

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 857**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015 PCT/KR2015/004087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15163718**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015 E 15783187 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3135759**

54 Título: **Cepa variante productora de putrescina y método de producción que la utiliza**

30 Prioridad:

25.04.2014 KR 20140049766

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

07.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, KYOUNG MIN;
LI, HONGXIAN;
PARK, SU JIN;
YANG, YOUNG LYEOL;
UM, HYE WON y
JUNG, HEE KYOUNG**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 711 857 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

Cepa variante productora de putrescina y método de producción que la utiliza

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante para la producción de putrescina y a un método de producción de putrescina utilizando el mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las aminas biogénicas (AB) son compuestos de nitrógeno producidos principalmente por la descarboxilación de aminoácidos, la aminación de aldehído y cetona, y la transaminación. Dichas aminas biogénicas son compuestos de bajo peso molecular, que se sintetizan durante el metabolismo de microorganismos, plantas y animales, y por tanto se conocen como componentes que se encuentran fácilmente en sus células. Especialmente, la poliamina, tal como la espermidina, la espermina, la putrescina (o 1,4-butanodiamina), la cadaverina, etc., son sustancias presentes en la mayoría de las células vivas.

Entre ellas, la putrescina es una materia prima importante que sintetiza poliamina nailon-4,6 al reaccionar con ácido adípico, y se produce principalmente por síntesis química a través de acrilonitrilo y succinonitrilo a partir de propileno.

Asimismo, se ha desvelado un método de producción de putrescina a alta concentración mediante la transformación de la especie *E. coli* y del género *Corynebacterium* (publicación *International No. WO06/005603*; publicación internacional n.º WO09/125924; Qian ZD et al., *Biotechnol. Bioeng.* 104(4): 651-662, 2009; Schneider et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88(4): 859-868, 2010; y Schneider et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 169-178., 2012). Además, se han realizado investigaciones intensas sobre el transportador de putrescina con respecto a células de *E. coli*, levaduras, plantas y animales (K Igarashi, *Plant Physiol. Biochem.* 48: 506-512, 2010).

Si bien, los presentes inventores demostraron que las proteínas de membrana que codifican NCgl2522 funcionan como un exportador de putrescina en un microorganismo del género *Corynebacterium*, que incluye una ruta de síntesis de putrescina, y confirmaron que la putrescina puede producirse a un alto rendimiento potenciando la actividad de NCgl2522 a partir de su actividad endógena (solicitud de patente KR n.º 10-2013-0030020)

Asimismo, el gen NCgl2523 es un factor de transcripción relacionado con la resistencia a múltiples fármacos que pertenece a la familia TetR, y se sabe que actúa como un inhibidor de la expresión de NCgl2522 (Hirochi et. al. *J Biol. Chem.* 280:46, 38711-38719. 2005).

En este sentido, los presentes inventores han realizado incesantemente investigaciones y han confirmado la producción potenciada de putrescina por empobrecimiento de NCgl2523 que constituye el operón NCgl2522, de manera similar a los efectos de potenciación de la actividad de NCgl2522, completando de esta forma la presente invención.

45 **Divulgación**

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante capaz de producir putrescina a alto rendimiento.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de producción de putrescina a alto rendimiento utilizando el microorganismo.

Solución técnica

En un aspecto para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que se inactiva una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2.

En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que en el microorganismo se introduce adicionalmente una actividad de ornitina descarboxilasa (ODC).

En otra realización ilustrativa, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que la ODC tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 10.

En otra realización ilustrativa más, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que la actividad de acetiltransferasa se inactiva adicionalmente en el microorganismo.

5 En otra realización más, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que la acetiltransferasa comprende un aminoácido representado por la SEC ID NO: 15 o 16.

10 En otra realización más, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de putrescina que incluye:

- 15 i) cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que en un medio de cultivo se inactiva una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2; y
ii) separar la putrescina de un microorganismo cultivado o del medio de cultivo obtenido en la etapa anterior.

20 En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona un método de producción de putrescina, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2, tal como NCgl2523, se inactiva.

30 Como se usa en el presente documento, el término "NCgl2523" se refiere a un factor de transcripción relacionado con la resistencia a múltiples fármacos que pertenece a la familia TetR, y se sabe que actúa como un inhibidor de la expresión de Ncgl2522 (Hirochi et. al. Chem. 280(46): 38711-38719, 2005).

35 En la presente invención, NCgl2523 es una proteína que tiene un aminoácido de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, más específicamente 80 % o más, incluso más específicamente 90 % o más, mucho más específicamente 98 % o más, y lo más específicamente 99 % o más de homología con la secuencia, y no se limita a ella siempre y cuando sea una proteína que tenga la actividad de un inhibidor de la expresión de NCgl2522.

40 Además, dado que las secuencias de aminoácidos de las proteínas que muestran la actividad pueden diferir según la especie o la cepa de microorganismos, no se limita a ellas. Es obvio que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos en la que la secuencia está parcialmente delecionada, modificada, sustituida o insertada, está incluida en el alcance de la presente invención, siempre que una secuencia que tenga homología con la secuencia muestre una actividad biológica prácticamente equivalente o correspondiente a una proteína de SEC ID NO: 2.

45 Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la similitud entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos dadas y puede representarse en porcentaje. En el presente documento, la secuencia de homología que tiene actividad idéntica o similar con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos dada se indica mediante "% de homología". Por ejemplo, la homología puede examinarse utilizando un programa informático convencional que calcula parámetros intermedios tales como puntuación, identidad, similitud, etc., y más específicamente utilizando BLAST 2.0, o comparando secuencias mediante hibridación Southern en condiciones rigurosas definidas. Las condiciones de hibridación apropiadas pueden definirse por el alcance de la técnica, y un experto habitual en la técnica puede determinarlas utilizando métodos conocidos (es decir, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

55 Siempre que tenga una actividad similar a la de las proteínas NCgl2523, un polinucleótido que codifique la NCgl2523 de la presente invención puede incluir una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, o un polinucleótido que codifique una proteína que tenga 70 % o más, específicamente 80 % o más, más específicamente 90 % o más, mucho más específicamente un 95 % o más de homología con la misma, mucho más específicamente 98 % o más, y lo más específicamente 99 % o más de homología con la secuencia, y puede incluir especialmente una secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 1 o 3.

60 Además, un polinucleótido que codifique la NCgl2523 de la presente invención puede hibridarse en condiciones rigurosas con una sonda de una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 1 o 3, o una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos, y puede ser una variante que codifique funcionalmente la NCgl2523 normal. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos. Por ejemplo, dichas condiciones rigurosas se

describen en detalle en la bibliografía (es decir, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

5 En la presente invención, se confirmó que cuando NCgl2523, que constituye un operón de NCgl2522, se
delecionaba en un microorganismo del género *Corynebacterium* con productividad de putrescina, la actividad de
putrescina aumentaba, de manera similar a cuando se potenciaba la actividad de NCgl2522. En este sentido, la
presente invención puede proporcionar un microorganismo recombinante que muestra producción de putrescina a un
10 alto rendimiento al inhibir la expresión de NCgl2522 que resulta de la inactivación de la actividad de NCgl2523. Por
lo tanto, como se desvela en la realización de la presente invención, inactivando la NCgl2523 correspondiente y los
genes que codifican aminoácidos similares a los mismos, la productividad de la putrescina puede potenciarse en un
microorganismo que tiene secuencias con aminoácidos similares a las de NCgl2523, en el que dichos aminoácidos
consisten en NCgl2522 y un operón, o un microorganismo en el que NCgl2523 actúa de manera similar a un
15 modulador de la expresión de NCgl2522.

Como se usa en el presente documento, el término "inactivación" se refiere a no expresar un gen que codifique un
polipéptido correspondiente, mostrando una cierta reducción en la expresión génica, no produciendo un polipéptido
funcional correspondiente, incluso cuando se expresa.

20 Asimismo, inactivación se refiere no solo a la inactivación completa de un gen que codifica un polipéptido
correspondiente, sino también a una expresión debilitada o significativamente reducida en comparación con el tipo
silvestre, por lo que prácticamente no se expresa el gen. Por lo tanto, la inactivación génica puede ser completa
(nulgénica (en inglés *knockout*)) o parcial (por ejemplo, un hipomorfo que muestra expresión génica por debajo del
nivel normal, o un producto de un gen mutante que muestra una reducción parcial de la actividad en efecto de un
25 hipomorfo).

En particular, en la presente invención, la inactivación de NCgl2523 puede inducirse mediante:

- 1) una delección parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína;
- 30 2) la modificación de una secuencia reguladora para disminuir una expresión del polinucleótido;
- 3) la modificación de la secuencia de polinucleótidos en el cromosoma para debilitar la actividad proteica; y
- 4) una combinación de los mismos,

sin estar particularmente limitado a esto.

35 1) puede realizarse una delección parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína reemplazando
un polinucleótido que codifica proteínas o cromosomas diana endógenos con un polinucleótido parcialmente
eliminado o un gen marcador utilizando un vector para la inserción cromosómica en un microorganismo. La
delección "parcial" puede variar dependiendo del tipo de polinucleótido, pero específicamente se refiere a de 1 a
40 300, más específicamente a de 1 a 100, e incluso más específicamente a de 1 a 50.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una construcción de ADN que incluye una
secuencia de nucleótidos que codifica una proteína determinada, que está unida operativamente a una secuencia
reguladora de expresión apropiada para expresar la proteína determinada en una célula hospedadora adecuada. La
45 secuencia reguladora incluye un promotor que puede iniciar la transcripción, una secuencia operadora opcional para
regular la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma de ARNm adecuado y una
secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción. Después de que el vector se transforma en
una célula hospedadora adecuada, este puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del
50 hospedador, o puede integrarse en el propio genoma.

El vector utilizado en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea capaz de replicarse en
células hospedadoras, y puede utilizarse cualquier vector conocido en la técnica. Los ejemplos de vectores
convencionales pueden incluir un plásmido natural o recombinante, un cósmido, un virus y un bacteriófago. Por
ejemplo, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, etc., pueden utilizarse como
55 un vector de fago o vector de cósmido, y los tipos pBR, tipos pUC, tipos pBluescriptII, tipos pGEM, tipos pTZ, tipos
pCL, tipos pET, etc., pueden utilizarse como un vector de plásmido. Un vector que puede utilizarse en la presente
invención no está limitado particularmente y puede utilizarse cualquier vector de expresión conocido.
Específicamente, pueden utilizarse los vectores pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322,
60 pMW118 o pCC1BAC.

Además, el polinucleótido que codifica una proteína determinada en los cromosomas puede reemplazarse por un
polinucleótido mutado utilizando un vector para la inserción cromosómica. La inserción del polinucleótido en el
cromosoma puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, tal como recombinación homóloga, sin
estar particularmente limitado a esto.

65 Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la introducción de vectores que

incluyen un polinucleótido que codifica proteínas diana en células hospedadoras, de modo que las proteínas codificadas por el polinucleótido se expresan en células hospedadoras. Mientras que el polinucleótido transformado pueda expresarse en una célula hospedadora, Este incluye todo tanto si está integrado en los cromosomas de las células hospedadoras o si existe extracromosómicamente. Además, el polinucleótido incluye ADN y ARN que codifican proteínas diana. El polinucleótido puede introducirse en cualquier forma, siempre que pueda introducirse en las células hospedadoras y expresarse en ellas. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en células hospedadoras en forma de un casete de expresión que es una construcción génica que incluye todos los elementos necesarios para su expresión autónoma. Por lo general, el casete de expresión incluye un promotor unido operativamente al polinucleótido, señales de terminación de la transcripción, sitios de unión al ribosoma, o señales de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión autorreplicable. Del mismo modo, el polinucleótido puede introducirse en células hospedadoras tal cual y unirse operativamente a secuencias necesarias para su expresión en células hospedadoras, sin limitarse a esto.

Además, La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de polinucleótidos que codifica proteínas determinadas y una secuencia promotora que inicia y actúa como mediadora en la transcripción de la secuencia de polinucleótidos.

A continuación, 2) la modificación de una secuencia reguladora para disminuir una expresión del polinucleótido puede realizarse induciendo una modificación en una secuencia reguladora mediante delección, inserción, sustitución no conservativa o conservativa, o una combinación de las mismas en una secuencia de nucleótidos o reemplazando con un nucleótido con una actividad más débil, para debilitar la actividad de la secuencia reguladora, sin estar particularmente limitado a esto. La secuencia reguladora puede incluir un promotor, una secuencia operadora, una secuencia que codifica el sitio de unión al ribosoma y una secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción, sin limitarse a esto.

Además, 3) la modificación de la secuencia de polinucleótido en el cromosoma puede realizarse induciendo una modificación en una secuencia reguladora mediante delección, inserción, sustitución no conservativa o conservativa, o una combinación de las mismas en una secuencia de nucleótidos, o reemplazando con un nucleótido con una actividad más débil, para debilitar la actividad proteica, sin limitarse a esto,

Como se usa en el presente documento, la expresión "un microorganismo que tiene productividad de putrescina" o "un microorganismo productor de putrescina" se refiere a un microorganismo que, de manera natural, tiene productividad de putrescina, o a un microorganismo, en el que se incorpora productividad de putrescina en una cepa precursora que no tiene productividad de putrescina.

El microorganismo productor de putrescina puede ser, sin estar particularmente limitado a esto, un microorganismo que tiene una productividad mejorada de ornitina para utilizarse como materia prima para la biosíntesis de putrescina, En el que el microorganismo se modifica para tener una mayor actividad de la acetilglutamato sintasa que convierte el glutamato en acetilglutamato (*N*-acetilglutamato) o de la ornitina acetiltransferasa (ArgJ), que convierte la acetilornitina en ornitina, acetilglutamato quinasa (ArgB), que convierte el acetilglutamato en acetilglutamil fosfato (*N*-acetilglutamil fosfato), acetil-gamma-glutamil fosfato reductasa (ArgC) que convierte la acetil glutamil fosfato en acetil glutamato semialdehído (*N*-acetil glutamato semialdehído), o acetilornitina aminotransferasa (ArgD) que convierte la acetil glutamato semialdehído en acetilornitina (*N*-acetilornitina), en comparación con la actividad endógena, para potenciar la ruta de biosíntesis de glutamato en glutamato de ornitina.

Además, el microorganismo se modifica para inactivar la actividad endógena de la ornitina carbamoiltransferasa (ArgF) involucrada en la síntesis de arginina a partir de la ornitina, el exportador de glutamato (NCgl1221) y/o la acetiltransferasa que acetila la putrescina y/o se modifica para introducir actividad de ornitina descarboxilasa (ODC).

En este caso, la ornitina carbamoiltransferasa (ArgF), el exportador de glutamato (NCgl1221), la ornitina descarboxilasa (ODC), la acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa (ArgC), la acetilglutamato sintasa u ornitina acetiltransferasa (ArgJ), la acetilglutamato quinasa (ArgB) y la acetilornitina aminotransferasa (ArgD), pueden incluir, específicamente, una secuencia de aminoácidos, representada cada una de ellas por la SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, más específicamente 80 % o más, incluso más específicamente 90 % o más de homología con la secuencia, sin estar particularmente limitado a esto.

Además, una acetiltransferasa, que acetila la putrescina, puede incluir, específicamente, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, más específicamente 80 % o más, incluso más específicamente 90 % o más de homología con la secuencia, sin estar particularmente limitado a esto.

En particular, en la presente invención, un aumento en la actividad puede llevarse a cabo mediante:

- 1) un aumento en el número de copias de polinucleótidos que codifican la enzima;
- 2) la modificación de una secuencia reguladora para aumentar la expresión del polinucleótido;
- 3) la modificación de una secuencia de polinucleótidos en el cromosoma para potenciar la actividad de la enzima;

o

4) la modificación para potenciar mediante una combinación de los mismos,

sin limitarse a esto.

5

1) puede realizarse un aumento en el número de copias de polinucleótidos en forma unida operativamente a un vector, o por inserción cromosómica en las células hospedadoras, sin estar particularmente limitado a esto. En particular, esto puede realizarse introduciendo un vector, a un polinucleótido que codifica una enzima de la presente invención, una enzima unida operativamente y que puede copiarse y funcionar independientemente de las células hospedadoras en células hospedadoras, o introduciendo un vector al cual el polinucleótido está unido operativamente y que es capaz de insertar el polinucleótido en cromosomas en las células hospedadoras en células hospedadoras, aumentando de esta manera el número de copias de polinucleótidos en los cromosomas de las células hospedadoras.

10

15 A continuación, 2) para aumentar la expresión del polinucleótido puede realizarse una modificación de una secuencia reguladora induciendo una modificación en una secuencia mediante delección, inserción, sustitución no conservativa o conservativa, o una combinación de las mismas, o reemplazando con una secuencia de nucleótidos con actividad potenciada, para potenciar la actividad de la secuencia reguladora, sin estar particularmente limitado a esto. La secuencia reguladora puede incluir un promotor, una secuencia operadora, una secuencia que codifica el sitio de unión al ribosoma, una secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción, etc., sin estar particularmente limitado a esto.

20

En la dirección 5' (*upstream*) de la unidad de expresión del polinucleótido, en lugar del promotor original puede ligarse un promotor heterólogo fuerte. Son ejemplos de promotor fuerte el promotor de CJ7, el promotor de lysCP1, el promotor de EF-Tu, el promotor de groEL, el promotor de aceA o aceB, etc., y más específicamente, puede unirse operativamente a un promotor originado en *Corynebacterium*, el promotor de lysCP1(WO2009/096689) o el promotor de CJ7 (patente KR n.º 0620092 y documento WO2006/065095) y aumentar la expresión de un polinucleótido que codifica la enzima, aunque no de forma limitativa.

25

30 Además de esto, 3) la modificación de una secuencia de polinucleótidos en el cromosoma puede realizarse induciendo la modificación en una secuencia reguladora por delección, inserción, sustitución no conservativa o conservativa, o una combinación de las mismas, en una secuencia de nucleótidos, o reemplazando con una secuencia de polinucleótidos que está modificada para tener una actividad potenciada, para potenciar la actividad de la secuencia de polinucleótidos, sin estar particularmente limitado a esto.

35

Además, la inactivación de la ornitina carbamoiltransferasa (ArgF), del exportador de glutamato y de la acetil transferasa puede realizarse mediante métodos de inactivación de NCgl2523, como se ha mencionado anteriormente:

40

- 1) una delección parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína;
- 2) la modificación de una secuencia reguladora para disminuir una expresión del polinucleótido;
- 3) la modificación de la secuencia de polinucleótidos en el cromosoma para debilitar la actividad proteica; y
- 4) una combinación de los mismos,

45

sin estar particularmente limitado a esto.

Si bien, un microorganismo de la presente invención es un microorganismo que tiene productividad de putrescina e incluye microorganismos procariontes que expresan proteínas que incluyen un aminoácido representado por la SEC ID NO: 2. Son ejemplos de dichos microorganismos *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Yersinia* sp., *Klebsiella* sp., *Erwinia* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Selenomonas* sp., *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., *Arcanobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., etc. En particular, Un microorganismo de la presente invención puede ser uno del género *Corynebacterium*, y más específicamente *Corynebacterium glutamicum*, pero sin limitación a estos.

50

55 En una realización ilustrativa, la presente invención utiliza cepas que tienen una productividad de putrescina de alta concentración debido a una ruta de biosíntesis de putrescina potenciada a partir de glutamato, que son microorganismos del género *Corynebacterium* depositados con los números de registro KCCM11138P (Patente KR No. 2012-0064046) y KCCM11240P (Patente KR No. 2012-0003634).

55

60 En otra realización ilustrativa, la presente invención utiliza KCCM11138P y KCCM11240P, que son cepas productoras de putrescina derivadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, y DAB12-a (Patente KR No. 2013-0082478) y DAB12-b (KR No. 2013-0082478; DAB12-a ΔNCgl1469), que son cepas productoras de putrescina derivadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, teniendo cada una de ellas genotipos idénticos. La cepa ATCC13869 puede obtenerse en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

65

En particular, los presentes inventores denominaron un microorganismo del género *Corynebacterium* que tenía una

productividad de putrescina potenciada debido a la inactivación de la actividad de NCg12523 en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11240P, que es una cepa productora de putrescina, como *Corynebacterium glutamicum* CC01-0844, y lo depositaron el 25 de febrero de 2014 en el Centro de cultivo de microorganismos de Corea (KCCM, del inglés *Korean Culture Center of Microorganisms*) conforme al Tratado de Budapest como número de Registro KCCM11520P.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de putrescina que incluye:

- i) cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina potenciada, en el que en un medio de cultivo se inactiva una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2; y
- ii) separar la putrescina del microorganismo cultivado o del medio de cultivo obtenido en la etapa anterior.

En el método, el cultivo del microorganismo puede realizarse mediante métodos conocidos de cultivo discontinuo, cultivo continuo, cultivo semicontinuo, etc., sin estar particularmente limitado a esto. En este caso, las condiciones de cultivo pueden mantenerse a un pH óptimo (por ejemplo, a un pH de 5 a 9, específicamente a un pH de 6 a 8, y más específicamente a un pH de 6,8) utilizando compuestos básicos (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco) o compuestos ácidos (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico), y en una condición aerobia por oxígeno o mezcla de gases que contiene oxígeno, en un cultivo celular, sin estar particularmente limitado a esto. La temperatura del cultivo puede mantenerse de 20 °C a 45 °C y, específicamente, de 25 °C a 40 °C, y el cultivo puede realizarse durante aproximadamente 10 horas a 160 horas. La putrescina producida por el cultivo puede exportarse al medio de cultivo o permanecer en las células.

Además, el medio de cultivo utilizado puede incluir azúcar e hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa), aceite y grasa (por ejemplo, aceite de soja, aceite de semillas de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco), ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcohol (glicerol y etanol), y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético) individualmente o en combinación como fuente de carbono; compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, solución de maíz, harina de soja en polvo y urea) o compuestos inorgánicos (por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio) individualmente o en combinación como fuente de nitrógeno; dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de dipotasio o una sal que contenga sodio correspondiente al mismo, individualmente o en combinación, como una fuente de fósforo; y otras sustancias esenciales que estimulan el crecimiento, incluidas las sales metálicas (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro), aminoácidos y vitaminas, sin limitarse a esto.

La separación de putrescina producida en la etapa de cultivo de la presente invención puede realizarse utilizando un método adecuado conocido en la técnica, dependiendo de métodos de cultivo tales como los métodos de cultivo discontinuo, continuo o semicontinuo, etc., recogiendo así del cultivo los aminoácidos determinados.

Efectos ventajosos

Para inactivar la actividad de una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 se modifica un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una productividad de putrescina potenciada de la presente invención, induciendo así una actividad potenciada de una proteína que se espera que sea un exportador de putrescina, específicamente NCg12522, y el aumento de la exportación de putrescina al exterior de las células, y por lo tanto puede producir eficazmente la putrescina.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra las estructuras combinadas de NCg12523 y las adyacentes. En particular, La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una estructura de NCg12522-NCg12523-NCg12524 combinada que es una estructura combinada de genes adyacentes de un microorganismo que incluye NCg12523 (Tipo 1); una estructura combinada de NCg12522-NCg12523 y NCg12524 (Tipo 2) individual; o una estructura de NCg12522-NCg12523 (Tipo 3) combinada.

Modo para llevar a cabo la invención

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, los ejemplos solo tienen fines ilustrativos, y por lo tanto no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Preparación de cepas con delección de NCg12523 y verificación de su productividad de putrescina

<1-1> Preparación de cepas con delección de NCg12523 en cepas productoras de putrescina derivadas de ATCC13032

Para verificar si la delección de NCg12523 derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 tenía un efecto en la

productividad de putrescina, se prepararon vectores para la delección de un gen que codificaba NCgl2523.

En particular, basándose en la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica NCgl2523 representado por la SEC ID NO: 1, se construyó un par de cebadores las SEQ ID NO: 4 y 5 para obtener fragmentos de recombinación homólogos en la región N terminal de NCgl2523 y un par de cebadores de las SEQ ID NO: 6 y 7 para obtener fragmentos de recombinación homólogos en la región C terminal de NCgl2523, como se muestra en la Tabla 1.

[Tabla 1]

NCgl2523-del-F1_BamHI (SEQ ID NO: 4)	CGGGATCCATGACTACCTCGCAGCGTTTC
NCgl2523-del-R1_Sall (SEQ ID NO: 5)	ACGCGTGCACCTAGTGCGCATTATTGGCTCC
NCgl2523-del-F2_Sall (SEQ ID NO: 6)	ACGCGTCGACAGCCATGCTGGAAACAATTCTCG
NCgl2523-del-R2_XbaI (SEQ ID NO: 7)	CTAGTCTAGAGAGAGCTGCGCATAGTACTG

La PCR se realizó utilizando, como molde, el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 y dos pares de cebadores, amplificando así los fragmentos de PCR en las regiones N y C terminales del gen NCgl2523. Los fragmentos determinados se obtuvieron a través de electroforesis de los fragmentos de PCR. En este caso, la reacción de PCR se repitió durante 30 ciclos, incluyendo 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 55 °C y 30 segundos de extensión a 72 °C. Los fragmentos así obtenidos de las regiones N y C terminales se trataron con las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall*, y con las enzimas de restricción *Sall* y *XbaI*, respectivamente. Los fragmentos tratados se clonaron en vectores pDZ tratados con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI*, construyendo así los plásmidos pDZ-1'NCgl2523(K/O).

Para obtener los transformantes, cada uno de los plásmidos pDZ-1'NCgl2523 (K/O) se transformó en KCCM11138P (patente KR No. 10-1348461) y KCCM11240P (patente KR No. 2013-0082478) a través de electroporación. Para la formación de colonias, los transformantes se sembraron en placas y se cultivaron en medio de placa BHIS (infusión de cerebro y corazón, del inglés *Braine Heart Infusion* a (37 g/l), sorbitol (91 g/l) y agar (2 %)) que contenía kanamicina (25 µg/ml) y X-gal(5-bromo-4-cloro-3-indolín-D-galactósido). A partir de las colonias formadas, se seleccionaron colonias azules como cepas introducidas con los plásmidos pDZ-1'NCgl2523(K/O).

Las cepas seleccionadas se cultivaron en un medio CM (glucosa 10 g/l), polipeptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), extracto de carne (5 g/l), NaCl (2,5 g/l), urea (2 g/l), a un pH de 6,8) a 30 °C durante 8 horas. Después de diluir en serie cada cultivo celular de 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰, para formar las colonias, las muestras diluidas se sembraron en placas y se cultivaron en un medio sólido que contenía X-gal. A partir de las colonias formadas, las colonias blancas, que aparecieron a una frecuencia relativamente baja, se seleccionaron finalmente como cepas con delección de un gen que codificaba NCgl2523 a través de un cruce secundario.

Utilizando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 4 y 7, se realizó PCR para confirmar la delección de un gen que codificaba NCgl2523 en las cepas finalmente seleccionadas. Cada uno de los mutantes de *Corynebacterium glutamicum* recibió el nombre de KCCM11138P ΔNCgl2523 y KCCM11240P ΔNCgl2523.

<1-2> Preparación de cepas con delección de NCgl2523 en cepas productoras de putrescina derivadas de ATCC13869

A partir de DAB12-a (patente KR No. 2013-0082478) y DAB12-b (patente KR No. 2013-0082478; DAB12-a ΔNCgl1469) que son cepas productoras de putrescina derivadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, se construyeron cepas con delección de NCgl2523.

En particular, para verificar una secuencia del gen NCgl2523 y la proteína expresada del mismo, derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, se realizó PCR se realizó utilizando, como molde, ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 y un par de cebadores de las SEQ ID NO: 4 y 7. En este caso, la reacción de PCR se repitió durante 30 ciclos, incluyendo 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 55 °C y 1 minuto 30 segundos de extensión a 72 °C.

Al separar los productos de la PCR así obtenidos mediante electroforesis y analizarlos mediante secuenciación, se encontró que un gen que codificaba NCgl2523 derivado de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, incluía una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 3. Además, se comparó una secuencia de aminoácidos de proteínas codificadas por el gen, con una secuencia de aminoácidos de NCgl2523 (SEC ID NO: 2) derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, y el resultado mostró una homología de 100 %.

Para deleccionar un gen que codifica NCgl2523 derivado de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, Se realizó PCR utilizando, como molde, el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 y dos pares de cebadores descritos en la Tabla 1 como en el Ejemplo <1-1>, y los fragmentos de PCR de las regiones C y N terminales del gen NCgl2523 se amplificaron, obteniendo así los fragmentos determinados mediante electroforesis.

En este caso, la reacción de PCR se repitió durante 30 ciclos, incluyendo 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 55 °C y 30 segundos de extensión a 72 °C. Los fragmentos así obtenidos de las regiones N y C terminales se trataron con las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall*, y con las enzimas de restricción *Sall* y *XbaI*, respectivamente. Los fragmentos tratados se clonaron en los vectores pDZ tratados con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI*, construyendo así los plásmidos pDZ-2'NCgl2523(K/O).

Transformando pDZ-2'NCgl2523 (K / O) en cada uno de *Corynebacterium glutamicum* DAB12-a y DAB12-b de la misma manera que se describe en el Ejemplo <1-1>, se seleccionaron cepas con delección de un gen que codificaba NCgl2523. Los mutantes seleccionados de *Corynebacterium glutamicum* recibieron el nombre de DAB12-a ΔNCgl2523 y DAB12 -b ΔNCgl2523.

<1-3> Evaluación de la productividad de putrescina de cepas con delección de NCgl2523

Para verificar los efectos de la delección de NCgl2523 sobre la producción de putrescina en cepas productoras de putrescina, los mutantes de *Corynebacterium glutamicum* construidos en el Ejemplo <1-1> y <1-2> se compararon con respecto a la productividad de putrescina.

En particular, Cada uno de los 4 tipos diferentes de mutantes de *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11138P ΔNCgl2523, KCCM11240P ΔNCgl2523, DAB12-a ΔNCgl2523 y DAB12-b ΔNCgl2523) y de los 4 tipos diferentes de cepas precursoras (KCCM11138P, KCCM11240P, DAB12-a y DAB12-b) se sembraron en medios de placa CM que contenía arginina 1 mM (glucosa al 1 %, polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, extracto de carne al 0,5 %, NaCl al 0,25 %, urea al 0,2 %, 100 μl de NaOH al 50 % y agar al 2 %, a un pH de 6,8, en 1 litro) y se cultivaron a 30 °C durante 24 horas. Después de inocular cada una de las cepas cultivadas utilizando un asa de platino en 25 ml de medio de titulación (glucosa al 8 %, proteínas de soja al 0,25 %, sólidos de macerado de maíz al 0,50 %, (NH₄)₂SO₄ al 4 %, KH₂PO₄ al 0,1 %, MgSO₄ · 7H₂O al 0,05 %, urea al 0,15 %, 100 g de biotina, 3 mg de clorhidrato de tiamina, 3 mg de calcio-ácido pantoténico, 3 mg de nicotinamida y CaCO₃ al 5 %, en 1 litro), el cultivo se realizó con agitación a 30 °C y a 200 rpm durante 98 horas. Para cultivar todas las cepas, se añadió al medio arginina 1 mM. La concentración de putrescina producida a partir de cada cultivo se midió y los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Cepa	Putrescina (g/l)
KCCM11138P	9,8
KCCM11138P ΔNCgl2523	11,8
KCCM11240P (-)	12,4
KCCM11240P ΔNCgl2523	14,9
DAB12-a	10,2
DAB12-a ΔNCgl2523	12,2
DAB12-b	13,1
DAB12-b Δ NCgl2523	15,2

Como se muestra en la Tabla 2, la producción de putrescina se incrementó en 4 tipos de mutantes de *Corynebacterium glutamicum* con delección de NCgl2523.

Ejemplo 2: Medición de las concentraciones de putrescina intercelular en cepas con delección de NCgl2523

Para examinar los cambios en la concentración de putrescina intercelular en mutantes de *Corynebacterium glutamicum* que tenían actividad NCgl2523 inactivada, las concentraciones de putrescina intercelular se midieron en el mutante de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11240P ΔNCgl2523 y en la cepa precursora KCCM11240P por extracción utilizando un disolvente orgánico. El análisis de metabolito intracelular se llevó a cabo según un método descrito en la bibliografía (Nakamura J et al., Appl. Environ. Microbiol., 73(14): 4491-4498, 2007).

En primer lugar, después de inocular cada uno del mutante de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11240P ΔNCgl2523 y la cepa precursora KCCM11240P en 25 ml de medio líquido CM que contenía arginina 1 mM (glucosa al 1 %, polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, extracto de carne al 0,5 %, NaCl al 0,25 %, urea al 0,2 % y 100 μl de NaOH al 50 %, a un pH de 6,8, en 1 litro), el cultivo se realizó con agitación a 30 °C y a 200 rpm. Cuando el crecimiento celular alcanzó la fase exponencial durante el cultivo, las células se aislaron de los medios de cultivo mediante filtración rápida al vacío (Durapore HV, 0,45 m; Millipore, Billerica, MA). El filtro adsorbido de células se lavó dos veces con 10 ml de agua enfriada y se sumergió durante 10 minutos en ácido morfolino etanosulfónico 5 M

que contenía metanol y metionina sulfona 5 M. El líquido de extracción obtenido del mismo se mezcló bien con un mismo volumen de cloroformo y un volumen de agua de 0,4 veces. Para retirar los contaminantes proteicos, se aplicó solo la fase acuosa a una columna de centrifugado. El líquido de extracción filtrado se analizó mediante espectrometría de masas con electroforesis capilar, y los resultados se muestran en la Tabla 3.

5

[Tabla 3]

Cepa	Putrescina (mM)
KCCM11240P	7
KCCM11240P ΔNCgl2523	1

Como se muestra en la Tabla 3, la concentración de putrescina intercelular se redujo significativamente en los mutantes de *Corynebacterium glutamicum* que tenían actividad de NCgl2523 inactivada en comparación con la de la cepa precursora KCCM11240P.

10

Se sugiere que cuando en el mutante KCCM11240P de *Corynebacterium glutamicum* se deletiona NCgl2523, la inhibición de la expresión de NCgl2522 se elimina y se potencia la actividad de NCgl2522, potenciando así, de una manera eficaz, la capacidad de exportación de putrescina y posteriormente exportando la putrescina producida dentro de la célula al exterior de las células.

15

Ejemplo 3: Búsqueda del ortólogo del gen NCgl2523 y análisis del contexto génico

La búsqueda del ortólogo se realizó para NCgl2523, que deriva de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, utilizando las bases de datos KEGG y MetaCyc y el programa blastP del NCBI. A través del grupo de genes, se examinó una estructura combinada de NCgl2523 y NCgl2522 y NCgl2524, que constituye un operón en el genoma de cada microorganismo.

20

El nombre del gen NCgl2522 es cgmA, que es una permeasa importante de la superfamilia de transportadores facilitadores que pertenece a la familia DHA2, y el nombre del gen NCgl2523 es cgmR, que es el regulador de la transcripción de la familia TetR. A NCgl2524 no se le ha atribuido ninguna función, pero es una permeasa importante de la superfamilia de transportadores facilitadores que pertenece a la familia UMF1.

25

De acuerdo con los resultados del análisis, mientras que NCgl2522 y NCgl2523 constituyen en su mayoría el mismo operón, NCgl2524 puede estar presente en los mismos operones (Tipo 1), presente en una posición diferente en el genoma (Tipo 2), o no presente en el genoma (Tipo 3), dependiendo de los microorganismos.

30

En este sentido, cada uno de los microorganismos analizados se clasificó en 3 tipos según una estructura combinada de genes adyacentes a NCgl2523. En particular, los microorganismos que se esperaba que tuvieran NCgl2523 se clasificaron en una estructura combinada de NCgl2522-NCgl2523-NCgl2524 (Tipo 1); una estructura combinada de NCgl2522-NCgl2523 y NCgl2524 (Tipo 2) individual; o una estructura combinada de NCgl2522-NCgl2523 (Tipo 3) (Figura 1). En la Tabla 4 se muestran los resultados de la clasificación.

35

Tabla 4

Tipo	Estructura combinada	Microorganismos correspondientes
	Microorganismos que tienen NCgl2523	<i>Acidovorax avenae</i> , <i>Actinobaculum sp.</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Actinomyces vaccimaxillae</i> , <i>Actinoplanes missouriensis</i> , <i>Actinosynnema mirum</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>alpha proteobacterium</i> , <i>Amycolatopsis mediterranei</i> , <i>Amycolatopsis orientalis</i> , <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> , <i>Arthrobacter aurescens</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> , <i>Beutenbergia cavernae</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> , <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> , <i>Clavibacter michiganensis subsp.</i> , <i>Corynebacterium atypicum</i> , <i>Corynebacterium callunae</i> , <i>Corynebacterium casei</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Corynebacterium glutamicum AR1</i> , <i>Corynebacterium glutamicum ATCC 13032</i> , <i>Corynebacterium glutamicum ATCC 13869</i> , <i>Corynebacterium glutamicum ATCC 14067</i> , <i>Corynebacterium glutamicum ATCC 21831</i> , <i>Corynebacterium glutamicum K051</i> , <i>Corynebacterium glutamicum MB001</i> , <i>Corynebacterium glutamicum R</i> , <i>Corynebacterium glutamicum SCgG1</i> , <i>Corynebacterium glutamicum SCgG2</i> , <i>Corynebacterium glycinophilum</i> , <i>Corynebacterium maris</i> , <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , <i>Corynebacterium sp. ATCC 6931</i> , <i>Corynebacterium terpenotabidum</i> , <i>Corynebacterium ulcerans</i> , <i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>Corynebacterium variable</i> , <i>Corynebacterium vitaeruminis</i> , <i>Dermabacter sp. HFFH0086</i> , <i>Enterobacter cloacae EcWSU1</i> , <i>Enterobacter sp. R4-368</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Granulicoccus phenolivorans</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Ilumatobacter</i>

Tipo	Estructura combinada	Microorganismos correspondientes
		<i>coccineus</i> , <i>Isoptericola variabilis</i> , <i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> , <i>Ketogulonicigenium vulgare</i> , <i>Microbacterium</i> sp., <i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Micromonospora aurantiaca</i> , <i>Micromonospora</i> sp., <i>Mycobacterium gilvum</i> , <i>Nakamurella multipartita</i> , <i>Nesterenkonia alba</i> , <i>Nesterenkonia</i> sp., <i>Nocardia brasiliensis</i> , <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> , <i>Nocardia farcinica</i> , <i>Nocardiosis dassonvillei</i> , <i>Nocardiosis kunsanensis</i> , <i>Nocardiosis</i> sp., <i>Nocardiosis valliformis</i> , <i>Nocardiosis xinjiangensis</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i> , <i>Ochrobactrum intermedium</i> , <i>Paracoccus aminophilus</i> , <i>Paracoccus</i> sp. 5503, <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> PCC21, <i>Promicromonospora sukumoe</i> , <i>Propionibacterium acidipropionici</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas cremoricolorata</i> , <i>Pseudomonas geniculata</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> , <i>Renibacterium salmoninarum</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>Rhodococcus opacus</i> PD630, <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> , <i>Saccharomonospora viridis</i> , <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , <i>Salinispora</i> , <i>Salinispora arenicola</i> , <i>Salinispora pacifica</i> , <i>Salinispora tropica</i> , <i>Sanguibacter keddieii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Serratia proteamaculans</i> , <i>Serratia</i> sp., <i>Sodalis</i> sp. HS1, <i>Sphingobium chinhatense</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptomyces albobiviridis</i> , <i>Streptomyces albus</i> , <i>Streptomyces atroolivaceus</i> , <i>Streptomyces baarnensis</i> , <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> , <i>Streptomyces fulvissimus</i> , <i>Streptomyces globisporus</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Streptomyces mediolani</i> , <i>Streptomyces scopuliridis</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> , <i>Xenorhabdus nematophila</i> , <i>Yaniella halotolerans</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
1	Estructura combinada de NCgl2522-NCgl2523-NCgl2524	<i>Corynebacterium callunae</i> , <i>Corynebacterium casei</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> AR1, <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032, <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869, <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 14067, <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21831, <i>Corynebacterium glutamicum</i> K051, <i>Corynebacterium glutamicum</i> MB001, <i>Corynebacterium glutamicum</i> R, <i>Corynebacterium glutamicum</i> SCgG1, <i>Corynebacterium glutamicum</i> SCgG2, <i>Corynebacterium vitaeruminis</i>
2	Estructura combinada de NCgl2522-NCgl2523; NCgl2524 individual	<i>Actinoplanes missouriensis</i> , <i>Actinosynnema mirum</i> , <i>Amycolatopsis mediterranei</i> , <i>Amycolatopsis mediterranei</i> , <i>Amycolatopsis orientalis</i> , <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> , <i>Arthrobacter aureus</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Corynebacterium glycinophilum</i> , <i>Corynebacterium maris</i> , <i>Corynebacterium terpenotabidum</i> , <i>Corynebacterium variabile</i> , <i>Isoptericola variabilis</i> , <i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Micromonospora aurantiaca</i> , <i>Micromonospora</i> sp. L5, <i>Mycobacterium gilvum</i> , <i>Nakamurella multipartita</i> , <i>Nocardia brasiliensis</i> , <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> , <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> , <i>Nocardia farcinica</i> , <i>Nocardiosis dassonvillei</i> , <i>Nocardiosis dassonvillei</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i> , <i>Paracoccus aminophilus</i> , <i>Propionibacterium acidipropionici</i> , <i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> , <i>Renibacterium salmoninarum</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> , <i>Saccharomonospora viridis</i> , <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , <i>Salinispora tropica</i> , <i>Streptomyces albus</i> , <i>Streptomyces fulvissimus</i> , <i>Streptomyces griseus</i>
3	Estructura combinada de NCgl2522-NCgl2523	<i>Acidovorax avenae</i> , <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> , <i>Beutenbergia cavernae</i> , <i>Corynebacterium atypicum</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , <i>Corynebacterium ulcerans</i> , <i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Hafnia alvei</i> , <i>Ilumatobacter coccineus</i> , <i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> , <i>Ketogulonicigenium vulgare</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> PCC21, <i>Providencia stuartii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas cremoricolorata</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Sanguibacter keddieii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Serratia proteamaculans</i> , <i>Serratia</i> sp., <i>Sodalis</i> sp. HS1, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Xenorhabdus nematophila</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>

A partir de estos resultados, se espera que la productividad de la putrescina pueda potenciarse como en la presente invención al inactivar los genes que codifican NCgl2523 y una secuencia de aminoácidos similar a la misma, para microorganismos que tienen un aminoácido que incluye una secuencia similar a NCgl2523 y que consiste en un operón con una proteína que se espera que sea un exportador de putrescina, tal como NCgl2522, como en la clasificación.

Denominación del depósito

Autoridad depositaria: Centro de cultivo de microorganismos de Corea

N.º de registro: KCCM11520P

5 Fecha de depósito: 20140225

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

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

<130> OPA15053-PCT

15 <150> KR10-2014-0049766

<151> 25/04/2014

<160> 16

20 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 534

<212> ADN

25 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 NCgl2523

<400> 1

atgcgacta gtaaaaaaga gatgattctg cgcacggcca tcgattatat cggcgagtac	60
agcctcgaga cgctgagtta cgattcgctc gccgaggcga ccggtctgtc caagtcgggc	120
ttgatttata atttccccag ccgccatgcg ctgcttttag gcatgcacga gttgcttgcc	180
gacgactggg acaaggaatt gcgcgacata acccgcgacc cagaggatcc acttgagcga	240
ttgcgcgccc tegtggttac gcttgctgaa aacgtttcgc gccccgagct gcttttgctt	300
atcgacgccc cctcccaccc ggatttcctt aacgcctggc gcaactgtaa tcatcaatgg	360
atccccgaca ccgatgatct ggaaaacgat gccacaaac gcgccgtcta cctggtgcag	420
ctcgcagccg atggcctctt cgtgcacgat tacattcatg atgatgtcct cagcaagtcc	480
aagcgccaag ccatgctgga aacaattctc gagctgatac caagccagac ttaa	534

30 <210> 2

<211> 177

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 NCgl2523

35 <400> 2

ES 2 711 857 T3

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

Thr

5 <210> 3
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13869 NCgl2523

10 <400> 3

atgcgcacta gtaaaaaaga gatgattctg cgcacggcca tcgattatat cggcgagtac 60
 agcctcgaga cgctgagtta cgattcgctc gccgaggcga cgggtctgtc caagtcgggc 120
 ttgatttatc atttcccag cgcctatgcg ctgcttttag gcatgcacga gttgcttgcc 180
 gacgactggg acaaggaatt gcgcaacata acccgcgacc cagaggatcc acttgagcga 240
 ttgcgcgccg tcgtggttac gcttgctgaa aacgtttcgc gccccgagtt gcttttgctt 300
 atcgacgccc cctcccaccc ggatttccta aacgcctggc gcactgtaaa tcatcaatgg 360
 atccccgaca ccgatgatct ggaaaacgat gccacaaac gcgccgtcta cctggtgcag 420
 ctcgcagccg atggcctctt cgtgcacgac tacattcatg atgatgtcct cagcaagtcc 480
 aagcgccaag ccatgctgga aacaattctc gagctgatac cgagccagac ttaa 534

<210> 4

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador NCgl2523-del-F1_BamHI
 <400> 4
 cgggatccat gactacctcg cagcgtttc 29
 10 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador NCgl2523-del-R1_Sall
 <400> 5
 20 acgcgtcgac ctagtgcgca ttattggctc c 31
 <210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador NCgl2523-del-F2_Sall
 30 <400> 6
 acgcgtcgac agccatgctg gaaacaattc tcg 33
 <210> 7
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador NCgl2523-del-R2_XbaI
 40 <400> 7
 ctagtctaga gagagctgcg catagtactg 30
 <210> 8
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Ornitina carbamoiltransferasa (argF)
 45 <400> 8
 50

ES 2 711 857 T3

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

ES 2 711 857 T3

<211> 533
 <212> PRT
 <213> Exportador de glutamato (NCgl1221)

5 <400> 9

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		

ES 2 711 857 T3

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

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

ES 2 711 857 T3

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 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> 10
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Ornitina decarboxilasa (ODC)
 <400> 10

5

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

10

ES 2 711 857 T3

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
				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

ES 2 711 857 T3

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> 11
 5 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Acetil gamma glutamil fosfato reductasa (ArgC)

<400> 11

10

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	

ES 2 711 857 T3

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

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> 12
 <211> 388
 5 <212> PRT
 <213> Acetilglutamato sintasa u Ornitina acetiltransferasa (ArgJ)
 <400> 12

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

10

ES 2 711 857 T3

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
 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

ES 2 711 857 T3

Ala Tyr Ser Ser
385

5 <210> 13
<211> 317
<212> PRT
<213> Acetilglutamato quinasa (ArgB)
<400> 13

ES 2 711 857 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 2 711 857 T3

<210> 14
 <211> 391
 <212> PRT

5 <213> Acetilornitina aminotransferasa (ArgD)

<400> 14

```

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
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
    
```

10

ES 2 711 857 T3

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

<210> 15
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 NCgl1469
 <400> 15

5

ES 2 711 857 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> 16

<211> 203

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13869 NCgl1469

<400> 16

5

ES 2 711 857 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 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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo aislado del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que se inactiva una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2.
2. El microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina según la reivindicación 1, en el que en el microorganismo se introduce adicionalmente una actividad de ornitina descarboxilasa (ODC).
- 10 3. El microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina según la reivindicación 2, en el que la ODC tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 10.
4. El microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina según la reivindicación 1, en el que la actividad de acetiltransferasa se inactiva adicionalmente en el microorganismo.
- 15 5. El microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina según la reivindicación 4, en el que la acetiltransferasa comprende un aminoácido representado por la SEC ID NO: 15 o 16.
- 20 6. El microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.
7. Un método de producción de putrescina, que comprende:
- 25 cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de putrescina, en el que en un medio de cultivo se inactiva una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2; y separar la putrescina del microorganismo cultivado o del medio de cultivo obtenido en la etapa anterior.
8. El método de producción de putrescina según la reivindicación 7, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.

Fig. 1

