

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 696**

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: **21.01.2013 PCT/KR2013/000487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13109121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2013 E 13738280 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2806022**

54 Título: **Microorganismo recombinante con productividad de putrescina mejorada, y procedimiento de producción de putrescina utilizando el mismo**

30 Prioridad:

**20.01.2012 KR 20120007004**

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

**21.09.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, KYOUNG MIN;  
KIM, SEON HYE;  
UM, HYE WON;  
KANG, MIN SUN;  
CHOI, SU JIN;  
JUNG, HEE KYOUNG;  
JHON, SUNG HOO;  
LI, HONGXIAN;  
GWAK, WON SIK;  
LEE, CHONG HO y  
YANG, YOUNG LYEOL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 682 696 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 con productividad de putrescina mejorada, y procedimiento de producción de putrescina utilizando el mismo

### Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a microorganismos recombinantes que tienen una capacidad mejorada para producir putrescina y un procedimiento para la 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 comúnmente por síntesis química mediante acrilonitrilo y succinonitrilo a partir de propileno. La síntesis química utiliza sustancias derivadas de petroquímicos como materiales de partida y utiliza químicos tóxicos, y por lo tanto no respeta el medio ambiente y tiene un problema de agotamiento de petróleo.

- 15 Con el fin de resolver estos problemas, se ha investigado mucho sobre el desarrollo de un procedimiento de biosíntesis de putrescina utilizando microorganismos, que es más cuidadosos con el medio ambiente y reduce el consumo de energía. De acuerdo con el conocimiento actual, la putrescina se puede biosintetizar mediante dos rutas. En una ruta, se produce ornitina a partir de glutamato y la ornitina se descarboxila para sintetizar putrescina. En la otra ruta, 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 utilizando un microorganismo diana que se transforma con las enzimas implicadas en las rutas sintéticas conocidas de putrescina. Por ejemplo, el documento WO 09/125924 desvela un procedimiento para la producción de putrescina con alto rendimiento inactivando la ruta implicada en la descomposición y utilización de putrescina 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 la ornitina. Un artículo publicado en 2010 desvela un procedimiento para la producción de putrescina a altas concentraciones introduciendo y aumentando la proteína que convierte la ornitina en putrescina en cepas de *Corynebacterium* que no son capaces de producir putrescina. Además, desvela un procedimiento de producción de putrescina a partir de arginina introduciendo arginina descarboxilasa y agmatinasa derivadas de *E. coli* en las cepas. A este respecto, la ruta ornitina producía una cantidad aproximadamente 50 veces mayor que la ruta de arginina (Schneider y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 88:4, 859-868, 2010).

### Divulgación

#### Problemas técnicos

En este escenario, los presentes inventores identificaron que la putrescina se puede producir con un alto rendimiento en un microorganismo del género *Corynebacterium* debilitando o eliminando la actividad de la proteína NCgl0101, completando de esta manera la presente invención.

#### Solución técnica

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* capaz de producir putrescina con alto rendimiento, que se modifica para que tenga una actividad de NCgl0101 debilitada, en comparación con la actividad endógena de la misma.

- 40 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción de putrescina utilizando el microorganismo.

#### Efecto ventajoso

- 45 Cuando el microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una capacidad mejorada para producir putrescina de la presente invención se utiliza para la producción de putrescina, se modifica para debilitar la actividad de NCgl0101 en comparación con la actividad endógena de la misma, se puede producir putrescina con alto rendimiento. En consecuencia, el microorganismo puede utilizarse ampliamente para la producción más eficaz de putrescina.

#### Descripción de las figuras

- 50 La FIG. 1 representa un diagrama esquemático que muestra las posiciones relativas de genes que codifican NCgl0100, NCgl0101, NCgl0102, NCgl0103 y NCgl0104, que están en el cromosoma de la cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 de tipo silvestre; y  
La FIG. 2 representa el resultado del ensayo de comparación de crecimiento entre las cepas recombinantes preparados en la presente invención, en el que se preparan 1, 2, 3, 4, 5 y 6 cepas introduciendo los pHC139T, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0100, pHC139T-P(CJ7)-tNCgl0100, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101, pHC139T-P(CJ7)-

NCgl0102-NCgl0103, y pHc139T-P(CJ7)-NCgl0104 en KCCM 11138P, respectivamente.

### **Mejor modo**

En un aspecto para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante de *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad de producir putrescina, en el que el microorganismo se ha modificado de manera que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, o la expresión de la misma, se modifica en el microorganismo para debilitar o eliminar la actividad de dicha proteína y el aumento de la producción de putrescina en comparación con la actividad de dicha proteína y la producción de putrescina en la misma cepa de microorganismo pero sin modificar, en el que la actividad de la proteína se debilita 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 en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína o 4) una combinación de los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "NCgl0101" significa una proteína que presenta la actividad de una enzima dependiente de un metal, que se expresan en *Corynebacterium glutamicum*, y cuya función no se conoce aun completamente. Incluye un dominio de unión al metal de la familia M20 de peptidasas o la proteína de utilización de glutamato de aminobenzoilo (AbgB). La AbgB de *E. coli* constituye la glutamato de aminobenzoilo hidrolasa con AbgA para hidrolizar el glutamato de aminobenzoilo a aminobenzoato y glutamato. El aminobenzoato se sabe que se utiliza como un precursor para la síntesis de folato, pero su relación con la productividad de putrescina no se conoce.

La proteína NCgl0101 de la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. Sin embargo, no se limita a estas, debido a que puede haber diferencia en la secuencia de aminoácidos de la proteína dependiendo de la especie o cepas del microbio. En otras palabras, puede ser una proteína mutante o variante artificial con una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, eliminación, inserción, o adición de uno o varios aminoácidos en una o más localizaciones de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, a condición de que ayude a aumentar la capacidad para producir putrescina por debilitamiento de la actividad de la proteína. En el presente documento, "varios" puede diferenciarse dependiendo de la localización o tipo en la estructura tridimensional de los restos de aminoácidos de la proteína, pero significa específicamente 2 a 20, específicamente 2 a 10, y más específicamente 2 a 5. Además, la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión del aminoácido incluye los producidos por variantes artificiales o mutación natural, basándose en la diferencia del individuo o especie del microorganismo.

El polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la presente invención puede comprender la secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, o la secuencia de aminoácidos con un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, y particularmente específicamente un 97 % o más de homología con la misma, a condición de que tenga una actividad similar que la proteína NCgl0101. Más específicamente, puede ser la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18.

El término "homología" se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos y puede determinarse por el procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, que utiliza BLAST 2.0 para computar los parámetros tales como valoración, identidad y similitud.

Además, la secuencia de polinucleótido que codifica la NCgl0101 de la presente invención se puede hibridar con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 16 o la sonda preparada de la misma en 'condiciones rigurosas', y puede ser una secuencia de polinucleótido modificada que codifica la proteína NCgl0101 que normalmente funciona. Como se utiliza en el presente documento, "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación específica entre el oligonucleótido, y se describen 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). Por ejemplo, se lleva a cabo la hibridación en el tampón de hibridación a 65 °C (3,5 x SSC, 0,02 % de Ficoll, 0,02 % de polivinilpirrolidona, un 0,02 % de albúmina sérica bovina, 2,5 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 transfiere el ADN se aclara con 2 x SSC a temperatura ambiente y después se aclara de nuevo con 0,1 a 0,5 x SSC/0,1 x SDS a una temperatura de 68 °C.

La actividad de la proteína NCgl0101 de la presente invención puede estar debilitado por 1) una eliminación parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína, 2) modificación de una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del polinucleótido, 3) una modificación de la secuencia de polinucleótido en el cromosoma o 4) una combinación de los mismos.

En lo anterior, se puede llevar a cabo una eliminación parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína sustituyendo el polinucleótido que codifica una proteína diana endógena en el cromosoma por un gen marcador o un polinucleótido cuya secuencia parcial se ha eliminado, con un vector para la inserción genética

cromosómica. La longitud de la eliminación “parcial” depende del tipo de polinucleótido, pero es específicamente de 2 pb a 200 pb, más específicamente de 100 pb a 100 pb, y más específicamente de 1 pb a 5 pb.

También, para disminuir la expresión del polinucleótido, se puede modificar una secuencia reguladora de la expresión induciendo mutaciones en la secuencia reguladora de la expresión mediante eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de la secuencia de nucleótidos o una combinación de la misma para debilitar adicionalmente la actividad de la secuencia reguladora de la expresión, o sustituyendo la secuencia reguladora de la expresión por una secuencia que tenga una actividad más débil. La secuencia reguladora de la expresión puede incluir una secuencia codificante de promotor, secuencia operadora, sitio de unión al ribosoma y la secuencia que controla la terminación de la transcripción o traducción.

Además, la secuencia de polinucleótido en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína se puede modificar induciendo mutaciones en la secuencia mediante 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, o sustituyendo la secuencia de polinucleótidos con la secuencia modificada que tiene una actividad de la proteína más débil.

Entre tanto, se puede modificar adicionalmente un microorganismo del género *Corynebacterium* que tenga una capacidad mejorada 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/o la actividad de la proteína (NCgl1221) implicada en la exportación de glutamato, en comparación con la actividad endógena de la misma. Además, se puede modificar el microorganismo del género *Corynebacterium* se puede modificar introduciendo adicionalmente la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC). También, se puede modificar adicionalmente el microorganismo del género *Corynebacterium* para mejorar la actividad de la acetil glutamato sintasa para convertir el glutamato a acetil glutamato, la actividad de la ornitina acetiltransferasa (ArgJ) para convertir la acetil ornitina a ornitina, la actividad de la acetil glutamato cinasa (ArgB) para convertir la acetil glutamato a acetil glutamil fosfato, la actividad de la acetil glutamil fosfato reductasa (ArgC) para convertir el acetil glutamil fosfato en acetil glutamato semialdehído, y/o la actividad de acetil ornitina amino transferasa (ArgD) para convertir el acetil glutamato semialdehído en acetil ornitina, en comparación con las actividades endógenas de los mismos, aumentando de esta manera la ruta biosintética de la ornitina, un precursor de putrescina (Sakanyan V y col., Microbiology. 142:1, 99-108, 1996).

En este caso, ArgF, NCgl1221, ODC, ArgC, ArgJ, ArgB y ArgD pueden tener, pero no se limitan a, las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, respectivamente, o las secuencias de aminoácidos con un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, y más específicamente un 97 % o más de homología con las mismas.

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 (5'-fosfato de piridoxal, PLP) como coenzima. La ODC se encuentra en la mayoría de las bacterias Gram-negativas y se pueden encontrar en algunas de las bacterias intestinales tales como bacterias Gram-negativas de *Lactobacillus*. La *E. coli* tiene dos tipos de genes que codifican la ODC, uno de los cuales, speC, se expresa continuamente a cierta concentración y el otro, speF, se expresa en condiciones específicas (en presencia de ornitina con mayores de ciertas concentraciones y pH bajo). Dependiendo de las especies, algunas especies, como *E. coli*, tiene 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.* tiene dos tipos de ODC (speC, speF), y las cepas de *Yersinia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Erwinia sp.*, tiene un tipo de ODC (speC). En el caso de *Lactobacillus*, se expresa ODC en un tipo de gen (speF), y se sabe que se induce su expresión en condiciones de bajo pH o con abundante ornitina e histidina.

La actividad de ODC se puede introducir en el microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* de la presente invención utilizando genes que codifican ODC derivados de distintas especies. El polinucleótido que codifica la ODC puede incluir, pero no se limita a, el polinucleótido que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22 y la secuencia de aminoácido con un 70 % o más, específicamente un 80 % o más, más específicamente un 90 % o más de homología con la misma.

Además, la introducción de la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) en los microorganismos se puede llevar a cabo por los distintos procedimientos bien conocidos en la técnica; por ejemplo, el procedimiento para insertar el polinucleótido incluyendo una secuencia de nucleótidos que codifica la ODC en el cromosoma, el procedimiento para introducir el polinucleótido en los microorganismo introduciéndolo en el sistema de vector, el procedimiento para insertar un promotor que está modificado o tiene actividad mejorada en la región superior de la secuencia de nucleótidos que codifica la ODC, y el procedimiento para insertar la mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ODC. Más específicamente, si se introduce la secuencia de nucleótidos que codifica la ODC, se puede utilizar un promotor CJ7 conocido como promotor para controlar la expresión de la misma.

Además, la mejora de la actividad de ArgC, ArgJ, ArgB, y ArgD se pueden 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 de polinucleótido que codifica la

enzima en el cromosoma 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 del polinucleótidos de la célula huésped se puede aumentar introduciendo un vector que sea capaz de replicarse y funcionar independientemente, al que está unido operativamente el polinucleótido que codifica la enzima de la presente invención, o introduciendo el vector capaz de insertar el polinucleótido en el cromosoma de la célula huésped, al que está unido operativamente el polinucleótido.

Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a la construcción de ADN que comprende la secuencia del polinucleótido que codifica la proteína diana unida 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, cualquier secuencia operadora para controlar la transcripción, la secuencia que codifica ARNm apropiado del sitio de unión al ribosoma, y la secuencia de control de la terminación de la transcripción y la traducción. El vector se puede transfectar en un huésped adecuado, y después se puede replicar o funcionar independientemente del genoma del huésped, y se puede integrar en el propio genoma.

En la presente invención, se puede utilizar cualquier vector que se conozca en la técnica, sin ninguna limitación, a condición de que se pueda replicar en el huésped. Ejemplos de vectores utilizados comúnmente son los plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos en su estado natural o estado recombinante. Por ejemplo, se pueden utilizar pWE15, M13,  $\lambda$ MBL3,  $\lambda$ MBL4,  $\lambda$ XII,  $\lambda$ ASHIII,  $\lambda$ APII,  $\lambda$ t10,  $\lambda$ t11, Charon4A, y Charon21A como fagos vectores o cósmidos vectores, y se pueden utilizar como vectores plasmídicos el sistema pBR, sistema pUC, sistema pBluescriptII, sistema pGEM, sistema pTZ, el sistema pCL y el sistema pET. El vector que se puede utilizar en la presente invención no está limitado particularmente y se pueden utilizar los vectores de expresión conocidos. Específicamente, se pueden utilizar los vectores pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCCIBAC. Más específicamente, se pueden utilizar los vectores pACYC177, pCL, pCCIBAC.

Además, el vector que puede insertar el polinucleótido que codifica la proteína diana en el cromosoma de una célula huésped puede ser específicamente, por ejemplo, un vector lanzadera, pECCG112 (Publicación de Patente Coreana N.º 1992-000933) que es capaz de replicarse por sí mismo en *E. coli* y bacterias de *Corynebacterium*, pero no se limita a este.

Además, el polinucleótido que codifica la proteína dina en el cromosoma se puede reemplazar por un nuevo polinucleótido utilizando un vector para la inserción genética en el cromosoma. La inserción del polinucleótido en el cromosoma se puede conseguir por cualquier procedimiento 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, se puede incluir adicionalmente un marcador de selección para confirmar una inserción genética satisfactoria en el cromosoma. El marcador de selección es para explorar las células que se han transformado con el vector, en otras palabras, para determinar si se ha insertado el polinucleótido diana. Se pueden utilizar marcadores que proporcionan fenotipos seleccionables tales como resistencia a fármacos, auxotrofia, resistencia a agentes tóxicos o proteínas de expresión en la superficie. En un ambiente tratado con un agente selectivo, solo pueden sobrevivir las células que expresan el marcador de selección o las células que presentan un fenotipo distinto, y por tanto las células transformadas satisfactoriamente se pueden seleccionar mediante este procedimiento.

Como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la introducción del vector que comprende un polinucleótido que codifica la proteína diana en la célula huésped de manera que la proteína se puede expresar en la célula. El polinucleótido transformado incluye todo polinucleótido que codifica proteínas diana que se puedan expresar en la célula huésped independientemente de la localización, sea si se inserta en el cromosoma de la célula huésped o se localice fuera del cromosoma. Además, el polinucleótido incluye un ADN y ARN que codifican la proteína diana. El polinucleótido se puede introducir de cualquier manera a condición de que se pueda introducir y expresar en la célula huésped. 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 normalmente incluye 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 vector de expresión capaz de auto-replicación. Además, el polinucleótido se puede introducir en una célula huésped en su propia forma 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 en la transcripción del polinucleótido que codifica la proteína diana y el polinucleótido.

Además, el procedimiento 2) modificación de la secuencia reguladora de la expresión para aumentar la expresión del polinucleótido en la presente invención se puede llevar a cabo induciendo la mutación de la secuencia mediante eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de la secuencia de nucleótidos o una combinación de las mismas, o por sustitución por la secuencia de nucleótidos con actividad mejorada. La secuencia

reguladora de la expresión incluye, el promotor, la secuencia operadora, la secuencia de los sitios de unión al ribosoma, y la secuencia que controla la terminación de la transcripción y traducción.

Se puede unir un fuerte promotor heterólogo en la zona superior de la unidad de expresión del polinucleótido en vez de promotores originales. Un ejemplo de un promotor fuerte es el promotor pcj7, el promotor lysCP1, el promotor EF-Tu, el promotor groEL, el promotor aceA o el promotor aceB, etc., y más específicamente el promotor lysCP1 o el promotor pcj7 derivados de *Corynebacterium* está unido operativamente para aumentar la expresión del polinucleótido que codifica la enzima. En el presente documento el promotor lysCP1, que 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 suficientemente fuerte para aumentar la actividad de la enzima correspondiente unas 5 veces en comparación con el tipo silvestre mediante el aumento de expresión del gen de aspartato cinasa (Publicación de Patente Internacional N.º 2009-096689). Además, se identificó que el promotor pcj7 se expresaba en *Corynebacterium ammoniagenes* y *Escherichia* y que tenía una actividad promotora fuerte, y se puede expresar en *Corynebacterium glutamicum* también con alta intensidad (Patente coreana N.º 0620092).

Además, se puede llevar a cabo el procedimiento 3) modificación de la secuencia de polinucleótido sobre el cromosoma, pero no se limita específicamente a, inducir la mutación de la secuencia mediante eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora de la secuencia de nucleótidos una combinación de las mismas para aumentar la actividad de la secuencia, o por sustitución con la secuencia de nucleótidos que tiene aumentada la actividad.

El microorganismo de la presente invención, que es un microorganismo que tiene la capacidad para producir putrescina, incluye microorganismos procariontes, en los que la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19 se expresa 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 específicamente el microorganismo del género *Corynebacterium* y puede ser más específicamente el *Corynebacterium glutamicum*.

En una realización de la presente invención, se modifica el microorganismo del género *Corynebacterium* de N.º de acceso KCCM 11138P (Patente coreana abierta a inspección N.º 2012-0064046) que tiene la capacidad para producir putrescina en una alta concentración mediante una ruta de biosíntesis de putrescina mejorada. Específicamente, la cepa KCCM 11138P productora de putrescina es la cepa de sobre-producción de putrescina, en la que el gen que codifica la ornitina carbamoil transferasa (ArgF) para la acumulación de ornitina y el gen que codifica el exportador de glutamato (NCgl1221) de aumento de glutamato intracelular se eliminan de las cepas ATCC 13032, se introduce el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (speC), y se aumenta el nivel de los genes de biosíntesis de ornitina (argCJBD). Por lo tanto, en el microorganismo de acuerdo con la invención, se puede introducir adicionalmente la actividad de la ornitina descarboxilasa (speC) al mismo.

En otra realización de la presente invención, se modificó la cepa DAB12-a productora de putrescina basada en el *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. La cepa ATCC 13869 se basaba en el mismo genotipo que la KCCM 11138P, que es la cepa productora de putrescina basada en el *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Específicamente la cepa DAB12-a es a partir de la cepa ATCC 13869 obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en la que el gen que codifica la ornitina carbamoil transferasa (ArgF) y el gen que codifica la proteína NCgl1221 para exportar glutamato se han eliminado, el gen (speC) que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC) derivado de *E. coli* se ha introducido, y el promotor del operón genético de biosíntesis de ornitina (argCJBD) se ha reemplazado por el promotor mejorado.

De acuerdo con una realización de la presente invención, un microorganismo del género *Corynebacterium* (KCCM 11138P) tiene la capacidad de producir putrescina, que se prepara por eliminación del gen que codifica la ornitina carbamoil transferasa (ArgF) y el gen que codifica el exportador de glutamato (NCgl1221) implicado en la exportación de glutamato, la sustitución del promotor propio del agrupamiento genético ArgCJBD que codifica una enzima implicada en la síntesis de ornitina a partir de glutamato, y la introducción del gen (speC) que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC) en el cromosoma del *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 de tipo silvestre. Basándose en el KCCM 11138P, se seleccionó un clon (A15) que crecía bien en un medio que contenía alta concentración de putrescina, y se confirmó que el A15 seleccionado incluía los genes que codifican NCgl0100, NCgl0101, NCgl0102, NCgl0103 and NCgl0104 (Ejemplo 1). Además, el microorganismo crecía en el medio que contenía una alta concentración de putrescina debido al gen que codifica NCgl0101 entre los cinco tipos de genes (Ejemplo 2). Con respecto a la caracterización del gen que codifica NCgl0101, se confirmó que la producción de putrescina estaba reducida en una cepa en la que el gen que codifica NCgl0101 está sobre-expresado (Ejemplo 3). y la producción de putrescina estaba aumentada en una cepa en la que el gen que codifica NCgl0101 se ha eliminado (Ejemplo 4).

En consecuencia, los presentes inventores llamaron a la cepa de *Corynebacterium glutamicum* que tenía un aumento de la capacidad para producir putrescina, que se prepara eliminando el gen NCgl0101 en la cepa KCCM

11138P productora de putrescina, como el *Corynebacterium* CC01-0244, y se depositó en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (de aquí en adelante, abreviado como "KCCM") el 26 de Dic de 2011, con el N.º de acceso KCCM 11241P.

5 En otro aspecto de la presente invención, para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de putrescina, que comprende el cultivo, para producir un caldo de cultivo celular, un microorganismo de *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que el microorganismo se ha modificado de manera que una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, o la expresión de la misma, se ha modificado en el microorganismo para debilitar o eliminar la actividad de dicha proteína y aumento de la producción de putrescina en comparación con la actividad de dicha proteína y producción de putrescina en la misma cepa del microorganismo pero sin modificar, en el que la actividad de la proteína se debilita 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 de polinucleótido en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína o 4) una combinación de los mismos; y el aislamiento de la proteína del caldo de cultivo celular obtenido.

15 El procedimiento de cultivo en la presente invención se puede llevar a cabo en un medio y en condiciones de cultivos apropiados conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente y utilizar el procedimiento de cultivo dependiendo de las cepas seleccionadas. Un ejemplo del procedimiento de cultivo incluye cultivos tipo discontinuo, continuo y semicontinuo, pero no se limita a estos. El medio de cultivo puede tener que satisfacer apropiadamente las necesidades de una cepa específica.

20 El medio de cultivo puede tener que satisfacer apropiadamente las necesidades de las cepas específicas. Los medios de cultivo para distintos microorganismos se desvelan (por ejemplo, en "Manual of Methods for General Bacteriology" from American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)). Como fuente de carbono en el medio se puede utilizar, azúcar y carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón y celulosa), grasa butírica y grasa (por ejemplo, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de maní y aceite de coco), ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcohol (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 puede utilizar un compuesto orgánico que contenga nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz, harina en polvo de soja y urea) o un compuesto inorgánico (por ejemplo, sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico y nitrato amónico) y estas sustancias pueden utilizarse también individualmente o como una mezcla. Como fuente de fósforo, se puede utilizar fosfato potásico dihidrógeno o fosfato dipotásico hidrogeno o la sal que contiene sodio correspondiente. Además, el medio de cultivo puede comprender una sal metálica (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro) que son esenciales para el crecimiento, y finalmente, se pueden utilizar sustancias promotoras del crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas además de las sustancias mencionadas anteriormente. El precursor adecuado se puede añadir además al medio de cultivo. La sustancia alimentaria se puede proporcionar en el cultivo enseguida o adecuadamente mientras se cultiva.

35 El pH del cultivo se puede ajustar mediante un compuesto básico apropiado (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico o amoniaco) o un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico). Se puede ajustar la formación de espuma mediante un agente antiespumante tal como un éster poliglicólico de ácido graso. La condición aeróbica del cultivo se puede mantener introduciendo oxígeno o mezclas de gases que contengan oxígeno, por ejemplo, aire. La temperatura de cultivo puede ser normalmente de 20 a 45 °C, específicamente de 25 a 40 °C. El cultivo puede continuar hasta que la producción de putrescina alcance un máximo deseado, que se puede conseguir normalmente en 10 a 160 horas. La putrescina puede liberarse en el medio de cultivo, o estar contenida en la célula.

45 Para el procedimiento de recolección y recuperación de la putrescina producida en el procedimiento de cultivo de la presente invención, se puede recuperar la sustancia diana a partir del medio de cultivo utilizando el procedimiento apropiado conocido en la técnica dependiendo del procedimiento de cultivo, por ejemplo, un tipo de cultivo discontinuo, continuo o semicontinuo.

### **Modo para la invención**

50 De aquí en adelante, la invención se describirá en más de detalle con los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solo con fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

#### **Ejemplo 1: Preparación de la biblioteca para la selección de genes eficaces para la biosíntesis de putrescina y selección de clones**

55 En el fin de explorar genes eficaces para la biosíntesis de putrescina a partir del cromosoma de la cepa de *Corynebacterium* de tipo silvestre, se preparó una biblioteca del cromosoma de la cepa de *Corynebacterium* de tipo silvestre. En detalle, el cromosoma extraído del *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 de tipo silvestre se escindió aleatoriamente con la enzima de restricción Sau3AI, y se seleccionaron del mismo, fragmentos de 5 a 8 kb, y después se clonaron en un vector lanzadera de *E. coli-Corynebacterium* pECCG122 (Patente coreana abierta a inspección N.º 1992-0000933) para preparar una biblioteca del cromosoma.

Con el fin de seleccionar genes eficaces para la biosíntesis de putrescina de la biblioteca cromosómica de *Corynebacterium* así preparada, se obtuvieron colonias que crecían en un medio que contenía una alta concentración de putrescina.

Entre tanto, se introdujeron las bibliotecas en un microorganismo del género *Corynebacterium* (KCCM 11138P) que tenía una capacidad de producir putrescina, para preparar de esa manera cada uno de los transformantes. Se seleccionaron los transformantes que eran capaces de crecer en un medio mínimo que contenía 0,35 M de putrescina (10 g/l de glucosa, 0,4 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 4 g/l de  $NH_4Cl$ , 1 g/l de  $KH_2PO_4$ , 1 g/l de  $K_2HPO_4$ , 2 g/l de urea, 10 mg/l de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 mg/l de  $MnSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 5 mg/l de nicotinamida, 5 mg/l de hidrocloreto de tiamina, 0,1 mg/l de biotina, 1 mM de arginina, 25 mg/l de kanamicina, 0,35 M de putrescina, pH 7,0). La cepa KCCM 11138P se desvela en una patente solicitada por los presentes inventores (Patente coreana abierta a inspección N.º 2012-0064046), que se preparó eliminando los genes que codifican la ornitina carbamoil transferasa (argF) y el exportador de glutamato (NCgl1221) en el cromosoma de la cepa ATCC 13032 de *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre, introduciendo un gen (speC) que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC) derivado de una cepa W3110 de *E. coli* de tipo silvestre en el cromosoma, y sustituyendo el promotor del agrupamiento genético argCJBD que codifica la enzima implicada en la síntesis de ornitina a partir de glutamato, para preparar de esta manera cada uno de los transformantes. Como resultado se seleccionaron 275 colonias, y las colonias que crecían bien en el medio que contenía una alta concentración de putrescina se identificaron secundariamente. Cada clon de la biblioteca se obtuvo y se introdujo de nuevo en la cepa de putrescina. A continuación, se identificaron las colonias que crecían bien en el medio que contenía una alta concentración de putrescina y de esta manera finalmente se seleccionó un clon (A15). Este clon seleccionado se identificó por secuenciación. Como resultado, se confirmó que el clon comprendía un total de 5 ORF de NCgl0100, NCgl0101, NCgl0102, NCgl0103 y NCgl0104, de los cuales se eliminaron 436 aminoácidos del extremo N (FIG. 1). La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra las posiciones relativas de genes que codifican NCgl0100, NCgl0101, NCgl0102, NCgl0103 y NCgl0104, que están en el cromosoma de la cepa ATCC 13032 del *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre.

## 25 Ejemplo 2. Identificación de los genes eficaces para la síntesis de putrescina en el clon A15

### Ejemplo 2-1: Clonación de 5 genes del clon A15 y preparación de un transformante

La secuencia de nucleótidos del clon A15 obtenida en el Ejemplo 1 ya se conocía. Basándose en la secuencia de nucleótidos de la cepa ATCC 13032 previamente informada, se construyeron NCgl0100-F y NCgl0100-R representados por las SEQ ID NO: 1 y 2 como cebadores para la amplificación del gen NCgl0100, NCgl0100-R y tNCgl0100-F representados por la SEQ ID NO: 2 y 3 como cebadores para la amplificación del gen tNCgl0100 del que se habían eliminado 436 aminoácidos del extremo N, NCgl0101-F y NCgl0101-R representados por las SEQ ID NO: 4 y 5 como cebadores para la amplificación del gen NCgl0101, NCgl0102-F y NCgl0103-R representados por las SEQ ID NO: 6 y 7 como cebadores para la amplificación de los genes NCgl0102 y NCgl0103, y NCgl0104-F y NCgl0104-R representados por las SEQ ID NO: 8 y 9 como cebadores para la amplificación del gen NCgl0104. Además, se construyeron P(CJ7)-F y P(CJ7)-R representados por las SEQ ID NO: 10 y 11 como cebadores para la amplificación del promotor P(CJ7) (o pcj7) (Patente coreana N.º 10-0620092) (Tabla 1).

A continuación, se llevó a cabo la PCR utilizando el cromosoma de la cepa ATCC 13032 como matriz y cada uno de los cebadores representados por las SEQ ID NO: 1 a 9 (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto ~ 1 minuto 30 segundos, 25 ciclos), para amplificar de esta manera 5 tipos de fragmentos genéticos. Además, se llevó a cabo la PCR utilizando en cromosoma de *Corynebacterium ammoniagenes* como matriz y los cebadores representados por las SEQ ID NO: 10 y 11 para amplificar de esta manera el fragmento de promotor.

Se ligaron 5 genes escindidos con XpnI y XbaI, y se escindió el promotor CJ7 con EcoRV y KpnI en un vector de expresión pHC139T (Patente coreana N.º 10-0860932) escindido con EcoRV y XbaI, para preparar de esta manera un total de 5 tipos de vectores de expresión pHC139T-P(CJ7)-NCgl0100, pHC139T-P(CJ7)-tNCgl0100, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0102-NCgl0103, y pHC139T-P(CJ7)-NCgl0104.

[Tabla 1]

Cebadores para la preparación de cepas que expresan 5 genes contenidos en el clon A15	
NCgl0100-F (SEQ ID NO: 1)	GCGCAT ATGAGCTCAACAACCTCAAAAACC
NCgl0100-R (SEQ ID NO: 2)	GCGTCTAGA TTATCCTTCGAGGAAGATCGCAG
tNCgl0100-F (SEQ ID NO: 3)	GCGCAT ATGTGGACGCTGATGGCTGC
NCgl0101-F (SEQ ID NO: 4)	GCGCAT ATGAGTACTGACAATTTTTCTCCAC
NCgl0101-R (SEQ ID NO: 5)	GCGTCTAGA CTAAGCCAAATAGTCCCCTAC
NCgl0102-F (SEQ ID NO: 6)	GCGCAT ATGGATGAACGAAGCCGTTTG

(continuación)

Cebadores para la preparación de cepas que expresan 5 genes contenidos en el clon A15	
NCgl0103-R (SEQ ID NO: 7)	GCGTCTAGATTAATCAATGAAGACGAATACAATTCC
NCgl0104-F (SEQ ID NO: 8)	GCGCATATGGCGGGTGACAAATTGTGG
NCgl0104-R (SEQ ID NO: 9)	GCGTCTAGATTAGGACAGTTCCGCTGGAGC
P(CJ7)-F (SEQ ID NO: 10)	CAGATATCGCCGGCATAGCCTACCGATG
P(CJ7)-R (SEQ ID NO: 11)	GCGTCTAGAGATATCAGTGTTCCTTTTCG

Se introdujeron los 5 tipos de vectores de expresión así preparados y un grupo de control pHC139T en la cepa KCCM 11138P del Ejemplo 1 por electroporación, y entonces se diseminaron en placas BHIS que contenían 25 µg/ml de kanamicina para seleccionar los transformantes.

### Ejemplo 2-2: Búsqueda de genes eficaces para putrescina

Del total de 6 tipos de transformantes obtenidos en el Ejemplo 2-1, se seleccionaron los transformantes que crecían bien en el medio que contenía una alta concentración de putrescina de la misma manera que en el Ejemplo 1 (FIG. 2). La FIG. 2 es el resultado del ensayo de la comparación del crecimiento entre los transformantes preparados en la presente invención, en los que 1, 2, 3, 4, 5 y 6 representan las cepas introducidas con los 6 tipos de vectores de expresión, pHC139T, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0100, pHC139T-P(CJ7)-tNCgl0100, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101, pHC139T-P(CJ7)-NCgl0102-NCgl0103 y pHC139T-P(CJ7)-NCgl0104, presentaban un crecimiento excelente en el medio que contenía una alta concentración de putrescina, y así se seleccionó el NCgl0101 como gen eficaz para la biosíntesis de putrescina.

### Ejemplo 3: Evaluación de la capacidad para producir putrescina en la cepa que sobre-expresa NCgl0101

Se evaluó la capacidad para producir putrescina de la cepa que sobre-expresa el gen NCgl0101 que se identificó como el gen eficaz en el Ejemplo 2. Se preparó una cepa para la evaluación introduciendo el pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101 en la cepa productora de putrescina KCCM 11138P.

El pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101 preparado en el Ejemplo 2-1 y el vector pHC139T como grupo de control se introdujeron en la cepa KCCM 11138P productora de putrescina por electroporación, y entonces se diseminó en placas BHIS que contenían 25 µg/ml de kanamicina para seleccionar transformantes. Los transformantes se denominaron KCCM 11138P/pHC139T, y KCCM 11138P/pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101, respectivamente. Estos dos transformantes seleccionados de esta manera se cultivaron en placas CM que contenían 1 mM de arginina (un 1 % de glucosa, un 1 % de polipeptona, un 0,5 % de extracto de levadura, un 0,5 % de extracto de carne, un 0,25 % de NaCl, un 0,2 % de urea, 100 µl de NaOH al 50 %, un 2 % de agar, pH 6,8 por litro) a 30 °C durante 24 horas, y después se inoculó un asa de cultivo celular en 25 ml de medio de titulación de la Tabla 2 que contenía 25 µg/ml de kanamicina, 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 2]

Composición	Concentración (por 1 l)
Glucosa	8 %
Proteína de soja	0,25 %
Sólidos de macerado de maíz	0,5 %
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 %
Urea	0,15 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 %
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,05 %
Biotina	100 µg
Hidrocloruro de tiamina	3000 µg
Calcio-ácido pantoténico	3000 µg

(continuación)

Composición	Concentración (por 1 l)
Nicotinamida	3000 µg
CaCO <sub>3</sub>	5 %

Como resultado, como se muestra en la Tabla 3, cuando se sobre-expresaba el NCgl0101, la producción de putrescina se reducía.

5

[Tabla 3]

Tipo de cepa	Putrescina (g/L)
KCCM 11138P/pHC139T	9,5
KCCM 11138P/pHC139T-P(CJ7)-NCgl0101	5,1

#### Ejemplo 4: Evaluación de la capacidad para producir putrescina en la cepa con NCgl0101 eliminado

##### Ejemplo 4-1: Preparación de la cepa con NCgl0101 eliminado en la cepa productora de putrescina basada en ATCC 13032

10 La sobre-expresión de NCgl0101 aumentaba el crecimiento celular en el medio que contenía una alta concentración de putrescina, pero disminuía la producción de putrescina de acuerdo con el Ejemplo 3. Basándose en este resultado, se examinó el efecto de la eliminación de NCgl0101 sobre la capacidad para producir putrescina.

15 En detalle, basándose en la secuencia de nucleótidos del NCgl0101 de la cepa ATCC 13032, se construyeron NCgl0101-del-F1\_BamHI y NCgl0101-del-R1\_Sall representados por las SEQ ID NO: 12 y 13 como cebadores para obtener un fragmento recombinante homólogo de la región terminal de NCgl0101. Se construyeron NCgl0101-del-F2\_Sall y NCgl0101-del-R2\_XbaI representados por las SEQ ID NO: 14 y 15 como cebadores para obtener un fragmento recombinante homólogo de la región del extremo C de NCgl0101 (Tabla 4). Los fragmentos de las regiones del extremo N y el extremo C del gen NCgl0101 se prepararon por PCR utilizando los dos pares de cebadores. Los productos de la PCR se trataron con BamHI y Sall y Sall y XbaI, respectivamente y se clonaron en un vector pDZ tratado con BamHI y XbaI. El plásmido clonado se denominó pDZ-NCgl0101(K/O).

20

[Tabla 4]

Cebadores para la preparación de cepas con NCgl0101 eliminados	
NCgl0101-del-F1_BamHI (SEQ ID NO: 12)	CGGGATCC CGGATTCCTGCGATCATTG
NCgl0101-del-R1_Sall (SEQ ID NO: 13)	ACGCGTCGAC CAGTCGACGGAACCTGTGGAG
NCgl0101-del-F2_Sall (SEQ ID NO: 14)	ACGCGTCGAC GGCAACGACTCCGAAACCTTC
NCgl0101-del-R2_XbaI (SEQ ID NO: 15)	CTAGTCTAGA CTGGATCCTCATGAATGCGC

25 El vector pDZ-NCgl0101(K/O) preparado para la obtención de la cepa KCCM 11138P ΔNCgl0101 se introdujo en una cepa KCCM 11138P por electroporación, y entonces se dispersó en la placa BHIS que contenía 25 µg/ml de kanamicina. La inserción satisfactoria del vector en el cromosoma se confirmó observando si la colonia era azul en el medio sólido que contenía X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido). El cromosoma primario de la cepa insertada se cultivó con agitado (30 °C, 8 horas), se diluyó entonces de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-10</sup>, y se diseminó en el medio sólido que contenía X-gal. Aunque la mayoría de las colonias aparecían como colonias azules, una baja proporción de colonias apareció como colonias blancas. Las cepas con el gen NCgl0101 eliminado se seleccionaron finalmente por doble cruzamiento con las colonias blancas, y se identificaron por PCR utilizando los cebadores representados por las SEQ ID NO: 12 y 15. La variante así identificada se denominó KCCM 11138P ΔNCgl0101.

30

##### Ejemplo 4-2: Preparación de la cepa con el NCgl0101 eliminado en la cepa productora de putrescina basada en 13869

35 La cepa DAB12-a (cepa con argF eliminado, NCgl1221 eliminado, con speC de *E. coli* introducido, y operón arg-promotor argCJBD sustituido) productora de putrescina basada en el *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, que tiene el mismo genotipo que la cepa productora de putrescina KCCM 11138P basada en el *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, se utilizó para preparar cepas con el NCgl0101 eliminado.

En detalle, con el fin de identificar el gen que codifica NCgl0101 derivado de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 y la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada a partir de este, se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 como matriz y un par de cebadores, SEQ ID NO: 12 y 15 (NCgl0101-del-F1\_BamHI, NCgl0101-del-R2\_XbaI). Aquí, la reacción de PCR se llevó a cabo con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 53 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos y 30 segundos. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis y se analizaron sus secuencias. Mediante el análisis de secuencia, se identificó que el gen que codifica la NCgl0101 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 incluye una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 18 y la proteína codificada de esta manera incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19. Cuando se compararon las secuencias de aminoácidos de NCgl0101 derivadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y las de la NCgl0101 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, presentaban una homología del 98 %.

Con el fin de eliminar el gen que codifica NCgl0101 derivado del *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, se amplificaron la región del extremo N y el extremo C del gen NCgl0101 por PCR utilizando un ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 como matriz y dos pares de cebadores enumerados en la Tabla 4 de la misma manera que en el Ejemplo <4-1>. Después, se trataron los productos de la PCR con BamHI y Sall y con Sall y XbaI, respectivamente y entonces se clonaron en el vector pDZ tratado con BamHI y XbaI, construyendo de esta manera el plásmido pDZ-2'NCgl0101(K/O).

El plásmido pDZ-2'NCgl0101(K/O) se transformó en el *Corynebacterium glutamicum* DAB12-a de la misma manera que en el Ejemplo <4-1>, y se seleccionó la cepa en la que se eliminó el gen que codifica NCgl0101. La variante de *Corynebacterium glutamicum* seleccionada se denominó DAB12-a ΔNCgl0101.

#### Ejemplo 4-3: Evaluación de la capacidad para producir putrescina en la cepa con NCgl0101 eliminado

Con el fin de investigar el efecto de la eliminación de NCgl0101 sobre la capacidad para producir putrescina en la cepa productora de putrescina, se compararon las variantes de *Corynebacterium glutamicum* preparadas en los Ejemplos <4-1> y <4-2>.

En detalle, la capacidad de producción de putrescina en dos tipos de variantes de *Corynebacterium glutamicum* (KCCM 11138P ΔNCgl0101 y DAB12-a ΔNCgl0101) se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo 3. como se muestra en la Tabla 5 siguiente, se descubrió que la producción de putrescina aumentaba por la eliminación de NCgl0101.

[Tabla 5]

Tipo de cepa	Putrescina (g/l)
KCCM 11138P	9,8
KCCM 11138P ΔNCgl0101	11,3
DAB12-a	10,1
DAB12-a ΔNCgl0101	11,0

En conjunto, los resultados de los Ejemplos 3 y 4 demuestran que la producción de putrescina disminuía por sobreexpresión del gen que codifica NCgl0101 y aumentaba por eliminación del gen en la cepa de *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre, indicando que NCgl0101 afecta directamente la biosíntesis de putrescina.

En consecuencia, los presentes inventores denominaron a la cepa de *Corynebacterium glutamicum* que tiene una capacidad mejorada para producir putrescina, que se preparó eliminando el gen NCgl0101 en la cepa KCCM 11138P productora de putrescina en el Ejemplo anterior, como *Corynebacterium glutamicum* CC01-0244, y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (de aquí en adelante, abreviado como "KCCM") que es una autoridad depositaria internacional bajo el Tratado de Budapest el 26 de Dic de 2011, con el N.º de acceso KCCM 11241P.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismos que tienen un aumento de productibilidad de putrescina y procedimiento para la producción de putrescina utilizándolos

<130> OPA12195PCT

<150> KR 10-2012-0007004

<151> 20-01-2012

<160> 26

<170> KopatentIn 2.0

5 <210> 1  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 1  
gcgcatatga gctcaacaac ctcaaaaacc 30

15 <210> 2  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 2  
gcgcttagat tatccttoga ggaagatcgc ag 32

25 <210> 3  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador

35 <400> 3  
gcgcatatgt ggacgctgat ggctgc 26

<210> 4  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Cebador

45 <400> 4  
gcgcatatga gtactgacaa ttttctcca c 31

50 <210> 5  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador

<400> 5  
gcgcttagac taagccaaat agtcccctac 30

60 <210> 6  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Cebador  
 <400> 6  
 ggcgatatgg atgaacgaag ccggtttg 28  
 5  
 <210> 7  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
 ggcgtctagat taatcaatga agacgaatac aattcc 36  
 15  
 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 ggcgatatgg cgggtgacaa attgtgg 27  
 25  
 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 9  
 gcgtctagat taggacagtt ccgctggagc 30  
 35  
 <210> 10  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 10  
 cagatatgc cggcatagcc taccgatg 28  
 45  
 <210> 11  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 11  
 ggcgtctagag atatcagtg ttcctttcg 29  
 60  
 <210> 12  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 12  
 5 cgggatcccg gattccctgc gatcattg 28  
  
 <210> 13  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 13  
 acgcgtcgac cagtcgacgg aacttgtaga g 31  
  
 <210> 14  
 <211> 31  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 14  
 acgcgtcgac ggcaacgact ccgaaacctt c 31  
  
 <210> 15  
 30 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Cebador  
  
 <400> 15  
 ctagtctaga ctggatcctc atgaatgcgc 30  
  
 40 <210> 16  
 <211> 1389  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*  
 45 <400> 16

ES 2 682 696 T3

atgagtactg acaatTTTTc tccacaagtt cgcTcgactg tgtatttGga ttacatggag 60  
 caagggattg cgcgcgcGaa agcggaggca gaatctaacg ccagcacGaa gggggagagc 120  
 ccggattatc caggccagca ggttatttgg cgcctgatcc aggaagcagg ggagtcgTtg 180  
 cgtgatgaac tgcgcacact ggctttcacg ctgcacgacc atccggaaga agcgttcgag 240  
 gaggtgTtcg ccaccgagga aatcacaAAA cttctgcaaa atcatggttt tgaggTtcag 300  
 agtggagTtt atggtgTtaa aaccgctcta gaaactagtt ttgaaacccc tggttatgat 360  
 ccagcgcagc acccaagcat tgcgatcttg gcggaatacg atgcccttcc agagatcggc 420  
 catgcatgcg ggcacaatat catcgcagca gctggTgttg gcgcattttt agctgtcacc 480  
 aacatgatca aaactgccga agtgaaaggc gtggatcacc togactttga aggcoggatc 540  
 gtgctgTtgg gaacacctgc tgaggagggg cattccggca aggaatacat gatccgaaat 600  
 ggcgcattcg atggcattga tgcgtcgatt atgatgcacc cctttggctt cgatctggcg 660  
 gagcatgttt gggTgggcag acgtaccatg acggcgacgt tccacggTgt ctctgcacac 720  
 gcgtcttcgc agcctttcat gggtaaaaat gccctcgacg ctgcaagTtt ggcgtaccag 780  
 ggcttcggag ttttgcgtca gcaaatgccA ccgagcgcacc gccttcacgc cattattacg 840  
 gaaggcggaa accggccaag catcattoca gacactgcaa cgatgtcgct gtacgtgcgt 900  
 tctttgTtgc cggaaGcact caaagacata tcgaaacggc tggatgatgt gctcgatggg 960  
 gcggccttga tggcgggggt tggcgtcgaa aagcaatggg atgtgcaccc agctagcttg 1020  
 cccgtgcgca acaatcatgt gttggcgcgg cgttgggcaa aaacgcagaa tctgcgtggt 1080  
 cgaacggcgc tttcggaggg tattttgccc gacactctgg cagcatcgac tgattttggc 1140  
 aatgtctcgc acctggttcc gggcattcat ccgatggtga aaatttctcc ggaaaacgTt 1200  
 gcgctccaca ccaaggaatt gcgcgcttat gcgcgcacgg aagaggccat cgacgcagcc 1260  
 gtcgacgcg caatcgggct ggcgcaagtc gccgttgacg cgcttgcaGa tccgcaaatg 1320  
 cttatcgacg cgaccctcga gttcaccAAC tccggcgacg tacttaaagt aggggactat 1380  
 ttggcttag 1389

<210> 17

<211> 462

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 17

5

ES 2 682 696 T3

Met Ser Thr Asp Asn Phe Ser Pro Gln Val Pro Ser Thr Val Tyr Leu  
1 5 10 15

Asp Tyr Met Glu Gln Gly Ile Ala Ala Arg Lys Ala Glu Ala Glu Ser  
20 25 30

Asn Ala Ser Thr Lys Gly Glu Ser Pro Asp Tyr Pro Gly Gln Gln Val  
35 40 45

Ile Trp Arg Leu Ile Gln Glu Ala Gly Glu Ser Leu Arg Asp Glu Leu  
50 55 60

Arg Thr Leu Ala Phe Thr Leu His Asp His Pro Glu Glu Ala Phe Glu  
65 70 75 80

Glu Val Phe Ala Thr Glu Glu Ile Thr Lys Leu Leu Gln Asn His Gly  
85 90 95

Phe Glu Val Gln Ser Gly Val Tyr Gly Val Lys Thr Ala Leu Glu Thr  
100 105 110

Ser Phe Glu Thr Pro Gly Tyr Asp Pro Ala Gln His Pro Ser Ile Ala  
115 120 125

Ile Leu Ala Glu Tyr Asp Ala Leu Pro Glu Ile Gly His Ala Cys Gly  
130 135 140

His Asn Ile Ile Ala Ala Ala Gly Val Gly Ala Phe Leu Ala Val Thr  
145 150 155 160

Asn Met Ile Lys Thr Ala Glu Val Lys Gly Val Asp His Leu Asp Phe  
165 170 175

Glu Gly Arg Ile Val Leu Leu Gly Thr Pro Ala Glu Glu Gly His Ser  
180 185 190

Gly Lys Glu Tyr Met Ile Arg Asn Gly Ala Phe Asp Gly Ile Asp Ala  
195 200 205

Ser Ile Met Met His Pro Phe Gly Phe Asp Leu Ala Glu His Val Trp  
210 215 220

Val Gly Arg Arg Thr Met Thr Ala Thr Phe His Gly Val Ser Ala His  
225 230 235 240

ES 2 682 696 T3

Ala Ser Ser Gln Pro Phe Met Gly Lys Asn Ala Leu Asp Ala Ala Ser  
 245 250 255

Leu Ala Tyr Gln Gly Phe Gly Val Leu Arg Gln Gln Met Pro Pro Ser  
 260 265 270

Asp Arg Leu His Ala Ile Ile Thr Glu Gly Gly Asn Arg Pro Ser Ile  
 275 280 285

Ile Pro Asp Thr Ala Thr Met Ser Leu Tyr Val Arg Ser Leu Leu Pro  
 290 295 300

Glu Ala Leu Lys Asp Ile Ser Lys Arg Val Asp Asp Val Leu Asp Gly  
 305 310 315 320

Ala Ala Leu Met Ala Gly Val Gly Val Glu Lys Gln Trp Asp Val His  
 325 330 335

Pro Ala Ser Leu Pro Val Arg Asn Asn His Val Leu Ala Arg Arg Trp  
 340 345 350

Ala Lys Thr Gln Asn Leu Arg Gly Arg Thr Ala Leu Ser Glu Gly Ile  
 355 360 365

Leu Pro Asp Thr Leu Ala Ala Ser Thr Asp Phe Gly Asn Val Ser His  
 370 375 380

Leu Val Pro Gly Ile His Pro Met Val Lys Ile Ser Pro Glu Asn Val  
 385 390 395 400

Ala Leu His Thr Lys Glu Phe Ala Ala Tyr Ala Arg Thr Glu Glu Ala  
 405 410 415

Ile Asp Ala Ala Val Asp Ala Ala Ile Gly Leu Ala Gln Val Ala Val  
 420 425 430

Asp Ala Leu Ala Asp Pro Gln Met Leu Ile Asp Ala Thr Leu Glu Phe  
 435 440 445

Thr Asn Ser Gly Asp Val Leu Lys Val Gly Asp Tyr Leu Ala  
 450 455 460

<210> 18

<211> 1389

5 <212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 18

atgagtaactg acaatnttttc tccacaagtt ccgtcgactg tgtattttgga ttacatggag 60

caagggattg tcgcgcgtaa agcggaggca gaatctaacg ccagcacgca gggggagagc 120

ccggattatc caggccagca ggttattttgg cgcctgatcc aggaagcagg ggagtcgttg 180

cgtgatgaac tgcgcacact ggctttcacg ctgcacgacc atccggaaga agcgttcgag 240

gaggtggtcg ccaccgagga aatcacaaaa cttctgcaaa atcatggttt tgaggttcag 300

agtgaggttt atggtggttaa aaccgctcta gaaactagtt ttgaaacccc tggttatgat 360

10

ES 2 682 696 T3

ccagcgcagc acccaagcat tgcgatcttg gcggaatacg atgcccttcc agagatcggc 420  
 catgcgtgcg ggcacaatat catcgcagca gctgggtgttg gtgcattttt ggctgtcacc 480  
 aacatgatca aaaatgccga agtgaaaggc gtggatcacc tcgactttga aggccggatc 540  
 gtgctgtttg gaacacctgc cgaagaaggg cattccggca aggaatacat gatccgaaat 600  
 ggcgattcgg atggcattga tgcattccatc atgatgcacc cctttggctt cgatctggcg 660  
 gaacatgttt ggggtgggcag gcgcactatg acggcgacgt tccacgggtg ctctgcacac 720  
 gcgtcttcgc agcctttcat gggtaaaaat gccctcgcag ctgcaagttt ggcgaccag 780  
 ggcttcggag ttttgcgtca gcaaatgcca ccgagcgacc gccttcacgc cattattacg 840  
 gaagggcgaa accggccaag catcattcca gacactgcaa cgatggcgtt gtatgtgcgt 900  
 tcctgctgc cggaagcact caaagacata tcgaaacgcg tggatgatgt gctcgatggg 960  
 gcggccttga tggcgggggt tggcgtcgaa aagcaatggg atgtgcaccc agctagcttg 1020  
 cccgtgcgca acaatcatgt gttggcgcgg cgttgggcaa aaacgcagaa tctgcgtggt 1080  
 cgaacggcgc tttcggaggg cattttgcc cgcactctgg cagcatcgac tgattttggc 1140  
 aatgtctcgc acctgattcc gggcattcat ccgatgggtga aaatttctcc ggaaaacggt 1200  
 gcgctccaca ccaaggaatt cgcogcttat gcgcgcacgg aagaggccat cgacgcagcc 1260  
 gtcgacgccg caatcgggct ggcgcaagtc gccgttgacg cgottgcaga tccgcaaatg 1320  
 cttatcgacg cgaccctoga gttcaccaac tccggcggca tgottaagc gggagactat 1380  
 ttggcttag 1389

<210> 19

<211> 462

5 <212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 19

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

ES 2 682 696 T3

Ser Phe Glu Thr Pro Gly Tyr Asp Pro Ala Gln His Pro Ser Ile Ala  
115 120 125

Ile Leu Ala Glu Tyr Asp Ala Leu Pro Glu Ile Gly His Ala Cys Gly  
130 135 140

His Asn Ile Ile Ala Ala Ala Gly Val Gly Ala Phe Leu Ala Val Thr  
145 150 155 160

Asn Met Ile Lys Asn Ala Glu Val Lys Gly Val Asp His Leu Asp Phe  
165 170 175

Glu Gly Arg Ile Val Leu Leu Gly Thr Pro Ala Glu Glu Gly His Ser  
180 185 190

Gly Lys Glu Tyr Met Ile Arg Asn Gly Ala Phe Asp Gly Ile Asp Ala  
195 200 205

Ser Ile Met Met His Pro Phe Gly Phe Asp Leu Ala Glu His Val Trp  
210 215 220

Val Gly Arg Arg Thr Met Thr Ala Thr Phe His Gly Val Ser Ala His  
225 230 235 240

Ala Ser Ser Gln Pro Phe Met Gly Lys Asn Ala Leu Asp Ala Ala Ser  
245 250 255

Leu Ala Tyr Gln Gly Phe Gly Val Leu Arg Gln Gln Met Pro Pro Ser  
260 265 270

Asp Arg Leu His Ala Ile Ile Thr Glu Gly Gly Asn Arg Pro Ser Ile  
275 280 285

Ile Pro Asp Thr Ala Thr Met Ala Leu Tyr Val Arg Ser Leu Leu Pro  
290 295 300

Glu Ala Leu Lys Asp Ile Ser Lys Arg Val Asp Asp Val Leu Asp Gly  
305 310 315 320

Ala Ala Leu Met Ala Gly Val Gly Val Glu Lys Gln Trp Asp Val His  
325 330 335

Pro Ala Ser Leu Pro Val Arg Asn Asn His Val Leu Ala Arg Arg Trp  
340 345 350

Ala Lys Thr Gln Asn Leu Arg Gly Arg Thr Ala Leu Ser Glu Gly Ile  
355 360 365

Leu Pro Asp Thr Leu Ala Ala Ser Thr Asp Phe Gly Asn Val Ser His  
370 375 380

Leu Ile Pro Gly Ile His Pro Met Val Lys Ile Ser Pro Glu Asn Val  
385 390 395 400

Ala Leu His Thr Lys Glu Phe Ala Ala Tyr Ala Arg Thr Glu Glu Ala  
405 410 415

Ile Asp Ala Ala Val Asp Ala Ala Ile Gly Leu Ala Gln Val Ala Val  
420 425 430

Asp Ala Leu Ala Asp Pro Gln Met Leu Ile Asp Ala Thr Leu Glu Phe  
435 440 445

Thr Asn Ser Gly Gly Met Leu Lys Ala Gly Asp Tyr Leu Ala  
450 455 460

ES 2 682 696 T3

<210> 20  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

5

<400> 20

```

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
    
```

ES 2 682 696 T3

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> 21

<211> 533

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 21

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



ES 2 682 696 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  
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

ES 2 682 696 T3

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  
 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

ES 2 682 696 T3

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> 23

<211> 357

5 <212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 23

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

ES 2 682 696 T3

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  
 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> 24  
 <211> 388  
 <212> PRT  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

5

<400> 24

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

10



ES 2 682 696 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

<210> 26

<211> 391

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 26

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				

ES 2 682 696 T3

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

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

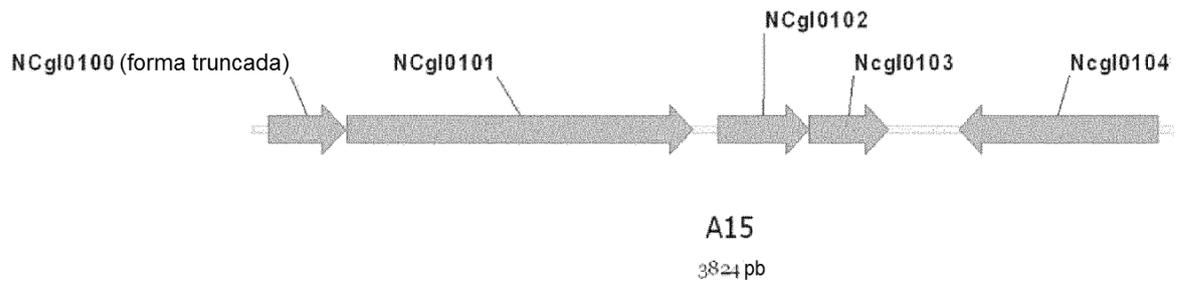
Thr Pro Pro Leu Val Ile Thr Asp Glu Glu Ile Ala Asp Ala Val Lys  
370 375 380

Ala Ile Ala Glu Thr Ile Ala  
385 390

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo de *Corynebacterium glutamicum* recombinante que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que el microorganismo se ha modificado de manera que una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19, o la expresión de las mismas, está modificada en el microorganismo para debilitar o eliminar la actividad de dicha proteína y aumentar la producción de putrescina en comparación con la actividad de dicha proteína y la producción de putrescina en la misma cepa de microorganismo pero sin modificar, 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 de polinucleótido en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína o 4) una combinación de las mismas.
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad de ornitina descarboxilasa (SpeC) se ha introducido adicionalmente en este.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la ornitina descarboxilasa tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las actividades en el microorganismo recombinante de uno o más de los seleccionados de entre el grupo que consiste en ornitina carbamoil transferasa (ArgF) y exportador de glutamato (NCgl1221) están debilitadas adicionalmente en comparación con la actividad de la misma proteína en la misma cepa, pero sin modificar.
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la ArgF tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20, y la NCgl1221 tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21.
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las actividades en el microorganismo recombinante de uno o más de los seleccionados de entre el grupo que consiste en acetil gamma glutamil fosfato reductasa (ArgC), acetil glutamato sintasa u ornitina acetiltransferasa (ArgJ), acetil glutamato cinasa (ArgB), y acetil ornitina amino transferasa (ArgD) están aumentadas adicionalmente, en comparación con la actividad de la misma proteína en la misma cepa, pero sin modificar.
7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que ArgC, ArgJ, ArgB y ArgD tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 23, 24, 25, y 26, respectivamente.
8. Un procedimiento para producir putrescina, que comprende
  - el cultivo, para producir un caldo de cultivo celular, de un microorganismo modificado de *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad para producir putrescina, en el que el microorganismo se ha modificado de manera que una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19, o la expresión de las mismas, se ha modificado en el microorganismo para debilitar o eliminar la actividad de dicha proteína y aumentar la producción de putrescina en comparación con la actividad de dicha proteína y la producción de putrescina en la misma cepa de microorganismo pero sin modificar, en el que la actividad de la proteína se debilita 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 de polinucleótido en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína o 4) una combinación de las mismas; y el aislamiento de putrescina en el caldo de cultivo celular obtenido.

[Figura 1]



[Figura 2]

