum*.

El procedimiento de cultivo de la presente invención puede consistir en el medio y condiciones de cultivo apropiados conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden ajustar y utilizar fácilmente el procedimiento de cultivo de acuerdo con las cepas seleccionadas. Un ejemplo del procedimiento de cultivo incluye el uso de cultivos discontinuos, continuos y semi-continuos, pero no se limita a estos. El medio de cultivo que se utiliza debe satisfacer apropiadamente las necesidades de la cepa específica.

El medio de cultivo que se utiliza debe satisfacer apropiadamente las necesidades de la cepa específica. Se conocen medios de cultivo para distintos microorganismos (por ejemplo, "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)). Como fuente de carbono en el medio, se pueden utilizar azúcares y carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón y celulosa), grasa de mantequilla y grasas (por ejemplo, aceite de soja, aceite de semillas de girasol, aceite de maní y aceite de coco), ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcoholes (por ejemplo, glicerol y etanol), y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, etc. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como una mezcla. Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de carne bovina, extracto de malta, agua de macerado de maíz, polvo de harina de soja y urea) o compuestos inorgánicos (por ejemplo, sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico) y estas sustancias se pueden utilizar también individualmente o como una mezcla. Como fuente de fósforo, se puede utilizar fosfato dihidrógeno de potasio o fosfato hidrógeno dipotásico o la sal correspondiente que contienen sodio. Además, el medio de cultivo puede comprender sales metálicas (por ejemplo, sulfato magnésico o sulfato de hierro) que son esenciales para el crecimiento, y finalmente sustancias de promoción del crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas, se pueden utilizar además de las sustancias mencionadas anteriormente. El precursor adecuado se puede añadir además al medio de cultivo. La sustancia de alimentación se puede proporcionar en el cultivo de una vez o adecuadamente durante el cultivo.

El pH del cultivo se puede ajustar por el uso apropiado de un compuesto básico (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico o amoníaco) o un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico). Se puede ajustar la producción de espuma utilizando un agente anti-espumante tal como un poliglicoléster de ácido graso. El estado aeróbico se puede mantener introduciendo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, por ejemplo, aire en el cultivo. La temperatura del cultivo es normalmente de 20 a 45 °C, preferentemente de 25 a 40 °C. El cultivo continúa hasta que la generación alcanza el máximo deseado. Este objetivo se consigue habitualmente en 10 a 160 horas. La putrescina se puede liberar en el medio de cultivo, o estar contenida en las células.

Para el procedimiento de recolección y recogida de la putrescina producida en el procedimiento de cultivo de la presente invención, la sustancia diana se puede recolectar el medio de cultivo utilizando el procedimiento apropiado en la técnica dependiendo del procedimiento de cultivo, por ejemplo, un procedimiento de cultivo discontinuo, continuo o semi-continuo.

Modo para la invención

De aquí en adelante, la invención se describirá con más detalle en referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos solamente tienen fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Cepa con actividad de NCgl1469 eliminada**Ejemplo 1-1: Preparación de la cepa con la NCgl1469 eliminada basada en la cepa ATCC13032 productora de putrescina**

5 Con el fin de bloquear la ruta sintética de N—acetil putrescina de putrescina en la célula, se preparó una cepa mutante en la que se eliminó el gen que codifica la NCgl1469, basándose en la base del microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene la capacidad para producir putrescina (KCCM11138P(ATCC13032ΔargF ΔNCgl1221P(CJ7)-argCJBDbio-AD::P(CJ7)-speC(Ec)) desvelada en la solicitud de patente de los presentes inventores (Publicación de Patente N° 2012-0064046), que se preparó eliminando el gen endógeno que codifica la carbamoil transferasa (ArgF) y el gen endógeno que codifica el exportador de glutamato (NCgl1221) que está implicado en la liberación de glutamato, introduciendo el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (SpeC) derivada de la *E. coli* W3110 de tipo silvestre en el cromosoma, y sustituyendo un promotor del grupo genético argCJBD que codifica la enzima implicada en la síntesis de ornitina a partir de glutamato en la cepa ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre.

15 Específicamente, se prepararon como cebadores NCgl1469-del-F1_BamHI y NCgl1469-del-R1_Sall para obtener un fragmento recombinante homólogo del dominio del extremo N de la NCgl1469 y se prepararon como cebadores NCgl1469-del-F2_Sall y NCgl1469-del-R2_XbaI para obtener un fragmento recombinante homólogo del dominio del extremo C de NCgl1469, basándose en la secuencia de nucleótidos del gen NCgl1469 de la cepa ATCC13032 (SEQ ID NO: 17) (Tabla 1).

[Tabla 1]

Cebadores para la producción de una cepa con NCgl1469 eliminado basada en la ATCC13032	
NCgl1469-del-F1_BamHI (SEQ ID NO: 1)	CGGGATCCAACCTTCAGAACGCGAATAC
NCgl1469-del-R1_Sall (SEQ ID NO: 2)	CGCGTCGACTTGGCACTGTGATTACCATC
NCgl1469-del-F2_Sall (SEQ ID NO: 3)	CGCGTCGACTTGGGTTATATCCCCTCAGA
NCgl1469-del-R2_XbaI (SEQ ID NO: 4)	TGCTCTAGATAGTGAGCCAAGACATGGAA

20 Con el fin de obtener el fragmento del extremo N y el fragmento del extremo C del gen NCgl1469, se llevó a cabo una PCR utilizando el conjunto de cebadores (NCgl1469-del-F1_BamHI y NCgl1469-del-R1_Sall, y NCgl1469-del-F2_Sall y NCgl1469-del-R2_XbaI) y el cromosoma de la cepa ATCC13032 como matriz. Se llevó a cabo la reacción PCR con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 53 °C durante 30 segundos, y elongación a 72 °C durante 30 segundos.

25 Después se procesaron los productos de la PCR en una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se aisló una banda de ADN del tamaño diana y se purificó. Entonces, el producto de PCR del dominio del extremo N y el producto de PCR del dominio del extremo C se trataron con BamHI y Sall y Sall y XbaI respectivamente, y entonces se clonaron en el vector pDZ tratado con BamHI y XbaI. El plásmido resultante que se utilizó para la eliminación de NCgl1469 se denominó pDZ-NCgl1469 (K/O).

30 Con el fin de generar la cepa KCCM11138PANCgl1469, el vector pDZ-NCgl1469 (K/O) se introdujo en la cepa KCCM11138P mediante electroporación y se colocó en una placa con medio BHIS (infusión de corazón-cerebro 37 g/l, sorbitol 91 g/l, y agar al 2 % por 1 l) que contenía kanamicina (25 mg/ml).

35 La inserción satisfactoria del vector se confirmó observando el color azul del medio sólido que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal). Las cepas con cruzamiento sencillo se cultivaron con agitado en un medio de nutrientes (30 °C, 8 horas), y cada una de ellas se diluyó en serie desde 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ y se colocaron en placas en medio sólido que contenía X-gal. Aunque la mayoría de las colonias aparecían como colonias azules, una baja proporción de colonias aparecía como colonias blancas y se seleccionaron las colonias blancas, finalmente se seleccionaron las cepas con el gen NCgl1469 eliminado con un doble cruzamiento. Se confirmó la inactivación satisfactoria del gen en la cepa por PCR utilizando los cebadores NCgl1469-del-F1_BamHI y NCgl1469-del-R2_XbaI. La cepa confirmada por PCR se denominó KCCM11138PANCg11469.

Ejemplo 1-2. Preparación de una cepa con NCgl1469 eliminado basándose en la cepa ATCC13869 productora de putrescina

45 Utilizando el mismo procedimiento que se usa para la producción de la cepa productora de putrescina KCCM11138P basada en la *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, se preparó otra cepa productora de putrescina en el presente Ejemplo, basándose en el *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, eliminando el gen endógeno que codifica la carbamoil transferasa (ArgF) y el gen endógeno que codifica el exportador de glutamato (NCgl1221) que está implicado en la liberación de glutamato, introduciendo el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (SpeC)

derivad de la *E. coli* W3110 de tipo silvestre en el cromosoma, y sustituyendo el promotor del grupo genético argCJBD que codifica la enzima implicada en la síntesis de ornitina a partir de glutamato. La cepa productora de putrescina preparada se llamó DAB12-a (cepa con eliminación de argF, eliminación de NCgl1221, introducción de speC de *E. coli*, y sustitución de promotor de operón arg), y se prepararon las cepas con eliminación de NCgl1469 basándose en la misma.

Para ser específicos, con el fin de identificar el gen que codifica NCgl1469 derivado del *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 y la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada del mismo, se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN genómico del *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 como matriz y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6 (NCgl1469-D y NCgl1469-I) (Tabla 2). Aquí se llevó a cabo la reacción de la PCR con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 53 °C durante 30 segundos, y elongación a 72 °C durante 30 segundos. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis y se analizaron sus secuencias. Mediante el análisis de la secuencia, se identificó que el gen que codifica la NCgl1469 derivado de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 19 y la proteína codificada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20. Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de NCgl1469 derivadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 y de la NCgl1469 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, presentaban un 99 % de homología de secuencia.

[Tabla 2]

Cebador para identificar el gen que codifica la NCgl1469 derivada de ATCC13869	
NCgl1469-D (SEQ ID NO: 5)	CATCCTGGGGAATTCATTTGTCAT
NCgl1469-I (SEQ ID NO: 6)	GGCGTTCGACAAAGCCTAATAAG

Con el fin de eliminar el gen que codifica la NCgl1469 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, se preparó un plásmido denominado pDZ-2'NCgl1469 (K/O). Primero se amplificaron los genes del dominio del extremo N y el dominio del extremo C por PCR utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 como matriz y dos pares de cebadores enumerados en la Tabla 3 como se describe en el Ejemplo <1-1>. Entonces los productos PCR de los dominios del extremo N y el extremo C se digirieron por restricción con BamHI y Sall y Sall y XbaI respectivamente y luego se clonaron en el vector pDZ digerido con BamHI y Sall, generando de esta manera un plásmido pDZ-2'NCgl1469(K/O).

[Tabla 3]

Cebadores para la producción de la cepa con NCgl1469 eliminada basada en ATCC13869	
2'NCgl1469-del-F1_BamHI (SEQ ID NO: 7)	CGGGATCCGTGGCTGCCAGGAATGGCTCC
NCgl1469-del-H1-Sall (SEQ ID NO: 2)	CGCGTCTCGACTTGGCACTGTGATTACCATC
NCgl1469-del-F2_Sall (SEQ ID NO: 3)	CGCGTCTCGACTTGGGTTATATCCCCTCAGA
2'NCgl1469-del-R2_XbaI (SEQ ID NO: 8)	TGCTCTAGACCCAAAACATCCTGGCGGC

El plásmido pDZ-2'NCgl1469 (K/O) se transfectó en *Corynebacterium glutamicum* DAB12-a utilizando lo mismo que en el ejemplo <1-1> y se seleccionó la cepa en la se había eliminado el gen que codifica la NCgl1469. La cepa de *Corynebacterium glutamicum* mutante seleccionada se denominó DAB12-aΔNCgl1469.

Ejemplo 2: La cepa con actividad de NCgl1469 debilitada

Con el fin de debilitar la ruta sintética de la N-acetil putrescina de la putrescina en un microorganismo del género *Corynebacterium* KCCM11138P que era capaz de producir putrescina (Publicación de Patente Coreana N° 2012-0064046), se preparó una cepa con sustitución de un codón de inicio de NCgl1469.

Para ser específico, asándose en la secuencia de nucleótidos de NCgl1469 derivada de la cepa ATCC13032, se preparó un conjunto de cebadores, NCgl1469-gtg-F1 y NCgl1469-gtg-R1, para obtener un fragmento recombinante homólogo del dominio del extremo N de NCgl1469, y se preparó un conjunto de cebadores, NCgl1469-gtg-F2 y NCgl1469-gtg-R2, para obtener un fragmento recombinante homólogo del dominio del extremo C de NCgl1469 (Tabla 4). El sitio en el que el fragmento del extremo N y el extremo C se combinaban se diseñó de manera que el codón de inicio de ATG de la NCgl1469 se sustituyó por el GTG.

[Tabla 4]

Cebadores para producir una cepa con sustitución del codón de inicio en la NCgl1469	
NCgl1469-gtg-F1 (SEQ ID NO: 9)	CGGGATCCTGGATTGTATACTGCGACCAC
NCgl1469-gtg-R1 (SEQ ID NO: 10)	CAAAACGGTGGGACTCACGGATACCAGAATAGC
NCgl1469-gtg-F2 (SEQ ID NO: 11)	GCTATTCTGGTATCCGTGAGTCCCACCGTTTTG
NCgl1469-gtg-R2 (SEQ ID NO: 12)	TGCTCTAGATTAACAGTTGGCATCGCTGG

5 Con el fin de obtener el fragmento del extremo N y el fragmento del extremo C del gen de NCgl1469 de la cepa ATCC13032, se llevó a cabo la PCR utilizando dos conjuntos de cebadores (NCgl1469-gtg-F1 y NCgl1469-gtg-R1 y NCgl1469-gtg-F2 y NCgl1469-gtg-R2) y el cromosoma de la cepa ATCC13032 como matriz. Se llevó a cabo la PCR con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 52 °C durante 40 segundos, y elongación a 72 °C durante 30 segundos utilizando la Pfu polimerasa (Stratagene).

10 Después de llevar a cabo la electroforesis de los productos de la PCR en gel de agarosa al 0,8 %, se aisló y purificó una banda de ADN del tamaño diana. Después, los productos de PCR del dominio del extremo N y el extremo C del gen NCgl1469 de la cepa ATCC13032 se clonó cada uno por fusión en el vector pDZ digerido con BamHI y XbaI. Para la clonación por fusión, se utilizó el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech). El plásmido preparado que se va a utilizar para la sustitución del codón de inicio de NCgl1469 se denominó pDZ-NCgl1469 (gtg).

15 Con el fin de obtener una cepa KCCM11138P NCgl1469 (gtg), el vector pDZ-NCgl1469 (gtg) preparado se introdujo en la cepa KCCM11138P mediante electroporación, y se colocaron en placas las células transformadas en una placa de medio BHIS (infusión de cerebro-corazón 37 g/l, sorbitol 91 g/l, agar al 2 %, base 1 l) que contenía kanamicina (25 mg/ml). Se confirmó la inserción satisfactoria del vector en el cromosoma de la cepa observando las colonias azules en el medio sólido que contenían 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal). Las cepas con cruzamiento sencillo se cultivaron con agitado en un medio nutritivo (30 °C, 8 horas), y cada una de ellas se diluyó en serie de 10^{-4} a 10^{-10} y se colocaron en placas sobre un medio sólido que contenía X-gal. Aunque la mayoría de las colonias aparecían como colonias azules, una baja proporción de colonias aparecían como colonias blancas, y seleccionando las colonias blancas, se seleccionaron finalmente las cepas con sustitución del codón de inicio de NCgl1469 mediante doble cruzamiento. Además, la secuencia de las cepas seleccionadas se confirmó por PCR utilizando un conjunto de cebadores, NCgl1469-del-F1_BamHI y NCgl1469-del-R2_XbaI. La cepa confirmada se denominó KCCM11138P NCgl1469 (gtg).

25 **Ejemplo 3: La cepa con aumento de actividad de NCgl1469**

Como se sabe que la productividad de ornitina está aumentada en una cepa mutante de la cepa de *Corynebacterium glutamicum* con aumento de actividad de NCgl1469 (Hwang y col., J Ind Microbiol Biotechnol, 37:11, 1131-1136, 2010), se introdujo un polinucleótido que codifica NCgl1469 en forma de plásmido o en una forma que se va a insertar en el cromosoma para el aumento de la productividad de ornitina, y se analizó el efecto de los mismos.

30 **Ejemplo 3-1: Clonación del gen que codifica NCgl1469 y preparación de un transformante con el mismo**

Con el fin de confirmar el efecto del aumento del número de copias del gen NCgl1469 (incluyendo una región promotora) sobre la alta producción de ornitina y putrescina, se generó una cepa mutante introduciendo el NCgl1469 en una forma de plásmido en la cepa KCCM11138P descrita en el Ejemplo 1.

35 Para ser específicos, se amplificó un polinucleótido que codifica la NCgl1469 por PCR utilizando el gen de NCgl1469 de la cepa ATCC13032 como matriz y los cebadores (NCgl1469-300-F_KpnI y NCgl1469-R_XbaI) en las mismas condiciones del Ejemplo 1. Mediante la PCR, se obtuvo un fragmento genético que tenía un tamaño de aproximadamente 900 pb (Tabla 5).

[Tabla 5]

Cebadores para obtener el gen NCgl1469	
NCgl1469-300-F_KpnI (SEQ ID NO: 13)	CGGGGTACCTTCCAACGCTGCTCGGATGAC
NCgl1469-R_XbaI (SEQ ID NO: 14)	TGCTCTAGATTAACAGTTGGCATCGCTGG

40 Los fragmentos genéticos obtenidos se digirieron con KpnI y XbaI y se clonó en el vector pHc139T-gfp que se trató con las mismas enzimas de restricción (Patente Coreana N° 620092), generando de esta manera el vector de expresión, pHc139T-NCgl1469.

5 El vector pHc139T-NCg11469 preparado se introdujo en la cepa KCCM11138P con la capacidad de producir putrescina con el fin de aumentar la productividad de ornitina y putrescina en una cepa. El vector se introdujo en la cepa mediante electroporación y se colocaron en placas las células transformadas en una placa de medio BHIS que contenía 25 mg/ml de kanamicina, y se seleccionaron los transformantes satisfactorios. La cepa seleccionada se denominó KCCM11138P / pHc139T-NCg11469.

Ejemplo 3-2: La cepa mutante con la inserción cromosómica del gen que codifica NCg1469

Con el fin de confirmar el efecto de la inserción cromosómica adicional del gen de NCg1469 (incluyendo una región promotora) sobre la alta producción de ornitina y putrescina, se generó una cepa mutante introduciendo el NCg1469 en el cromosoma de KCCM11138P que se describió en el Ejemplo 1.

10 Se desarrolló un vector pDZTn por los presentes inventores (Publicación Coreana N° 2008-0033054) para la transformación que permitía la inserción cromosómica de un gen utilizando la localización genética del transposón de un microorganismo del género *Corynebacterium* y se puede utilizar de la misma manera que en la introducción del gen utilizando el vector pDZ.

15 Se obtuvo un fragmento genético de NCg1469 que tenía un tamaño de aproximadamente 900 pb por PCR utilizando el gen de la cepa ATCC13032 como matriz y un conjunto de cebadores, los cebadores NCg1469-300-F_SpeI y NCg1469-R_XhoI (Tabla 6).

[Tabla 6]

Cebadores II para obtener el gen de NCg1469	
NCg1469-300-F_SpeI_Tn (SEQ ID NO: 15)	TGTCGGGCCCACTAGTTTCCAACGCTGCTCGGATGAC
NCg1469-R_XhoI_Tn (SEQ ID NO: 16)	GAATGAGTTCCTCGAGTTAAACAGTTGGCATCGC

20 La reacción PCR se llevó a cabo con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, 52 °C durante 40 segundos, y elongación a 72 °C durante 60 segundos, utilizando un pfu polimerasa (Stratagene). Después de llevar a cabo la electroforesis de los productos de la PCR en el de agarosa al 0,8 %, se aisló y purificó una banda de ADN del tamaño diana. El fragmento genético de NCg1469 purificado se clonó por fusión en el vector pDZTn que estaba digerido por restricción con SpeI y XhoI. Para la clonación por fusión se utilizó un kit de clonación In-Fusion HD (Clontech). El plásmido preparado se denominó pDZTn-NCg1469.

25 Con el fin de obtener la cepa KCCM11138P Tn: :NCg1469, el vector pDZ-NCg1469 se introdujo en la cepa KCCM11138P mediante electroporación y las células transformadas se colocaron en placa en una palca con medio BHIS que contienen kanamicina (25 mg/ml). La inserción satisfactoria del vector en el cromosoma se confirmó por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y mediante este, se seleccionó la cepa insertada con el gen NCg1469 en la posición genética del transposón. Además, se confirmó la secuencia de la cepa mutante por PCR utilizando un conjunto de cebadores, NCg1469-300-F_SpeI_Tn y NCg1469-R_XhoI_Tn. La cepa preparada se denominó KCCM11138P Tn: :NCg1469.

Ejemplo 4: Comparación de la capacidad para producir putrescina

35 Con el fin de investigar los efectos producidos por la eliminación del gen NCg1469, la sustitución del codón de partida, el aumento del nivel de expresión, y la inserción cromosómica del gen, se evaluó la capacidad de las cepas preparadas anteriormente para producir putrescina.

40 Para ser específica, las cepas preparadas se cultivaron en una placa con medio CM que contenía 1 mM de arginina (glucosa al 1 %, polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, extracto de vacuno al 0,5 %, NaCl 0,25 %, urea al 0,2 %, un 50 % de NaOH 100 ml, agar al 2 %, pH 6,8 por 1 l) a 30 °C durante 16 horas. Entonces, se inoculó un asa del cultivo celular en 25 ml de medio de título de la Tabla 7 y se cultivó con agitado a 200 rpm a 30 °C durante 96 horas. Todas las cepas preparadas se cultivaron con la adición de 1 mM de arginina en el medio durante la fermentación.

[Tabla 7]

Composición	Concentración
Glucosa	8 %
Proteína de soja	0,25 %
Sólidos de macerado de maíz	0,50 %

(continuación)

Composición	Concentración
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 %
Urea	0,15 %
KH ₂ PO ₄	0,10 %
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 %
Biotina	100 mg
Clorhidrato de Tiamina	3000 mg
Calcio- Ácido Pantoténico	3000 mg
Nicotinamida	3000 mg
CaCO ₃	5 %

5 Como resultado, como se muestra en la Tabla 8, cuando se inactivaba la función del gen NCgl1469 por eliminación del mismo en la cepa KCCM11138P productora de putrescina, no se producía N-acetil putrescina. También, el nivel de producción de putrescina era 2,6 g/l más alta que el grupo de control, demostrando que la productividad de la putrescina aumento en la cepa por eliminación del gen NCgl1469.

Además, cuando la función del gen NCgl1469 estaba debilitada por sustitución del codón de inicio del mismo, el nivel de producción de N-acetil putrescina, que normalmente se producía en un microorganismo de la cepa KCCM11138P que tiene la capacidad para producir putrescina, disminuía aproximadamente 3 g/l como mucho. Lo que demuestra que la productividad de N-acetil putrescina estaba reducida a la mitad.

10 De manera similar a la KCCM11138P, cuando la función del gen NCgl1469 se inactivaba por eliminación del mismo en la cepa DAB12-a productora de putrescina derivada de la ATCC13869, no se producía N-acetil putrescina, por lo que la productividad de putrescina estaba mejorada.

15 Estos resultados muestran que la ruta de putrescina a N-acetil putrescina se había debilitado o bloqueado por debilitamiento o eliminación del gen NCgl1469, y que la proteína que se expresa a partir del gen NCgl1469 actúa para acetilar la putrescina.

Entre tanto, cuando la actividad de NCgl1469 estaba aumentada, la proporción de N-acetil putrescina en la célula de cultivo era mayor que en el grupo de control, y no había diferencia entre la expresión genética en el plásmido y la inserción cromosómica adicional del gen en términos de aumento de actividad de NCgl1469.

20 Cuando aumentaba la actividad del gen NCgl1469 en una cepa general productora de ornitina, la ruta de conversión de glutamato a acetil glutamato estaba aumentada y aumentaba la producción de ornitina (Publicación de Patente Coreana N° 2011-0080475). Sin embargo, en la presente invención, la mayoría de ornitina se convertía en putrescina y por lo tanto no se acumulaba la ornitina.

25 La diferencia en los resultados de un procedimiento convencional se puede deber al hecho de que la proteína que se expresa a partir del gen NCgl1469 reconoce la putrescina más fácilmente que el glutamato, y por lo tanto la producción de N-acetil putrescina estaba más aumentada que la de acetil glutamato.

[Tabla 8]

Tipo de cepa	Ornitina (g/l)	Putrescina (g/l)	N-Acetil Putrescina (g/l)
KCCM11138P	0	9,8	5,7
KCCM11138P Δ NCgl1469	0	12,4	0,0
KCCM11138P NCgl1469(gtg)	0	11,1	2,7
KCCM11138P Tn::NCgl1469	0	5,8	9,8
KCCM11138P / pHC139T	0	9,5	6,1
KCCM11138P / pHC139T-NCgl1469	0	6,6	9,2
DAB12-a	0	10,1	6,3
DAB12-a Δ NCgl1469	0	13,1	0,1

Los presentes inventores han preparado una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con una productividad aumentada de putrescina sin producción de N-acetil putrescina eliminando el gen NCgl1469 en el microorganismo KCCM11138P de *Corynebacterium* sp. modificado que tiene la capacidad de producir putrescina (Publicación de Patente Coreana N° 2012-0064046) como se describe en el Ejemplo 1-1, han llamado a esta cepa *Corynebacterium glutamicum* CC01-0163, y depositaron la misma con el número de depósito KCCM11240P en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (al que se hace referencia de aquí en adelante como "KCCM") que es la autoridad depositaria internacional bajo el Tratado de Budapest, el 26 de diciembre de 2011.

5 <110> CJ CheilJedang Corporation

10 <120> MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PUTRESCINA Y PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PUTRESCINA UTILIZANDO LOS MISMOS

<130> OPA12194PCT

15 <150> KR 10-2012-0003634
<151> 11-01-2012

<160> 27

20 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 28
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 1
cgggatcaa ccttcagaac gccaatac 28

<210> 2
<211> 29
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 2
cgcgctgact tggcactgtg attacatc 29

<210> 3
<211> 29
<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 3
cgcgctgact tgggttatat cccctcaga 29

<210> 4
<211> 29
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

60 <400> 4
tgctctagat agtgagccaa gacatggaa 29

65

ES 2 655 764 T3

5	<p><210> 5 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Cebador</p>	
10	<p><400> 5 catcctgggg aattcattg tcat</p>	24
	<p><210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Cebador</p>	
20	<p><400> 6 ggcgttcgac aaagcctaag aag</p>	23
	<p><210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Cebador</p>	
30	<p><400> 7 cgggatccgt ggctgccagg aatggctcc</p>	29
	<p><210> 8 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Cebador</p>	
40	<p><400> 8 tgctctagac ccaaaacatc ctggcggc</p>	28
	<p><210> 9 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Cebador</p>	
50	<p><400> 9 cgggatcctg cattgtatac tgcgaccac</p>	29
	<p><210> 10 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Cebador</p>	
60	<p><400> 10 caaaacgggtg ggactcacgg ataccagaat agc</p>	33
	<p><210> 10 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
65	<p><220> <223> Cebador</p>	

ES 2 655 764 T3

<210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 10 gctattctgg tatccgtgag tcccaccgtt ttg 33
 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 12
 tgctctagat taaacagttg gcatcgctgg 30
 <210> 13
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 13
 cggggtacct tccaacgctg ctcggatgac 30
 <210> 14
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 14
 tgctctagat taaacagttg gcatcgctgg 30
 <210> 15
 <211> 37
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 15
 55 tgcgggccc actagttcc aacgctgctc ggatgac 37
 <210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 65 gaatgagttc ctcgagtaa acagttggca tcgctgg 37

ES 2 655 764 T3

<210> 17
 <211> 612
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

5

<400> 17

```

atgagtccca cggttttgcc tgctacacaa gctgaacttc ctaagatcgt cgatggtctg      60
gttgaagcat tcgccaacga tccagcattt ttaogatgga tcccgcagcc ggacccccgg      120
tcagcaaagc ttcgagcact tttcgaactg cagattgaga agcagtatgc agtggcggga      180
aatattgatg tcgcgcgtga ttctgagga gaaatcgtcg gcgtcgcgtt atgggatcgg      240
ccagatggta atcacagtgc caaagatcaa gcagcgatgc tccccggct cgtctccatt      300
ttcgggatca aggctgcgca ggtggcgtgg acggatttga gttcggctcg tttccacccc      360
aaattcccc attggtacct ctacacogtg gcaacatcta gttctgccog tggaaacggg      420
gttggcagtg cgcttotta tcaacggaatc gctcgcgcgg gtgatgaagc tatctatttg      480
gaggcgacgt cgactcgtgc ggctcaacta tataaccgtc tgggatttgt gcccttggg      540
tatatcccct cagatgatga tggcactcct gaactggcga tgtggaaacc gccagcgatg      600
ccaactgttt aa                                                                612
    
```

<210> 18
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

10

<400> 18

15

ES 2 655 764 T3

Met	Ser	Pro	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Thr	Gln	Ala	Asp	Phe	Pro	Lys	Ile
1				5					10					15	
Val	Asp	Val	Leu	Val	Glu	Ala	Phe	Ala	Asn	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Arg
			20					25					30		
Trp	Ile	Pro	Gln	Pro	Asp	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Phe
		35					40					45			
Glu	Leu	Gln	Ile	Glu	Lys	Gln	Tyr	Ala	Val	Ala	Gly	Asn	Ile	Asp	Val
	50					55					60				
Ala	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Glu	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Leu	Trp	Asp	Arg
65					70					75					80
Pro	Asp	Gly	Asn	His	Ser	Ala	Lys	Asp	Gln	Ala	Ala	Met	Leu	Pro	Arg
				85					90					95	
Leu	Val	Ser	Ile	Phe	Gly	Ile	Lys	Ala	Ala	Gln	Val	Ala	Trp	Thr	Asp
			100					105					110		
Leu	Ser	Ser	Ala	Arg	Phe	His	Pro	Lys	Phe	Pro	His	Trp	Tyr	Leu	Tyr
		115					120					125			
Thr	Val	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Arg	Gly	Thr	Gly	Val	Gly	Ser	Ala
	130					135					140				
Leu	Leu	Asn	His	Gly	Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Ile	Tyr	Leu
145				150						155					160
Glu	Ala	Thr	Ser	Thr	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Tyr	Asn	Arg	Leu	Gly	Phe
				165					170					175	
Val	Pro	Leu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Asp	Asp	Asp	Gly	Thr	Pro	Glu	Leu
			180					185					190		
Ala	Met	Trp	Lys	Pro	Pro	Ala	Met	Pro	Thr	Val					
		195					200								

<210> 19
 <211> 612
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 19

atgagtccca	ccgttttgcc	tgctacacaa	gctgacttcc	ctaagatcgt	cgatgttctg		60
gttgaagcat	tcgccaacga	tccagcattt	ttacgatgga	tcccgcagcc	ggacccccggt		120
tcagcaaagc	ttcgagcact	tttogaactg	cagattgaga	agcagtatgc	agtggcggga		180
aatattgatg	tgcgcggtga	ttctgagggg	gaaatcgctg	gcgtcgcggt	atgggatcgg		240
ccagatggta	atcacagtgc	caaagatcaa	gcagcgatac	tcccccggtc	cgtctccatt		300
ttcgggatca	aggctgcgca	ggtggcgtgg	acggatttga	gttcggctcg	tttccacccc		360

5

10

ES 2 655 764 T3

```

aaattccccc attggtacct ctacaccgtg gcaacatcta gttctgcccg tggaacgggt      420
gttggcagtg cgcttcttaa tcacggaatc gctcgcgcgg gtgatgaagc tatctatttg      480
gaggcgacgt cgactcgtgc ggctcaacta tataaccgtc tgggatttgt gcccttgggt      540
tatatccoct cagatgatga tggcactoct gaactggcga tgtggaacc gccagcgatg      600
ccaactgttt aa                                                                612

```

<210> 20
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 20

5

```

Met Ser Pro Thr Val Leu Pro Ala Thr Gln Ala Asp Phe Pro Lys Ile
  1          5          10          15
Val Asp Val Leu Val Glu Ala Phe Ala Asn Asp Pro Ala Phe Leu Arg
          20          25          30
Trp Ile Pro Gln Pro Asp Pro Gly Ser Ala Lys Leu Arg Ala Leu Phe
          35          40          45
Glu Leu Gln Ile Glu Lys Gln Tyr Ala Val Ala Gly Asn Ile Asp Val
  50          55          60
Ala Arg Asp Ser Glu Gly Glu Ile Val Gly Val Ala Leu Trp Asp Arg
  65          70          75          80
Pro Asp Gly Asn His Ser Ala Lys Asp Gln Ala Ala Ile Leu Pro Arg
          85          90          95
Leu Val Ser Ile Phe Gly Ile Lys Ala Ala Gln Val Ala Trp Thr Asp
          100          105          110
Leu Ser Ser Ala Arg Phe His Pro Lys Phe Pro His Trp Tyr Leu Tyr
          115          120          125
Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Ala Arg Gly Thr Gly Val Gly Ser Ala
          130          135          140
Leu Leu Asn His Gly Ile Ala Arg Ala Gly Asp Glu Ala Ile Tyr Leu
          145          150          155          160
Glu Ala Thr Ser Thr Arg Ala Ala Gln Leu Tyr Asn Arg Leu Gly Phe
          165          170          175
Val Pro Leu Gly Tyr Ile Pro Ser Asp Asp Asp Gly Thr Pro Glu Leu
          180          185          190
Ala Met Trp Lys Pro Pro Ala Met Pro Thr Val
          195          200

```

10

<210> 21
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

15

ES 2 655 764 T3

<400> 21

Met Thr Ser Gln Pro Gln Val Arg His Phe Leu Ala Asp Asp Asp Leu
 1 5 10 15
 Thr Pro Ala Glu Gln Ala Glu Val Leu Thr Leu Ala Ala Lys Leu Lys
 20 25 30
 Ala Ala Pro Phe Ser Glu Arg Pro Leu Glu Gly Pro Lys Ser Val Ala
 35 40 45
 Val Leu Phe Asp Lys Thr Ser Thr Arg Thr Arg Phe Ser Phe Asp Ala
 50 55 60
 Gly Ile Ala His Leu Gly Gly His Ala Ile Val Val Asp Ser Gly Ser
 65 70 75 80
 Ser Gln Met Gly Lys Gly Glu Ser Leu Gln Asp Thr Ala Ala Val Leu
 85 90 95
 Ser Arg Tyr Val Glu Ala Ile Val Trp Arg Thr Tyr Ala His Ser Asn
 100 105 110
 Phe His Ala Met Ala Glu Thr Ser Thr Val Pro Leu Val Asn Ser Leu
 115 120 125
 Ser Asp Asp Leu His Pro Cys Gln Ile Leu Ala Asp Leu Gln Thr Ile
 130 135 140
 Val Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu Gly Pro Ala Gly Leu Lys Gly Lys
 145 150 155 160
 Lys Ala Val Tyr Leu Gly Asp Gly Asp Asn Asn Met Ala Asn Ser Tyr
 165 170 175
 Met Ile Gly Phe Ala Thr Ala Gly Met Asp Ile Ser Ile Ile Ala Pro
 180 185 190
 Glu Gly Phe Gln Pro Arg Ala Glu Phe Val Glu Arg Ala Glu Lys Arg
 195 200 205
 Gly Gln Glu Thr Gly Ala Lys Val Val Val Thr Asp Ser Leu Asp Glu
 210 215 220
 Val Ala Gly Ala Asp Val Val Ile Thr Asp Thr Trp Val Ser Met Gly
 225 230 235 240
 Met Glu Asn Asp Gly Ile Asp Arg Thr Thr Pro Phe Val Pro Tyr Gln
 245 250 255
 Val Asn Asp Glu Val Met Ala Lys Ala Asn Asp Gly Ala Ile Phe Leu
 260 265 270
 His Cys Leu Pro Ala Tyr Arg Gly Lys Glu Val Ala Ala Ser Val Ile
 275 280 285
 Asp Gly Pro Ala Ser Lys Val Phe Asp Glu Ala Glu Asn Arg Leu His
 290 295 300
 Ala Gln Lys Ala Leu Leu Val Trp Leu Leu Ala Asn Gln Pro Arg
 305 310 315

<210> 22
<211> 533
<212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum*

5

<400> 22

ES 2 655 764 T3

Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
1 5 10 15

Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
20 25 30

Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Arg
35 40 45

Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
50 55 60

Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
65 70 75 80

Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
85 90 95

Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
100 105 110

Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
115 120 125

Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
130 135 140

Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
145 150 155 160

Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
165 170 175

Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
180 185 190

Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
195 200 205

Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
210 215 220

Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro
225 230 235 240

Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln
245 250 255

Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu
260 265 270

Ile Ile Ser Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser
275 280 285

Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr
290 295 300

Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu
305 310 315 320

ES 2 655 764 T3

Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala
 325 330 335

Asp Asn Ala Asp Ala Ser Val Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu
 340 345 350

Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu
 355 360 365

Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp
 370 375 380

Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val
 385 390 395 400

Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 405 410 415

Phe Lys Val Met Thr Val Glu Pro Ser Glu Asn Trp Gln Asn Ser Ser
 420 425 430

Gly Trp Leu Ser Pro Ser Thr Ala Thr Ser Thr Ala Val Thr Thr Ser
 435 440 445

Glu Thr Ser Ala Pro Val Ser Thr Pro Ser Met Thr Val Pro Thr Thr
 450 455 460

Val Glu Glu Thr Pro Thr Met Glu Ser Asn Val Glu Thr Gln Gln Glu
 465 470 475 480

Thr Ser Thr Pro Ala Thr Ala Thr Pro Gln Arg Ala Asp Thr Ile Glu
 485 490 495

Pro Thr Glu Glu Ala Thr Ser Gln Glu Glu Thr Thr Ala Ser Gln Thr
 500 505 510

Gln Ser Pro Ala Val Glu Ala Pro Thr Ala Val Gln Glu Thr Val Ala
 515 520 525

Pro Thr Ser Thr Pro
 530

<210> 23
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 23

5

ES 2 655 764 T3

Met Lys Ser Met Asn Ile Ala Ala Ser Ser Glu Leu Val Ser Arg Leu
1 5 10 15
Ser Ser His Arg Arg Val Val Ala Leu Gly Asp Thr Asp Phe Thr Asp
20 25 30
Val Ala Ala Val Val Ile Thr Ala Ala Asp Ser Arg Ser Gly Ile Leu
35 40 45
Ala Leu Leu Lys Arg Thr Gly Phe His Leu Pro Val Phe Leu Tyr Ser
50 55 60
Glu His Ala Val Glu Leu Pro Ala Gly Val Thr Ala Val Ile Asn Gly

ES 2 655 764 T3

65					70					75				80	
Asn	Glu	Gln	Gln	Trp	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	Ala	Ala	Cys	Gln	Tyr	Glu
				85					90					95	
Glu	Asn	Leu	Leu	Pro	Pro	Phe	Tyr	Asp	Thr	Leu	Thr	Gln	Tyr	Val	Glu
			100					105					110		
Met	Gly	Asn	Ser	Thr	Phe	Ala	Cys	Pro	Gly	His	Gln	His	Gly	Ala	Phe
		115					120					125			
Phe	Lys	Lys	His	Pro	Ala	Gly	Arg	His	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Gly	Glu
	130					135					140				
Asn	Val	Phe	Arg	Ala	Asp	Met	Cys	Asn	Ala	Asp	Val	Lys	Leu	Gly	Asp
145					150					155					160
Leu	Leu	Ile	His	Glu	Gly	Ser	Ala	Lys	Asp	Ala	Gln	Lys	Phe	Ala	Ala
				165					170					175	
Lys	Val	Phe	His	Ala	Asp	Lys	Thr	Tyr	Phe	Val	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser
			180					185					190		
Ala	Ala	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Asn	Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Asp	Leu
		195					200					205			
Val	Leu	Phe	Asp	Arg	Asn	Asn	His	Lys	Ser	Asn	His	His	Gly	Ala	Leu
	210					215					220				
Ile	Gln	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro	Val	Tyr	Leu	Glu	Ala	Ser	Arg	Asn	Pro
225					230					235					240
Phe	Gly	Phe	Ile	Gly	Gly	Ile	Asp	Ala	His	Cys	Phe	Asn	Glu	Glu	Tyr
				245					250					255	
Leu	Arg	Gln	Gln	Ile	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Glu	Lys	Ala	Asp	Leu	Pro
			260					265					270		
Arg	Pro	Tyr	Arg	Leu	Ala	Ile	Ile	Gln	Leu	Gly	Thr	Tyr	Asp	Gly	Thr
		275					280						285		
Val	Tyr	Asn	Ala	Arg	Gln	Val	Ile	Asp	Thr	Val	Gly	His	Leu	Cys	Asp
	290					295					300				
Tyr	Ile	Leu	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Gly	Tyr	Glu	Gln	Phe	Ile	Pro
305					310					315					320
Met	Met	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Asn	Asp
			325						330					335	
Pro	Gly	Ile	Phe	Val	Thr	Gln	Ser	Val	His	Lys	Gln	Gln	Ala	Gly	Phe
			340					345					350		
Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Ile	His	Lys	Lys	Asp	Asn	His	Ile	Arg	Gly	Gln
		355					360					365			
Ala	Arg	Phe	Cys	Pro	His	Lys	Arg	Leu	Asn	Asn	Ala	Phe	Met	Leu	His
	370					375					380				
Ala	Ser	Thr	Ser	Pro	Phe	Tyr	Pro	Leu	Phe	Ala	Ala	Leu	Asp	Val	Asn
385					390					395					400
Ala	Lys	Ile	His	Glu	Gly	Glu	Ser	Gly	Arg	Arg	Leu	Trp	Ala	Glu	Cys

ES 2 655 764 T3

405					410					415					
Val	Glu	Ile	Gly	Ile	Glu	Ala	Arg	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	Arg	Cys	Lys
			420					425					430		
Leu	Phe	Arg	Pro	Phe	Ile	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Gly	Lys	Leu	Trp	Gln
		435					440					445			
Asp	Tyr	Pro	Thr	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Asp	Arg	Arg	Phe	Phe	Ser	Phe
	450					455					460				
Glu	Pro	Gly	Ala	Lys	Trp	His	Gly	Phe	Glu	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln
465					470					475					480
Tyr	Phe	Val	Asp	Pro	Cys	Lys	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Gly	Ile	Asp
				485					490					495	
Ala	Glu	Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Asp	Phe	Gly	Val	Pro	Ala	Thr	Ile	Leu
			500					505					510		
Ala	His	Tyr	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Ile	Val	Pro	Glu	Lys	Cys	Asp	Leu
		515					520					525			
Asn	Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Ser	His	Glu	Lys	Leu
	530						535					540			
Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Met	Leu	Ala	Gln	Phe	Glu	Gln	His	Ile	Glu	Asp
545					550					555					560
Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr	Asn	Lys	Tyr	Pro
				565					570					575	
Val	Arg	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Leu	Arg	Gln	Leu	Cys	Gln	Glu	Met	His
			580					585					590		
Asp	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Asp	Leu	Gln	Lys	Ala	Met	Phe
		595					600					605			
Arg	Gln	Gln	Ser	Phe	Pro	Ser	Val	Val	Met	Asn	Pro	Gln	Asp	Ala	His
	610					615					620				
Ser	Ala	Tyr	Ile	Arg	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Asp	Ala
625					630					635					640
Glu	Gly	Arg	Ile	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Leu	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gly	Val
				645					650					655	
Leu	Cys	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Val	Trp	Gly	Gly	Ala	Val	Gln	Arg	Tyr
			660					665					670		
Phe	Leu	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro
		675					680					685			
Glu	Leu	Gln	Gly	Val	Tyr	Ser	Glu	Thr	Asp	Ala	Asp	Gly	Val	Lys	Arg
	690					695					700				
Leu	Tyr	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys									
705					710										

<210> 24
<211> 357
<212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum*

5

<400> 24

ES 2 655 764 T3

Met Ile Met His Asn Val Tyr Gly Val Thr Met Thr Ile Lys Val Ala
 1 5 10 15
 Ile Ala Gly Ala Ser Gly Tyr Ala Gly Gly Glu Ile Leu Arg Leu Leu
 20 25 30
 Leu Gly His Pro Ala Tyr Ala Ser Gly Glu Leu Glu Ile Gly Ala Leu
 35 40 45
 Thr Ala Ala Ser Thr Ala Gly Ser Thr Leu Gly Glu Leu Met Pro His
 50 55 60
 Ile Pro Gln Leu Ala Asp Arg Val Ile Gln Asp Thr Thr Ala Glu Thr
 65 70 75 80
 Leu Ala Gly His Asp Val Val Phe Leu Gly Leu Pro His Gly Phe Ser
 85 90 95
 Ala Glu Ile Ala Leu Gln Leu Gly Pro Asp Val Thr Val Ile Asp Cys
 100 105 110
 Ala Ala Asp Phe Arg Leu Gln Asn Ala Ala Asp Trp Glu Lys Phe Tyr
 115 120 125
 Gly Ser Glu His Gln Gly Thr Trp Pro Tyr Gly Ile Pro Glu Met Pro
 130 135 140
 Gly His Arg Glu Ala Leu Arg Gly Ala Lys Arg Val Ala Val Pro Gly
 145 150 155 160
 Cys Phe Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ala Leu Leu Pro Ala Val Gln Ala
 165 170 175
 Gly Leu Ile Glu Pro Asp Val Ser Val Val Ser Ile Thr Gly Val Ser
 180 185 190
 Gly Ala Gly Lys Lys Ala Ser Val Ala Leu Leu Gly Ser Glu Thr Met
 195 200 205
 Gly Ser Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Ser Gly Lys His Arg His Thr Pro
 210 215 220
 Glu Ile Ala Gln Asn Leu Gly Glu Val Ser Asp Lys Pro Val Lys Val
 225 230 235 240
 Ser Phe Thr Pro Val Leu Ala Pro Leu Pro Arg Gly Ile Leu Thr Thr
 245 250 255
 Ala Thr Ala Pro Leu Lys Glu Gly Val Thr Ala Glu Gln Ala Arg Ala
 260 265 270
 Val Tyr Glu Glu Phe Tyr Ala Gln Glu Thr Phe Val His Val Leu Pro
 275 280 285
 Glu Gly Ala Gln Pro Gln Thr Gln Ala Val Leu Gly Ser Asn Met Cys
 290 295 300
 His Val Gln Val Glu Ile Asp Glu Glu Ala Gly Lys Val Leu Val Thr
 305 310 315 320

ES 2 655 764 T3

Ser Ala Ile Asp Asn Leu Thr Lys Gly Thr Ala Gly Ala Ala Val Gln
325 330 335

Cys Met Asn Leu Ser Val Gly Phe Asp Glu Ala Ala Gly Leu Pro Gln
340 345 350

Val Gly Val Ala Pro
355

- <210> 25
- <211> 388
- 5 <212> PRT
- <213> *Corynebacterium glutamicum*

- <400> 25

ES 2 655 764 T3

Met Ala Glu Lys Gly Ile Thr Ala Pro Lys Gly Phe Val Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala Gly Ile Lys Ala Ser Gly Asn Pro Asp Met Ala Leu Val
 20 25 30
 Val Asn Gln Gly Pro Glu Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Thr Arg Asn
 35 40 45
 Arg Val Phe Ala Ala Pro Val Lys Val Ser Arg Glu Asn Val Ala Asp
 50 55 60
 Gly Gln Ile Arg Ala Val Leu Tyr Asn Ala Gly Asn Ala Asn Ala Cys
 65 70 75 80
 Asn Gly Leu Gln Gly Glu Lys Asp Ala Arg Glu Ser Val Ser His Leu
 85 90 95
 Ala Gln Asn Leu Gly Leu Glu Asp Ser Asp Ile Gly Val Cys Ser Thr
 100 105 110
 Gly Leu Ile Gly Glu Leu Leu Pro Met Asp Lys Leu Asn Ala Gly Ile
 115 120 125
 Asp Gln Leu Thr Ala Glu Gly Ala Leu Gly Asp Asn Gly Ala Ala Ala
 130 135 140
 Ala Lys Ala Ile Met Thr Thr Asp Thr Val Asp Lys Glu Thr Val Val
 145 150 155 160
 Phe Ala Asp Gly Trp Thr Val Gly Gly Met Gly Lys Gly Val Gly Met
 165 170 175
 Met Ala Pro Ser Leu Ala Thr Met Leu Val Cys Leu Thr Thr Asp Ala
 180 185 190
 Ser Val Thr Gln Glu Met Ala Gln Ile Ala Leu Ala Asn Ala Thr Ala
 195 200 205
 Val Thr Phe Asp Thr Leu Asp Ile Asp Gly Ser Thr Ser Thr Asn Asp
 210 215 220
 Thr Val Phe Leu Leu Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Thr Pro Thr Gln
 225 230 235 240
 Asp Glu Leu Asn Asp Ala Val Tyr Ala Ala Cys Ser Asp Ile Ala Ala
 245 250 255

ES 2 655 764 T3

Lys Leu Gln Ala Asp Ala Glu Gly Val Thr Lys Arg Val Ala Val Thr
 260 265 270
 Val Val Gly Thr Thr Asn Asn Glu Gln Ala Ile Asn Ala Ala Arg Thr
 275 280 285
 Val Ala Arg Asp Asn Leu Phe Lys Cys Ala Met Phe Gly Ser Asp Pro
 290 295 300
 Asn Trp Gly Arg Val Leu Ala Ala Val Gly Met Ala Asp Ala Asp Met
 305 310 315 320
 Glu Pro Glu Lys Ile Ser Val Phe Phe Asn Gly Gln Ala Val Cys Leu
 325 330 335
 Asp Ser Thr Gly Ala Pro Gly Ala Arg Glu Val Asp Leu Ser Gly Ala
 340 345 350
 Asp Ile Asp Val Arg Ile Asp Leu Gly Thr Ser Gly Glu Gly Gln Ala
 355 360 365
 Thr Val Arg Thr Thr Asp Leu Ser Phe Ser Tyr Val Glu Ile Asn Ser
 370 375 380
 Ala Tyr Ser Ser
 385

<210> 26
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 26

5

ES 2 655 764 T3

Met Asn Asp Leu Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Val Arg Ala Asn Val
1 5 10 15
Leu Ala Glu Ala Leu Pro Trp Leu Gln His Phe Arg Asp Lys Ile Val
20 25 30
Val Val Lys Tyr Gly Gly Asn Ala Met Val Asp Asp Asp Leu Lys Ala
35 40 45
Ala Phe Ala Ala Asp Met Val Phe Leu Arg Thr Val Gly Ala Lys Pro
50 55 60
Val Val Val His Gly Gly Gly Pro Gln Ile Ser Glu Met Leu Asn Arg
65 70 75 80
Val Gly Leu Gln Gly Glu Phe Lys Gly Gly Phe Arg Val Thr Thr Pro
85 90 95
Glu Val Met Asp Ile Val Arg Met Val Leu Phe Gly Gln Val Gly Arg
100 105 110
Asp Leu Val Gly Leu Ile Asn Ser His Gly Pro Tyr Ala Val Gly Thr
115 120 125
Ser Gly Glu Asp Ala Gly Leu Phe Thr Ala Gln Lys Arg Met Val Asn
130 135 140
Ile Asp Gly Val Pro Thr Asp Ile Gly Leu Val Gly Asp Ile Ile Asn
145 150 155 160
Val Asp Ala Ser Ser Leu Met Asp Ile Ile Glu Ala Gly Arg Ile Pro
165 170 175
Val Val Ser Thr Ile Ala Pro Gly Glu Asp Gly Gln Ile Tyr Asn Ile
180 185 190
Asn Ala Asp Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ala Ala Ala Ile Gly Ala Glu
195 200 205
Arg Leu Leu Val Leu Thr Asn Val Glu Gly Leu Tyr Thr Asp Trp Pro
210 215 220
Asp Lys Ser Ser Leu Val Ser Lys Ile Lys Ala Thr Glu Leu Glu Ala
225 230 235 240
Ile Leu Pro Gly Leu Asp Ser Gly Met Ile Pro Lys Met Glu Ser Cys
245 250 255
Leu Asn Ala Val Arg Gly Gly Val Ser Ala Ala His Val Ile Asp Gly
260 265 270
Arg Ile Ala His Ser Val Leu Leu Glu Leu Leu Thr Met Gly Gly Ile
275 280 285
Gly Thr Met Val Leu Pro Asp Val Phe Asp Arg Glu Asn Tyr Pro Glu
290 295 300
Gly Thr Val Phe Arg Lys Asp Asp Lys Asp Gly Glu Leu
305 310 315

ES 2 655 764 T3

<210> 27
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

5

<400> 27

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

ES 2 655 764 T3

Ile Leu Ala Ala Val His Gly Phe His Gly Arg Thr Met Gly Ser Leu
130 135 140

Ala Leu Thr Gly Gln Pro Asp Lys Arg Glu Ala Phe Leu Pro Met Pro
145 150 155 160

Ser Gly Val Glu Phe Tyr Pro Tyr Gly Asp Thr Asp Tyr Leu Arg Lys
165 170 175

Met Val Glu Thr Asn Pro Thr Asp Val Ala Ala Ile Phe Leu Glu Pro
180 185 190

Ile Gln Gly Glu Thr Gly Val Val Pro Ala Pro Glu Gly Phe Leu Lys
195 200 205

Ala Val Arg Glu Leu Cys Asp Glu Tyr Gly Ile Leu Met Ile Thr Asp
210 215 220

Glu Val Gln Thr Gly Val Gly Arg Thr Gly Asp Phe Phe Ala His Gln
225 230 235 240

His Asp Gly Val Val Pro Asp Val Val Thr Met Ala Lys Gly Leu Gly
245 250 255

Gly Gly Leu Pro Ile Gly Ala Cys Leu Ala Thr Gly Arg Ala Ala Glu
260 265 270

Leu Met Thr Pro Gly Lys His Gly Thr Thr Phe Gly Gly Asn Pro Val
275 280 285

Ala Cys Ala Ala Ala Lys Ala Val Leu Ser Val Val Asp Asp Ala Phe
290 295 300

Cys Ala Glu Val Ala Arg Lys Gly Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Ala
305 310 315 320

Lys Val Asp Gly Val Val Asp Val Arg Gly Arg Gly Leu Met Leu Gly
325 330 335

Val Val Leu Glu Arg Asp Val Ala Lys Gln Ala Val Leu Asp Gly Phe
340 345 350

Lys His Gly Val Ile Leu Asn Ala Pro Ala Asp Asn Ile Ile Arg Leu
355 360 365

Thr Pro Pro Leu Val Ile Thr Asp Glu Glu Ile Ala Asp Ala Val Lys
370 375 380

Ala Ile Ala Glu Thr Ile Ala
385 390

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo modificado del género *Corynebacterium* que tiene aumentada la capacidad para producir putrescina, en el que la actividad de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 está debilitada o eliminada en comparación con la actividad endógena de la misma, y en el que la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) se ha introducido adicionalmente en el mismo.
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la ODC tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.
- 10 3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las actividades de uno o más de los seleccionados de entre el grupo que consiste carbamoil transferasa (ArgF) y exportador de glutamato (NCgl1221) están debilitadas adicionalmente en comparación con la actividad endógena de los mismos.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la ArgF tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y NCgl1221 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
- 15 5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las actividades de una o más de las seleccionadas de entre el grupo que consiste en acetil gama glutamil fosfato reductasa (ArgC), acetil glutamato sintasa u ornitina acetiltransferasa (ArgJ), acetil glutamato cinasa (ArgB), y acetil ornitina amino transferasa (ArgD) están aumentadas adicionalmente.
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que ArgC, ArgJ, ArgB y ArgD tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 25, 26, y 27, respectivamente.
- 20 7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad de la proteína está debilitada por 1) una eliminación parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína, 2) una reducción de la expresión del polinucleótido, 3) una modificación de la secuencia del polinucleótido del cromosoma para debilitar la actividad de la proteína o 4) una combinación de los mismos.
8. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, que es el *Corynebacterium glutamicum*.
- 25 9. Un procedimiento de producción de putrescina, que comprende el cultivo, para producir un cultivo celular, un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene un aumento de la capacidad para producir putrescina, en el que la actividad de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 está debilitada o eliminada en comparación con la actividad endógena de la misma, y el aislamiento de la putrescina del cultivo celular obtenido.
- 30 10. El procedimiento de producción de putrescina de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es el *Corynebacterium glutamicum*.

[Figura 1]

