

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 045**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12P 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2016 PCT/KR2016/000389**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16129812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2016 E 16749352 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2023 EP 3257939**

54 Título: **Nueva lisina descarboxilasa y método para producir cadaverina usando la misma**

30 Prioridad:

**09.02.2015 KR 20150019732**

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

**25.09.2023**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORP. (100.0%)  
(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro Jung-gu,  
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, JAE HUN;  
YANG, YOUNG LYEOL;  
PARK, BO SEONG;  
PARK, YEAN HEE;  
PARK, JIN SEUNG;  
AN, BYEO RI;  
OH, IN SEOK y  
LEE, NA HUM**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 949 045 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

Nueva lisina descarboxilasa y método para producir cadaverina usando la misma

5 **Campo técnico**

En el presente documento se describe un microorganismo transformado con un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, un microorganismo capaz de producir cadaverina, y métodos para producir cadaverina.

10

**Antecedentes de la técnica**

Un método general para producir nailon mediante el uso de diamina es un proceso químico en el que se utilizan 1,4-diaminobutano y hexametildiamina como materias primas. Estas materias primas se producen a partir de compuestos orgánicos derivados del petróleo. Por consiguiente, a medida que se endurecen las regulaciones ambientales, crece la demanda del mercado de materiales alternativos producidos a través de rutas de base biológica.

15

Por su parte, la cadaverina es un compuesto orgánico de diamina compuesto por 5 carbonos que tiene una fórmula molecular  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ , y puede ser una materia prima para el nailon 5,6. Si es posible la preparación biológica de cadaverina, se espera que se pueda producir una variedad de nailon mientras se satisface la demanda del mercado de materiales de base biológica.

20

Con respecto a la producción de base biológica de cadaverina, los estudios sobre la bioconversión de lisina eran ampliamente conocidos antes de la década de 1940 (Gale E.F., Epps H.M. 1944. Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. Biochem J. 38, 232-242). En una etapa clave de la bioconversión, la lisina descarboxilasa es una enzima que produce cadaverina a partir de lisina (FIG. 1). Se ha informado de la actividad de la lisina descarboxilasa en muchos microorganismos diferentes, y la lisina descarboxilasa, cuya actividad específica (mmol/min/mg) es conocida, se deriva de cuatro tipos de microorganismos (*Escherichia coli*, *Bacterium cadaveris*, *Glycine max*, y *Selenomonas ruminantium*). Entre ellas, la lisina descarboxilasa derivada de *Escherichia coli* se evalúa como la lisina descarboxilasa que tiene la mayor actividad, y la enzima utilizada en la producción práctica también se limita a CadA, que se deriva de *Escherichia coli* (Patente Japonesa N.º 2005-147171, Patente Europea N.º 2004-010711 y Patente Japonesa N.º 2002-257374). Sin embargo, la producción de cadaverina al hacer reaccionar la lisina con la lisina descarboxilasa genera dióxido de carbono por descarboxilación de la lisina y produce un catión divalente, cadaverina de un catión monovalente, lisina aumentando así el pH durante la reacción. Así pues, cuando se produce la reacción enzimática de la lisina descarboxilasa, se modifica el pH, lo que genera un problema de reducción de la eficiencia. Además, la enzima puede ser desnaturalizada por un ácido producido en una solución de reacción, o una base, perdiendo así su actividad.

25

30

35

En consecuencia, los presentes inventores descubrieron una nueva lisina descarboxilasa que tiene estabilidad frente a altas temperaturas y pH, y descubrieron que la lisina descarboxilasa se puede expresar en un microorganismo que pertenece a la especie *Escherichia*. BASE DE DATOS del Genbank [en línea], 12 de junio de 2014 (2014-06-12), acceso WP\_027896066.1 desvela una secuencia de lisina descarboxilasa de *Pseudomonas thermotolerans*. El documento WO 2008/142034 A2 se refiere a plantas con mayor tolerancia y/o resistencia al estrés ambiental y mayor producción de biomasa. Kind *et al.* (Metabolic Engineering, vol. 25, 2014, páginas 113-123) informa "From zero to hero - Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*". BASE DE DATOS del Genbank [En línea] NCBI; 21 de septiembre de 2013 (2013-09-21), acceso WP\_021221793 desvela una secuencia de lisina descarboxilasa de *Pseudomonas alcaligenes*. El documento WO 2015/196430 A1 se refiere a medios para expresar polipéptidos involucrados en la descarboxilación de lisina y a métodos y aplicación de los mismos. BASE DE DATOS del GENBANK, 28 de junio de 2013 (2013-06-28), acceso WP\_017938426 desvela una lisina descarboxilasa de *Pseudomonas thermotolerans*. El documento WO 2016/054792 A1 se refiere a la expresión de bombas de eflujo de tetraciclina recombinante para la producción de lisina o productos derivados de lisina, y a métodos y aplicaciones de la misma.

40

45

50

**Sumario de la invención**

La invención proporciona un microorganismo que se transforma con un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha proteína es de *Pseudomonas sp.*, y el microorganismo es un microorganismo de *Escherichia sp.*

55

60

La invención también proporciona un microorganismo que tiene la capacidad de producir cadaverina, en donde el microorganismo se transforma con un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha proteína es de *Pseudomonas sp.*, y el microorganismo es un microorganismo de *Escherichia sp.*

65

La invención proporciona además un método para preparar cadaverina, que comprende las etapas de: convertir lisina en cadaverina mediante el uso de una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha proteína es de *Pseudomonas sp.* o el microorganismo de la invención; y recuperar la cadaverina convertida.

La invención proporciona además un método para preparar cadaverina, que comprende las etapas de: cultivar el microorganismo de la invención en un medio; y recuperar la cadaverina del microorganismo o del medio.

## 10 Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones independientes. Los aspectos y realizaciones preferentes adicionales se definen en las reivindicaciones dependientes. Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona meramente con fines ilustrativos.

También se describe en este documento una proteína que tiene una nueva actividad de lisina descarboxilasa, que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene un 75 % o más de homología de secuencia con la misma.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa" se refiere a una proteína que tiene actividad para catalizar una reacción de descarboxilación de lisina usando piridoxal-5'-fosfato como coenzima para descarboxilar lisina, produciendo así cadaverina y dióxido de carbono.

También se describe en el presente documento una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos que tiene un 75 % o más de homología de secuencia con la misma puede ser una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, que se ha descubierto recientemente en un microorganismo de *Pseudomonas sp.*, y la proteína puede incluir todas las proteínas, siempre que tengan la actividad correspondiente y se descubran en un microorganismo de *Pseudomonas sp.* Por ejemplo, el microorganismo de *Pseudomonas sp.* puede ser *Pseudomonas thermotolerans*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas synxantha*.

También se describe en este documento una proteína que tiene una nueva actividad de lisina descarboxilasa derivada del microorganismo *Pseudomonas thermotolerans* que puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con SEQ ID NO: 1. También se describe en este documento una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa derivada del microorganismo *Pseudomonas alcaligenes* que puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con SEQ ID NO: 3. También se describe en este documento una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa derivada del microorganismo *Pseudomonas resinovorans* que puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con SEQ ID NO: 5. También se describe en este documento una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa derivada del microorganismo *Pseudomonas putida* que puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con SEQ ID NO: 7. También se describe en este documento una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa derivada del microorganismo *Pseudomonas synxantha* que puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con SEQ ID NO: 9. Sin embargo, las proteínas no se limitan a las secuencias de aminoácidos anteriores, y las proteínas pueden tener todas las secuencias de aminoácidos, siempre que las secuencias de aminoácidos sean capaces de mantener la actividad de lisina descarboxilasa.

También se describe en este documento un polinucleótido que codifica la nueva proteína que tiene la actividad de lisina descarboxilasa, específicamente, un polinucleótido que tiene una homología de secuencia del 75 % o más con una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

También se describe en el presente documento una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que tiene la actividad de lisina descarboxilasa que se puede obtener a partir de una secuencia genómica conocida derivada del microorganismo *Pseudomonas sp.* Específicamente, la secuencia de nucleótidos puede obtenerse a partir de secuencias genómicas derivadas de uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Pseudomonas thermotolerans*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas synxantha*. Una secuencia de nucleótidos que codifica la lisina descarboxilasa que se deriva del

microorganismo *Pseudomonas thermotolerans* puede tener la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, y también puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. Una secuencia de nucleótidos que codifica la lisina descarboxilasa que se deriva del microorganismo *Pseudomonas alcaligenes* puede tener una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, y también puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4. Una secuencia de nucleótidos que codifica la lisina descarboxilasa que se deriva del microorganismo *Pseudomonas resinovorans* puede obtenerse a partir de una secuencia genómica conocida de *Pseudomonas resinovorans*, y específicamente, puede tener una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6, y también puede tener una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6. Una secuencia de nucleótidos que codifica la lisina descarboxilasa que se deriva del microorganismo *Pseudomonas putida* puede tener una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, y también puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8. Una secuencia de nucleótidos que codifica la L-lisina descarboxilasa que se deriva del microorganismo *Pseudomonas synxantha* puede tener una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10, y también puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más de homología de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10. Sin embargo, los polinucleótidos que codifican las proteínas que tienen actividad de lisina descarboxilasa no se limitan a ellos, y los polinucleótidos pueden incluir todos los polinucleótidos sin limitación, siempre que los polinucleótidos puedan codificar la nueva proteína que tiene la actividad de lisina descarboxilasa descrita en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere al grado de apareamiento con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos dada y la homología puede expresarse como un porcentaje. En la presente divulgación, una secuencia homóloga que tiene una actividad que es idéntica o similar a la secuencia de aminoácidos o a la secuencia de nucleótidos dada se expresa como "% de homología". Por ejemplo, la homología puede determinarse mediante el uso de parámetros de cálculo de software convencionales tales como puntuación, identidad, similitud, etc., específicamente, BLAST 2.0, o comparando las secuencias en un experimento de hibridación de Southern en condiciones estrictas como se define, y definiendo las condiciones de hibridación apropiadas pueden determinarse mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica. (por ejemplo, ver Sambrook *et al.*, 1989, más abajo).

También se describe en el presente documento una lisina descarboxilasa que puede tener uno o más seleccionados del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9. Además, el polinucleótido que codifica la proteína que tiene la actividad de L-lisina descarboxilasa puede tener uno o más seleccionados del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10.

Se confirmó que las lisina descarboxilasas derivadas de los microorganismos de *Pseudomonas* sp. anteriores no muestran grandes cambios en sus actividades a un pH alto, y por lo tanto, tienen estabilidad de pH.

También se describe en el presente documento un microorganismo que se transforma para expresar la nueva proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa. El microorganismo transformado puede ser cualquiera de los microorganismos procarióticos y eucarióticos, siempre que se transforme para expresar la proteína que tiene la actividad descarboxilasa correspondiente. Por ejemplo, el microorganismo transformado puede incluir microorganismos de *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., y *Corynebacterium* sp. El microorganismo puede ser específicamente un microorganismo perteneciente a *Escherichia* sp. o *Corynebacterium* sp., y más específicamente, *E. coli* o *Corynebacterium glutamicum*, pero no de manera limitativa.

También se describe en este documento una cepa original del microorganismo transformado que puede ser un microorganismo que tenga una capacidad mejorada para producir lisina, en comparación con un tipo silvestre, pero no de manera limitativa. También se usa en el presente documento, el término "microorganismo que ha mejorado la capacidad de producir lisina, en comparación con un tipo silvestre" que se refiere a un microorganismo que tiene una mayor capacidad para producir lisina, en comparación con un microorganismo natural o una cepa original, y el microorganismo que tiene una capacidad mejorada para producir lisina no está particularmente limitado, siempre que sea un microorganismo que tenga una capacidad mejorada para producir lisina, en comparación con una cepa original.

También se describe en el presente documento, para conferir la capacidad mejorada para producir lisina en comparación con el tipo silvestre, un método general de cultivo de microorganismos, como un método para obtener cepas mutantes auxotróficas, cepas resistentes a análogos, o cepas mutantes de control metabólico que tienen la capacidad de producir lisina, y un método para producir cepas recombinantes que tienen actividades enzimáticas biosintéticas de lisina mejoradas, puede usarse. En el cultivo de microorganismos productores de lisina, características tales como auxotrofia, mutaciones de resistencia a análogos y de control metabólico se pueden conferir solas o en

combinación. La actividad enzimática biosintética de lisina mejorada se puede conferir sola o en combinación. Además, mientras confiere las características tales como auxotrofia, resistencia a análogos y mutaciones de control metabólico, también puede potenciarse al mismo tiempo la actividad enzimática de biosíntesis de lisina. Específicamente, un gen que codifica la enzima biosintética de lisina puede incluir el gen de la dihidrodipicolinato sintasa (dapA), el gen de la aspartoquinasa (lysC), el gen de la dihidrodipicolinato reductasa (dapB), el gen de la diaminopimelato descarboxilasa (lysA), el gen de la diaminopimelato deshidrogenasa (ddh), el gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), el gen de la aspartato aminotransferasa (aspC) y el gen de la aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd), pero no de manera limitativa. Un método para conferir o aumentar la capacidad de producir lisina potenciando la actividad enzimática biosintética de lisina puede realizarse induciendo mutaciones en los genes que codifican las enzimas correspondientes o amplificando los genes para aumentar las actividades enzimáticas intracelulares. Estos métodos pueden realizarse por recombinación genética, pero sin limitarse a los mismos.

El microorganismo puede ser cualquiera de los microorganismos procarióticos y eucarióticos, siempre que tenga una capacidad mejorada para producir lisina, en comparación con el tipo silvestre. Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo de *Escherichia* sp. o un microorganismo *Corineforme*. El microorganismo de *Escherichia* puede ser *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, o *Escherichia vulneris*, pero no de manera limitativa. De manera más específica, el microorganismo *Escherichia* sp. puede ser *Escherichia coli*. El microorganismo *Corineforme* puede incluir un microorganismo de *Corynebacterium* o *Brevibacterium* sp. Además, el microorganismo *Corineforme* puede ser específicamente *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, o *Brevibacterium lactofermentum*, pero no de manera limitativa.

Para transformar el microorganismo de manera que el microorganismo exprese la proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, el gen de la lisina descarboxilasa descrito en el presente documento puede incluirse como la proteína lisina descarboxilasa o como una unidad de expresión génica en el microorganismo a transformar. La unidad de expresión génica de la lisina descarboxilasa puede unirse operativamente a un vector y luego transformarse en el microorganismo o integrarse en el cromosoma del microorganismo. Específicamente, el gen de la lisina descarboxilasa se puede unir operativamente de manera que el gen se sobreexpresa mediante un promotor aguas arriba del codón de iniciación.

Como se usa en el presente documento, el término "unidad de expresión" se refiere a un fragmento que incluye un promotor ligado operativamente a un polinucleótido que codifica una proteína, y puede incluir además 3'-UTL, 5'-UTL, cola poli-A, etc. Como se usa en el presente documento, el término "unidad de expresión" puede ser intercambiable con "casete de expresión".

Como se usa en el presente documento, el término "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre la secuencia de nucleótidos del gen y una secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora, mediante el cual se inicia y media la transcripción del gen que codifica la lisina descarboxilasa, lo que indica que la secuencia de nucleótidos que tiene la actividad promotora está ligada operativamente al gen de la lisina descarboxilasa para controlar la actividad transcripcional del gen de la lisina descarboxilasa.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" significa una acción general de introducir el gen de la lisina descarboxilasa derivado del microorganismo de *Pseudomonas* sp. en una célula huésped, específicamente, un microorganismo de *Escherichia* sp. o un microorganismo *Corineforme*, para la expresión del gen en la célula huésped. En este sentido, el gen de la lisina descarboxilasa es un polinucleótido, incluyendo ADN y ARN, capaz de codificar la lisina descarboxilasa. Siempre que el gen pueda introducirse en la célula huésped y expresarse en ella, se puede introducir en cualquier tipo. Por ejemplo, el gen se puede introducir en la célula huésped en un casete de expresión que es una estructura polinucleotídica que incluye elementos completos para expresar el gen. El casete de expresión incluye un promotor que está ligado operativamente al gen, 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 ser un vector de expresión autorreplicable. El gen también puede introducirse en la célula huésped por sí mismo o en una estructura polinucleotídica para unirse operativamente a la secuencia necesaria para la expresión en la célula huésped. El vector recombinante es un medio por el cual se introduce ADN en la célula huésped para expresar la proteína, y un vector de expresión conocido, como un vector plasmídico, un vector cósmido, un vector bacteriófago, etc. se pueden usar. El vector puede ser preparado fácilmente por los expertos en la materia de acuerdo con cualquier método conocido de uso de una técnica de recombinación de ADN, pero no de manera limitativa.

El método de transformación puede ser cualquier método para introducir el polinucleótido en las células y puede realizarse seleccionando una técnica convencional apropiada conocida en la materia. Por ejemplo, el método puede incluir electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, infección retroviral, microinyección, un método de DEAE-dextrano, un método de liposomas catiónicos, etc., pero no de manera limitativa.

El microorganismo que tiene la capacidad mejorada para producir lisina puede transformarse de manera que se exprese la proteína que tiene la actividad de lisina descarboxilasa descrita en el presente documento, teniendo así una excelente capacidad para producir cadaverina.

También se describe en el presente documento el uso de la nueva lisina descarboxilasa o el microorganismo transformado para expresar la nueva proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa en la producción de cadaverina.

5 La nueva lisina descarboxilasa y el microorganismo transformado para expresar la nueva proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa son los mismos que se han descrito anteriormente. Se confirmó que la lisina descarboxilasa descrita en el presente documento tiene una mayor estabilidad frente a cambios de temperatura o pH que la lisina descarboxilasa derivada de *E. coli* que se ha utilizado comúnmente en la producción de cadaverina. En particular, la nueva lisina descarboxilasa descrita en este documento tiene una mayor estabilidad al pH que la lisina descarboxilasa derivada de *E. coli* y, por lo tanto, es ventajosa en una reacción de conversión de lisina en cadaverina. En consecuencia, la nueva lisina descarboxilasa descrita en el presente documento y el microorganismo transformado para expresar la nueva proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa pueden utilizarse en la producción de cadaverina.

15 También se describe en el presente documento un método para preparar cadaverina.

El método de preparación de cadaverina puede incluir las etapas de convertir la lisina en cadaverina usando la nueva proteína que tiene la actividad de lisina descarboxilasa o el microorganismo transformado para expresar la proteína que tiene la actividad; y recuperar la cadaverina convertida.

20 La nueva proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa y el microorganismo transformado son los mismos que se han descrito anteriormente. El microorganismo transformado puede ser específicamente un microorganismo de *Escherichia* sp.

25 En la etapa de convertir la lisina en cadaverina, la nueva proteína que tiene la actividad de lisina descarboxilasa se extrae del microorganismo que expresa la proteína, y la enzima se purifica y se usa para descarboxilar la lisina, produciendo así cadaverina. Como alternativa, se añade lisina a un cultivo obtenido cultivando el microorganismo transformado, y el microorganismo se utiliza tal cual para descarboxilar la lisina, convirtiendo así la lisina en cadaverina.

30 También se describe en el presente documento un método para preparar cadaverina, incluyendo las etapas de cultivo en un medio del microorganismo que tiene la capacidad de producir cadaverina, en donde el microorganismo que tiene una capacidad mejorada para producir lisina en comparación con el tipo silvestre se transforma para expresar la nueva proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa; y recuperar la cadaverina del microorganismo o del cultivo.

35 La nueva proteína que tiene la actividad de L-lisina descarboxilasa y el microorganismo que tiene la capacidad mejorada para producir lisina, en comparación con el tipo silvestre, son los mismos que los descritos anteriormente.

40 El cultivo se puede realizar en un medio adecuado en condiciones de cultivo que son bien conocidas en la técnica. El medio y las condiciones de cultivo pueden ser modificados fácilmente por cualquier experto en la materia en función del tipo de microorganismo seleccionado. El método de cultivo puede incluir cultivo discontinuo, cultivo continuo, cultivo alimentado por lotes o una combinación de los mismos, pero no de manera limitativa.

El medio puede incluir una variedad de fuentes de carbono, de fuentes de nitrógeno y de elementos traza.

45 Específicamente, por ejemplo, las fuentes de carbono pueden incluir carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes, tales como glicerol y etanol; ácidos orgánicos tales como ácido acético, o combinaciones de los mismos. Específicamente, se puede utilizar glucosa como fuente de carbono, pero no de manera limitativa. Las fuentes de nitrógeno pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, caldo de carne, extracto de malta, licor de maíz (CSL) y harina de soja, fuentes inorgánicas de nitrógeno como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio, o combinaciones de los mismos, pero sin limitarse a los mismos. El medio puede incluir, como fuentes de fósforo, por ejemplo, hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio, y las correspondientes sales que contienen sodio, y sales metálicas tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro, pero no de manera limitativa. Además, aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados pueden incluirse en el medio. El medio o los componentes individuales se pueden añadir al medio en modo discontinuo o en modo continuo.

60 Además, el pH del medio se puede ajustar durante el cultivo agregando un compuesto como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico, o ácido sulfúrico por un método adecuado. La generación de burbujas de aire se puede inhibir durante el cultivo usando un agente antiespumante como éster de poliglicol de ácido graso. Para mantener una condición aeróbica en el medio, puede inyectarse oxígeno o gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo. La temperatura del cultivo puede ser generalmente de 20 °C a 45 °C, por ejemplo, de 25 °C a 40 °C. El cultivo puede continuar hasta que la producción de lisina descarboxilasa alcance el nivel deseado, por ejemplo, durante 10 horas a 160 horas.

65 Un método de recuperación de cadaverina se puede realizar, por ejemplo, recolección o recuperación de la cadaverina

producida del medio mediante un método apropiado conocido en la técnica según un modo discontinuo, un modo continuo o un modo alimentado por lotes. En este método de recuperación, centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio iónico, cristalización, etc. se pueden usar. Por ejemplo, la biomasa se puede eliminar del cultivo mediante centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante resultante se puede purificar mediante cromatografía de intercambio iónico.

Además, el método de preparación de cadaverina puede incluir además el paso de recuperar la lisina descarboxilasa del microorganismo o del medio.

Un método para recuperar la lisina descarboxilasa del microorganismo o del medio se puede realizar mediante, por ejemplo, recolección o recuperación de la lisina descarboxilasa producida del microorganismo o del medio mediante un método apropiado conocido en la técnica según un modo discontinuo, un modo continuo o un modo alimentado por lotes. En este método de recuperación, centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio iónico, cristalización, etc. se pueden usar. Por ejemplo, la biomasa se puede eliminar del cultivo mediante centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante resultante se puede purificar mediante cromatografía de intercambio iónico. Además, la lisina descarboxilasa se puede recuperar a partir de un lisado celular que se obtiene rompiendo el microorganismo en el medio. El lisado celular se puede obtener usando un método apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un homogeneizador físico o un tampón de lisis celular disponible en el mercado. La lisina descarboxilasa puede obtenerse del lisado celular mediante un método apropiado conocido en la técnica, tal como centrifugación, etc.

### Efectos ventajosos de la divulgación

Una nueva proteína con actividad de lisina descarboxilasa derivada de un microorganismo *Pseudomonas* sp., como se describe en el presente documento, puede tener actividad estable incluso con cambios de pH, y por lo tanto, la proteína se puede utilizar eficazmente en una reacción de conversión de lisina en cadaverina, siendo así ampliamente utilizada en la producción de cadaverina.

### Descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un mecanismo de reacción de la lisina descarboxilasa que produce cadaverina a partir de lisina; la FIG. 2 es una imagen de gel SDS-PAGE que muestra los resultados de expresión de la PtLDC y la PtLDC con una etiqueta de his N-terminal; la FIG. 3 muestra la reactividad de la PtLDC de convertir lisina en cadaverina; la FIG. 4 muestra una actividad enzimática relativa de la PtLDC según la variación de temperatura; la FIG. 5 muestra una actividad enzimática relativa de la PtLDC según la variación de pH; la FIG. 6 es una imagen de gel SDS-PAGE que muestra la expresión de la PaLDC y la PrLDC; la FIG. 7 muestra la reactividad de la PaLDC de convertir lisina en cadaverina; la FIG. 8 muestra una actividad enzimática relativa de la PaLDC según la variación de temperatura; la FIG. 9 muestra una actividad enzimática relativa de la PaLDC según la variación de pH; la FIG. 10 muestra la reactividad de la PrLDC de convertir lisina en cadaverina; la FIG. 11 muestra una actividad enzimática relativa de la PrLDC según la variación de temperatura; la FIG. 12 muestra una actividad enzimática relativa de la PrLDC según la variación de pH; la FIG. 13 es una imagen de gel SDS-PAGE que muestra los resultados de expresión de la EclDC, la PpLDC, la PtLDC y la PxLDC; la FIG. 14 muestra la reactividad de la PpLDC de convertir lisina en cadaverina; la FIG. 15 muestra una actividad enzimática relativa de la PpLDC según la variación de temperatura; la FIG. 16 muestra una actividad enzimática relativa de la PpLDC según la variación de pH; la FIG. 17 muestra la reactividad de la PxLDC de convertir lisina en cadaverina; la FIG. 18 muestra una actividad enzimática relativa de la PxLDC según la variación de pH; la FIG. 19 muestra una actividad enzimática relativa de la EclDC y la PtLDC según la variación de temperatura; y la FIG. 20 muestra una actividad enzimática relativa de la EclDC y la PtLDC según la variación de pH.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos.

### Ejemplo 1. Selección de nueva lisina descarboxilasa para producir cadaverina

#### 1-1. Selección de lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas thermotolerans*

Para seleccionar una nueva lisina descarboxilasa para ser utilizada en la producción de cadaverina, un programa BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch\\_h&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch_h&LINK_LOC=blasthome)) proporcionado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), EE.UU. se utilizó para buscar lisina descarboxilasa derivada de una bacteria termófila que tiene una gran similitud con una secuencia peptídica de un sitio activo de lisina descarboxilasa derivada de *E. coli*. De manera detallada, se llevó a cabo una búsqueda mediante BLAST, basada en un total de 31 secuencias peptídicas (GRVEGKVIYETQSTHKLLAAFSQASMIHVKG: SEQ ID NO: 12), cada una de las cuales incluye 15 aminoácidos en

el extremo N-terminal y el extremo C-terminal centrado alrededor de la lisina 367, que es el aminoácido principal de la lisina descarboxilasa derivada de *E. coli*. Como resultado, se confirmó que los microorganismos de *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacteria*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Yersinia*, *Yokenella*, *Raoultella*, *Ceratitis*, *Salmonella*, *Sutterella*, *Shimwellia*, *Vibrio*, y *Pseudomonas* sp. tienen una alta homología. La búsqueda tuvo como objetivo

5 encontrar lisina descarboxilasa que tuviera una alta estabilidad térmica al tiempo que mantuviera una actividad similar a la de la lisina descarboxilasa de *E. coli*. En general, se sabe que las proteínas que se encuentran en las bacterias termófilas tienen una alta estabilidad térmica y, por lo tanto, de los microorganismos encontrados a partir de la búsqueda, se seleccionó *Pseudomonas thermotolerans*, conocido como microorganismo termófilo (46-60 °C).

10 1-2. Selección de lisina descarboxilasa derivada de varios microorganismos de *Pseudomonas* sp.

Para seleccionar lisina descarboxilasas derivadas de microorganismos de *Pseudomonas* sp. distintos de *Pseudomonas thermotolerans*, cuatro microorganismos (*Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas synxantha*) que muestran baja homología entre *Pseudomonas* sp. fueron

15 seleccionados. Los programas de nucleótidos y el genoma proporcionados por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), EE.UU. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se utilizaron para identificar secuencias de nucleótidos y aminoácidos de lisina descarboxilasas derivadas de los microorganismos de las cuatro *Pseudomonas* sp. seleccionados como antes.

20 La siguiente Tabla 1 muestra la homología de la secuencia de aminoácidos de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas* sp.

	PtLDC	PaLDC	PrLDC	PpLDC	PxLDC
PtLDC		87 %	86 %	81 %	84 %
PaLDC	87 %		89 %	80 %	85 %
PrLDC	86 %	89 %		77 %	83 %
PpLDC	81 %	80 %	77 %		84 %
PxLDC	84 %	85 %	83 %	84 %	

PtLDC: lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas thermotolerans* (*P. thermotolerans*)  
 PaLDC: lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas alcaligenes* (*P. alcaligenes*)  
 PrLDC: lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas resinovorans* (*P. resinovorans*)  
 PpLDC: lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas putida* (*P. putida*)  
 PxLDC: lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas synxantha* (*P. synxantha*)

25 **Ejemplo 2. Preparación de *E. coli* a la que se introduce el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas thermotolerans* y análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa expresada a partir del mismo**

2-1. Transformación de *E. coli* con el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas thermotolerans*

30 Para introducir el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas thermotolerans* en *E. coli* y expresar su gen, se realizó la clonación de un gen recombinante. La información genética sobre *Pseudomonas thermotolerans* se obtuvo a partir de datos genómicos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

El ADN genómico de *Pseudomonas thermotolerans* se obtuvo, y luego se usó como plantilla para amplificar un gen

35 de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas thermotolerans* (ptldc) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para realizar la PCR, se usaron cebadores de 5\_LDC\_Ndel (AATATACATATGTACAAAGACCTCCAATTCCCC) (SEQ ID NO: 13) y 3\_LDC\_XhoI (AATATACTCGAGTCAGATCTTGATGCAGTCCACCG) (SEQ ID NO: 14) y ADN polimerasa PfuUltraTM (Stratagene, EE.UU.) para realizar la PCR durante 30 ciclos en condiciones de 94 °C: 30 s, 55 °C: 30 s, y 72 °C: 2 minutos. Como

40 resultado, se obtuvo el ptldc amplificado (SEQ ID NO: 2). Además, para expresar la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas thermotolerans* con una etiqueta de His N-terminal, se usaron los cebadores de 5\_LDC\_BamHI (AATATAGGATCCGTACAAAGACCTCCAATTCCCC) (SEQ ID NO: 15) y 3\_LDC\_SacI (AATATAGAGCTCTCAGATCTTGATGCAGTCCACCG) (SEQ ID NO: 16) para realizar la PCR de la misma manera que el método de PCR anterior. A continuación, cada gen ptldc obtenido de la PCR se insertó en un vector de expresión

45 de *E. coli*, pET-Deut1. Posteriormente, cada plásmido clonado con el gen ptldc se insertó en *E. coli* Rosetta por un método de transformación por choque térmico. Cada uno de los transformados de *E. coli* se cultivó en 50 ml de medio LB líquido (que contenía 50 mg/ml de ampicilina) a 37 °C. Cuando un valor de la DO600 alcanzó 0,8, se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM y se incubó a 18 °C durante 48 horas para inducir la expresión. Cada lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas thermotolerans* (PtLDC) así completamente expresada se

50 identificó mediante SDS-PAGE (FIG. 2). Los resultados de SDS-PAGE mostraron que la PtLDC y la PtLDC con la etiqueta de His expresada a baja temperatura se sobreexpresaron como proteínas solubles (Carriles 2 y 4 de la FIG. 2).

El *E. coli* Rosetta transformado con el plásmido que incluye el ptdc (SEQ ID NO: 2) se designó como '*Escherichia coli* CC04-0055', y se depositó en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (KCCM) el 24 de julio de 2014 con el número de Acceso KCCM11559P.

5 2-2. Análisis de actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas thermotolerans* expresada en *E. coli*

(1) Análisis de la reactividad de la lisina descarboxilasa

10 Para investigar las reactividades de PtLDC y PtLDC con la etiqueta de His, 50 ml de proteína soluble, piridoxal-fosfato 100 mM (piridoxal-fosfato, PLP) y lisina 250 mM se hicieron reaccionar en un volumen de 200 ml a 46 °C durante 2 horas. La solución tampón de reacción era fosfato de sodio 50 mM a pH 6,2. Se utilizó como control un microorganismo en el que se introdujo un vector vacío y se analizaron las cantidades de lisina y cadaverina (FIG. 3). La cromatografía líquida de alta resolución (Waters, Milford, MA) se llevó a cabo para analizar cantidades precisas de lisina y cadaverina en un detector de índice de refracción 2414 (Waters, Milford, MA). El reactivo de lisina-HCl y el reactivo de 1,5-diaminopentano (cadaverina) se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO), y una fase móvil que constaba de ácido cítrico 1 mM, ácido tartárico 10 mM, etilendiamina 24 mM y acetonitrilo al 5 % se utilizó para separar y cuantificar los dos materiales en una columna IonoSpher C3-100 mm, 5 mm. El control no mostró producción de cadaverina. La PtLDC con la etiqueta de His N-terminal mostró una conversión de lisina del 72 %, y la PtLDC mostró una conversión de lisina del 100 %, que indica producción de cadaverina.

(2) Análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa según la temperatura y el pH

25 Para analizar las características enzimáticas de la PtLDC en diversas condiciones de temperatura (30 °C, 42 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C), se compararon las actividades relativas. Cuando se diluyó la PtLDC y se hizo reaccionar con sustrato de lisina 250 mM a 60 °C durante 30 minutos, se encontró que se producía cadaverina 42 mM. En este sentido, las concentraciones de cadaverina se analizaron utilizando tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,2) como solución tampón, y una cantidad igual de la enzima en las mismas condiciones de reacción, salvo que las condiciones de temperatura eran de 30 °C, 42 °C, 50 °C, 70 °C y 80 °C, y se comparó con la cantidad de cadaverina producida a una temperatura de reacción de 60 °C (FIG. 4). Tal como se muestra en la FIG. 4, la PtLDC mostró la mayor actividad a 60 °C. Además, la PtLDC mantuvo el 80 % o más de la actividad a una temperatura de 55 °C-65 °C.

30 Adicionalmente, la actividad de la lisina descarboxilasa se evaluó en diversas condiciones de pH (6,2, 7,0, 8,0 y 9,0). La condición de temperatura se fijó en 60 °C y se usó una cantidad igual de la enzima en las mismas condiciones de reacción, salvo que se usaron tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,2), tampón tris 50 mM (pH 7,0), tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 8,0) y tampón tris 50 mM (pH 9,0). Se compararon las reactividades de la lisina descarboxilasa a diferentes pH (FIG. 5). La PtLDC mostró la mayor actividad a pH 8,0 y mantuvo el 90 % o más de la actividad de pH 6 a pH 9. Se comparó una cantidad de cadaverina producida en cada condición de pH con la de cadaverina producida a pH 8 (FIG. 5). El resultado experimental mostró que la PtLDC tiene una alta estabilidad frente a cambios de pH o pH elevado.

**Ejemplo 3. Preparación de *E. coli* a la que se introduce el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas alcaligenes* y análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa expresada a partir del mismo**

45 3-1. Transformación de *E. coli* con el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas alcaligenes*

50 Para clonar un gen de lisina descarboxilasa (paldc) derivado de *Pseudomonas alcaligenes*, se utilizaron los cebadores de 5\_PaLDC\_NdeI (AATATACATATGTACAAAGACCTGAA GTTCCCCATCC) (SEQ ID NO: 17) y 3\_PaLDC\_XhoI (AATATACTCGAGTCACTCCCTTATGCAATCAACGGTATAGC) (SEQ ID NO: 18) y ADN genómico purificado de *Pseudomonas alcaligenes* como plantilla para realizar la PCR. Se usó ADN polimerasa Pfu como polimerasa y se realizó la PCR durante 30 ciclos en condiciones de 94 °C: 30 s, 55 °C: 30 s, y 72 °C: 2 minutos. Como resultado, se obtuvo un gen paldc amplificado (SEQ ID NO: 4).

55 El gen paldc obtenido se expresó a baja temperatura en *E. coli* de la misma manera que en el Ejemplo 2-1, y se identificó por SDS-PAGE (FIG. 6). Tal como se muestra en la FIG. 6, la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas alcaligenes* (PaLDC) se expresó principalmente como proteína insoluble, y no se observó proteína soluble en el gel SDS-PAGE (FIG. 6, véanse Carriles 1 y 2).

60 3-2. Análisis de actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas alcaligenes* expresada en *E. coli*

(1) Análisis de la reactividad de la lisina descarboxilasa

65 Para investigar la reactividad de la PaLDC, un lisado celular de PaLDC obtenido en el Ejemplo 3-1 se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos para obtener un sobrenadante (proteína soluble), que se utilizó en la conversión de lisina. 50 µl de la proteína soluble, PLP 100 mM y lisina 250 mM se hicieron reaccionar en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,2) en un volumen de reacción de 200 µl a 46 °C durante 2 horas. Como resultado, se encontró que el

70 % de la lisina se convertía en cadaverina por PaLDC (FIG. 7).

(2) Análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa según la temperatura y el pH

5 Para encontrar una condición de temperatura óptima para la actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas alcaligenes*, las actividades enzimáticas se evaluaron en condiciones de temperatura de 30 °C, 40 °C, 46 °C y 60 °C de la misma manera que en el Ejemplo 2-2. Como resultado, se encontró que la PaLDC tenía la actividad más alta a 50 °C (FIG. 8).

10 La actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas alcaligenes* se evaluó en diferentes condiciones de pH de la misma manera que en el Ejemplo 2-2. Como resultado, la PaLDC tuvo la mayor estabilidad a pH 8 y pH 9, y mantuvo el 95 % o más de la actividad a pH 6 (FIG. 9).

15 **Ejemplo 4. Preparación de *E. coli* a la que se introduce el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas resinovorans* y análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa expresada a partir del mismo**

4-1. Transformación de *E. coli* con el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas resinovorans*

20 Para clonar un gen de lisina descarboxilasa (prldc) derivado de *Pseudomonas resinovorans*, se utilizaron los cebadores de 5\_PrLDC\_NdeI (AATATACATATGTACAAAGAGCTC AAGTTCCCGTCCTC) (SEQ ID NO: 19) y 3\_PrLDC\_XhoI (AATATACTCGAG TTATCCCTGATGCAGTCCACTGTA TAGC) (SEQ ID NO: 20) y ADN genómico purificado de *Pseudomonas resinovorans* como plantilla para realizar la PCR. La PCR se realizó utilizando la misma polimerasa en las mismas condiciones de PCR que en el Ejemplo 3-1. Como resultado, se obtuvo el prldc amplificado (SEQ ID NO: 6).

25 El gen prldc obtenido se expresó a baja temperatura en *E. coli* de la misma manera que en el Ejemplo 2-1, y se identificó por SDS-PAGE (FIG. 6; Carriles 3 y 4). Como resultado, se encontró que la PrLDC apenas se expresaba a baja temperatura.

30 4-2. Análisis de actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas resinovorans* expresada en *E. coli*

(1) Análisis de la reactividad de la lisina descarboxilasa

35 Para investigar la reactividad de la lisina descarboxilasa (PrLDC) derivada de *Pseudomonas resinovorans*, un lisado celular de PrLDC obtenido en el Ejemplo 4-1 se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos para obtener un sobrenadante, que se utilizó en la conversión de lisina. 50 µl de la proteína soluble, PLP 100 mM y lisina 250 mM se hicieron reaccionar en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,2) en un volumen de reacción de 200 µl a 46 °C durante 2 horas. Como resultado, se produjo un 66 % de cadaverina (FIG. 10).

40 (2) Análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa según la temperatura y el pH

Para encontrar una condición de temperatura óptima para la actividad de la PrLDC, las actividades enzimáticas se evaluaron en condiciones de temperatura de 30 °C, 40 °C, 46 °C y 60 °C de la misma manera que en el Ejemplo 2-2. Como resultado, se encontró que la PrLDC tenía la actividad más alta a 60 °C (FIG. 11).

45 La actividad de la PrLDC en diferentes condiciones de pH se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo 2-2. Como resultado, la PrLDC tuvo la mayor estabilidad a pH 6 y mantuvo el 90 % o más de la actividad a pH 9 (FIG. 12).

50 **Ejemplo 5. Preparación de *E. coli* a la que se introduce el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas putida* y análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa expresada a partir del mismo**

5-1. Transformación de *E. coli* con el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas putida*

55 Para clonar un gen de lisina descarboxilasa (ppldc) derivado de *Pseudomonas putida*, se utilizaron los cebadores de 5\_PpLDC\_NdeI (AATATACATATGTACAAAGACCTCCAA TTCCCC) (SEQ ID NO: 21) y 3\_PpLDC\_XhoI (AATATACTCGAGTCACTCCCTTATGCAATCAACGGTATAGC) (SEQ ID NO: 22) y ADN genómico purificado de *Pseudomonas putida* como plantilla para realizar la PCR. Se usó ADN polimerasa Pfu como polimerasa y se realizó la PCR durante 30 ciclos en condiciones de 94 °C: 30 s, 55 °C: 30 s, y 72 °C: 2 minutos. Como resultado, se obtuvo un gen ppldc amplificado (SEQ ID NO: 8).

60 El gen ppldc obtenido se expresó a baja temperatura en *E. coli* de la misma manera que en el Ejemplo 2-1, y se identificó por SDS-PAGE (FIG. 13). Como se muestra en los Carriles 3 y 4 y en la FIG. 13, se encontró que la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas putida* (PpLDC) apenas se expresaba a baja temperatura.

65 Se centrifugó un lisado celular a 13.000 rpm durante 15 minutos y se usó un sobrenadante en una reacción de conversión de lisina.

5-2. Análisis de actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas putida* expresada en *E. coli*

(1) Análisis de la reactividad de la lisina descarboxilasa

5 Para investigar la reactividad de la PpLDC, el lisado celular de PpLDC obtenido en el Ejemplo 5-1 se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos para obtener un sobrenadante, que se utilizó en la conversión de lisina. 50 µl de la proteína soluble, PLP 100 mM y lisina 250 mM se hicieron reaccionar en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,2) en un volumen de reacción de 200 µl a 46 °C durante 2 horas. Como resultado, se produjo un 16 % de cadaverina (FIG. 14).

(2) Análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa según la temperatura y el pH

15 Para encontrar una condición de temperatura óptima para la actividad de la PpLDC, las actividades enzimáticas se evaluaron en condiciones de temperatura de 50 °C, 60 °C y 70 °C de la misma manera que en el Ejemplo 2-2. Como resultado, se encontró que la PpLDC tenía la mayor actividad a 50 °C (FIG. 15).

20 La actividad de la PpLDC en diferentes condiciones de pH se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo 2-2. Como resultado, la PpLDC mostró la mayor actividad a pH 6, y su reactividad disminuyó al aumentar el pH (FIG. 16).

**Ejemplo 6. Preparación de *E. coli* a la que se introduce el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas synxantha* y análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa expresada a partir del mismo**

6-1. Transformación de *E. coli* con el gen de la lisina descarboxilasa derivado de *Pseudomonas synxantha*

25 Para clonar un gen de lisina descarboxilasa (pxldc) derivado de *Pseudomonas synxantha*, se utilizaron los cebadores de 5\_PxLDC\_NdeI (AATATACATATGTACAAAGACCTCCAA TTCCCC) (SEQ ID NO: 23) y 3\_PxLDC\_XhoI (AATATACTCGAGTCACTCCCTTATGCAATCAACGGTATAGC) (SEQ ID NO: 24) y ADN genómico purificado de *Pseudomonas synxantha* como plantilla para realizar la PCR. Se usó ADN polimerasa Pfu para la amplificación génica y se realizó la PCR durante 30 ciclos en condiciones de 94 °C: 30 s, 45 °C: 30 s, y 72 °C: 2 min para obtener pxldc amplificado (SEQ ID NO: 10).

35 El gen pxldc obtenido se expresó a baja temperatura en *E. coli* de la misma manera que en el Ejemplo 2-1, y se identificó por SDS-PAGE (FIG. 13). Como se muestra en los Carriles 7 y 8 y en la FIG. 13, se encontró que la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas synxantha* (PxLDC) se sobreexpresaba como proteína soluble a baja temperatura.

6-2. Análisis de actividad de la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas synxantha* expresada en *E. coli*

40 (1) Análisis de reactividad de la PxLDC

45 Para investigar la reactividad de la PxLDC, el lisado celular de PxLDC obtenido en el Ejemplo 6-1 se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos para obtener un sobrenadante, que se utilizó en la conversión de lisina. 50 µl de la proteína soluble, PLP 100 mM y lisina 250 mM se hicieron reaccionar en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,2) en un volumen de reacción de 200 µl a 46 °C durante 2 horas. Como resultado, se produjo un 25 % de cadaverina (FIG. 17).

(2) Análisis de la actividad de la lisina descarboxilasa según el pH

50 Para encontrar una condición de pH óptima para PxLDC, las actividades enzimáticas se evaluaron bajo diferentes condiciones de pH de la misma manera que en el Ejemplo 2-2 (FIG. 18). Como resultado, la PxLDC mostró la mayor actividad a pH 6 y su reactividad disminuyó con el aumento del pH.

**Ejemplo 7. Comparación de la actividad entre la lisina descarboxilasa derivada de *E. coli* y la lisina descarboxilasa derivada de *Pseudomonas thermotolerans***

7-1. Clonación y expresión de lisina descarboxilasa derivada de *E. coli*

60 Un gen de la lisina descarboxilasa de *E. coli*, cadA, se clonó para expresar EcLDC (SEQ ID NO: 11). La homología entre las secuencias de aminoácidos de PtLDC y EcLDC es del 36 %. Se insertó un plásmido clonado con el gen cadA en *E. coli* K-12 BL21, y se incubó a 37 °C durante 4 horas para inducir la expresión. La EcLDC así completamente expresada se identificó mediante SDS-PAGE (FIG. 13; Carriles 1 y 2). Como resultado, se encontró que la EcLDC se sobreexpresaba como proteína soluble.

65 7-2. Comparación de la actividad enzimática relativa entre la EcLDC y la PtLDC

## (1) Comparación de la actividad según la temperatura

Se comparó la actividad enzimática relativa (actividad relativa) entre la EcLDC y la PtLDC en diversas condiciones de temperatura (37 °C, 42 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C) de la misma manera que en el Ejemplo 2-2 (FIG. 19).

Como resultado, se encontró que tanto la EcLDC como la PtLDC mostraban la mayor actividad a 60 °C. La EcLDC tenía una actividad relativa del 54 % a 50 °C (cuando la actividad de la EcLDC a 60 °C se tomó como el 100 %), y la EcLDC tenía una actividad relativa del 12 % a 80 °C. La PtLDC tenía una actividad relativa del 76 % a 50 °C (cuando la actividad de la PtLDC a 60 °C se tomó como el 100 %), y la PtLDC tenía una actividad relativa del 19 % a 80 °C. Se encontró que la actividad de la PtLDC se mantenía bien a alta temperatura. En conclusión, ambas enzimas mostraron una gran diferencia en sus actividades dependiendo de la temperatura, y la actividad relativa de la PtLDC se mantuvo bien, en comparación con la EcLDC.

## (2) Comparación de la actividad según el pH

Adicionalmente, la actividad se evaluó en diversas condiciones de pH (6,2, 7,4, 8,0 y 9,0) de la misma manera que en el Ejemplo 2-2 (FIG. 20). Como resultado, la EcLDC mostró la mayor actividad a pH 6, y la actividad enzimática de la EcLDC disminuyó considerablemente al aumentar el pH. A pH 9, la EcLDC mantuvo el 50 % de la actividad. Por el contrario, la PtLDC no mostró grandes cambios en la actividad según el pH, y la PtLDC mantuvo el 90 % o más de la actividad a pH 6,2-9. En consecuencia, se evaluó que la PtLDC mostraba mayor estabilidad frente a la temperatura y el pH que la EcLDC.

## (3) Comparación de actividad entre la PtLDC y la EcLDC

Cuando se cuantificaron las proteínas PtLDC y EcLDC para evaluar la actividad específica (unidad/mg), la PtLDC mostró un valor de 10060 (unidad/mg) y la EcLDC mostró un valor de 36335 (unidad/mg). Cuando se compararon sus reactividades, la EcLDC mostró una actividad aproximadamente 3,6 veces mayor que la PtLDC. Además, cuando se comparó una temperatura óptima entre las enzimas, ambas enzimas mostraron reacciones óptimas a 60 °C, y sus actividades disminuyeron considerablemente con la variación de la temperatura. Sin embargo, cuando se compararon las condiciones óptimas de pH, la EcLDC mostró una mayor inactividad específica al aumentar el pH, y la PtLDC no mostró grandes cambios en la actividad enzimática según el cambio de pH.

La EcLDC tiene mayor actividad que la PtLDC. Sin embargo, la actividad de la EcLDC puede estar muy influenciada por el cambio de pH, a medida que aumenta el pH por reacción de la lisina descarboxilasa. La PtLDC tiene mayor estabilidad frente al pH que la EcLDC, lo cual es ventajoso en la reacción de conversión de lisina. La producción comercial de cadaverina por bioconversión de lisina requiere ajuste de pH por tratamiento con ácido, pero la PtLDC puede mitigar la necesidad de titulación del pH. Se espera que puedan reducirse los costes de producción requeridos para la bioconversión de cadaverina.

Institución depositaria: El Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (KCCM, por sus siglas en inglés)

Número de acceso: KCCM11559P  
Fecha del depósito: 20140724

ES 2 949 045 T3

Referencia de archivo del solicitante o del agente	N.º de solicitud internacional
--	--------------------------------

**INDICACIONES RELATIVAS A UN MICROORGANISMO  
U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO**

(Regla 13bis del PCT)

**A.** Las siguientes indicaciones están relacionadas con el microorganismo u otro material biológico depositado al que se haga referencia en la descripción en la página 20, línea 10-12.

**B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO** Se identifican más depósitos en hojas adicionales

Nombre de la institución depositaria  
Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)

Dirección de la institución depositaria *(incluyendo el código postal y el país)*  
120-861  
Yurim B/D 45,  
Hongjengae-2ga-gil  
Seodaemun-gu  
SEÚL, República de Corea

Fecha del depósito 2014.07.24	Número de acceso KCCM11559P
----------------------------------	--------------------------------

**C. INDICACIONES ADICIONALES** *(deje el espacio en blanco si no procede)*  
La información continúa en una página adicional

Escherichia coli CC04-0055

**D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN LAS INDICACIONES** *(si las indicaciones no son para todos los estados designados)*

**E. ENTREGA INDEPENDIENTE DE INDICACIONES** *(deje el espacio en blanco si no procede)*

Las indicaciones enumeradas a continuación se entregarán a la Oficina Internacional más tarde *(especifique la naturaleza general de las indicaciones (p. ej. "número de acceso del depósito"))*.

Para uso exclusivo de la Oficina receptora	Para uso exclusivo de la Oficina Internacional
<input type="checkbox"/> Esta página se recibió junto con la solicitud internacional	<input type="checkbox"/> La Oficina Internacional recibió esta página el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1998, reimpresso en enero de 2004)

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo que se transforma con un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha proteína es de *Pseudomonas sp.*, y el microorganismo es un microorganismo de *Escherichia sp.*
- 10 2. Un microorganismo que tiene la capacidad de producir cadaverina, en donde el microorganismo se transforma con un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa, dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha proteína es de *Pseudomonas sp.*, y el microorganismo es un microorganismo de *Escherichia sp.*
- 15 3. Un método de preparación de cadaverina, que comprende las etapas de:  
convertir lisina en cadaverina mediante el uso de una proteína que tiene actividad de lisina descarboxilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha proteína es de *Pseudomonas sp.* o el microorganismo de la reivindicación 1; y  
20 recuperar la cadaverina convertida.
- 25 4. Un método de preparación de cadaverina, que comprende las etapas de:  
cultivar el microorganismo de la reivindicación 2 en un medio; y  
recuperar la cadaverina del microorganismo o del medio.
5. El microorganismo de la reivindicación 1 o 2, en donde el polinucleótido tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia con la misma.
- 30 6. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde el polinucleótido tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia con la misma.

FIG. 1

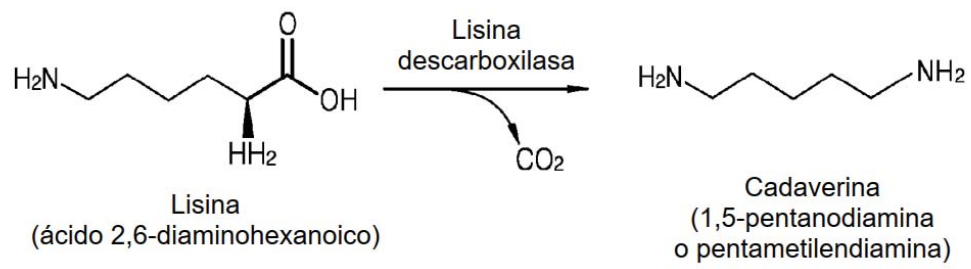
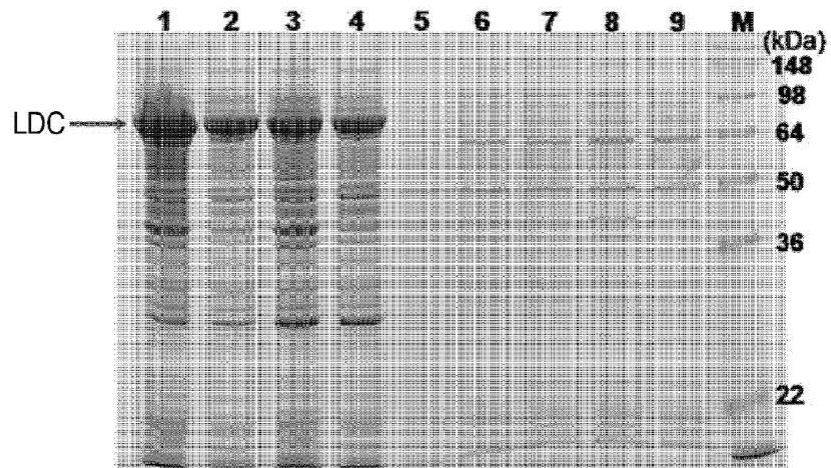


FIG. 2



- 1: Expresión de His-PtLDC a 18 °C (lisado celular)
- 2: Expresión de His-PtLDC a 18 °C (proteína soluble)
- 3: Expresión de PtLDC a 18 °C (lisado celular)
- 4: Expresión de PtLDC a 18 °C (proteína soluble)
- 5: Expresión de His-PtLDC con chaperonas a 37 °C (lisado celular)
- 6: Expresión de His-PtLDC con chaperonas a 37 °C (lisado celular)
- 7: Expresión de His-PtLDC con chaperonas a 37 °C (proteína soluble)
- 8: Expresión de PtLDC con chaperonas a 37 °C (lisado celular)
- 9: Expresión de PtLDC con chaperonas a 37 °C (proteína soluble)
- M: marcador

FIG. 3

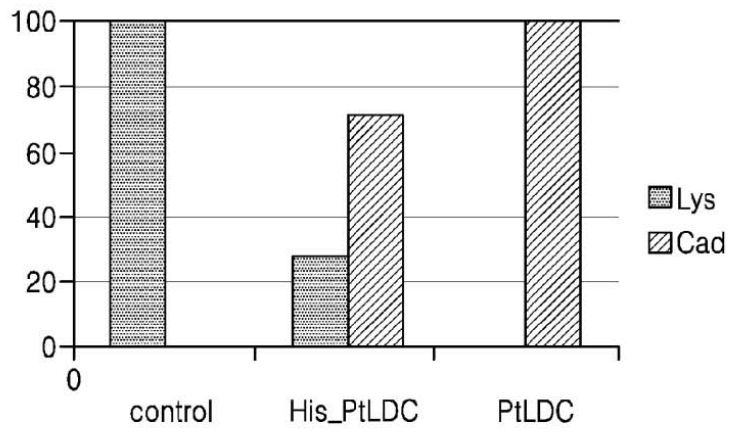


FIG. 4

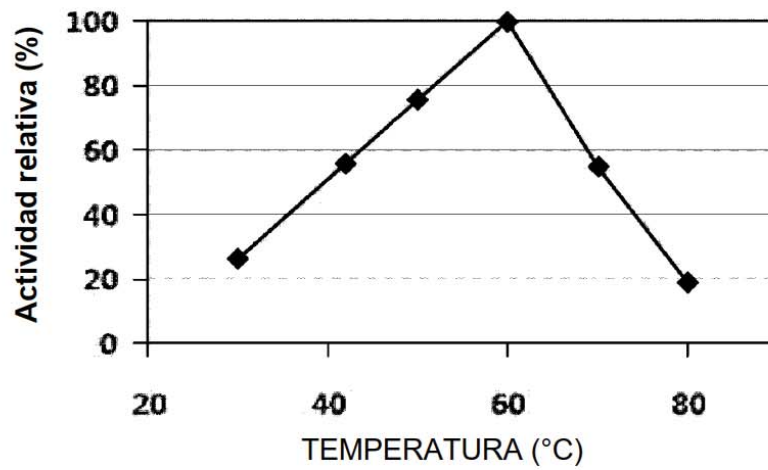


FIG. 5

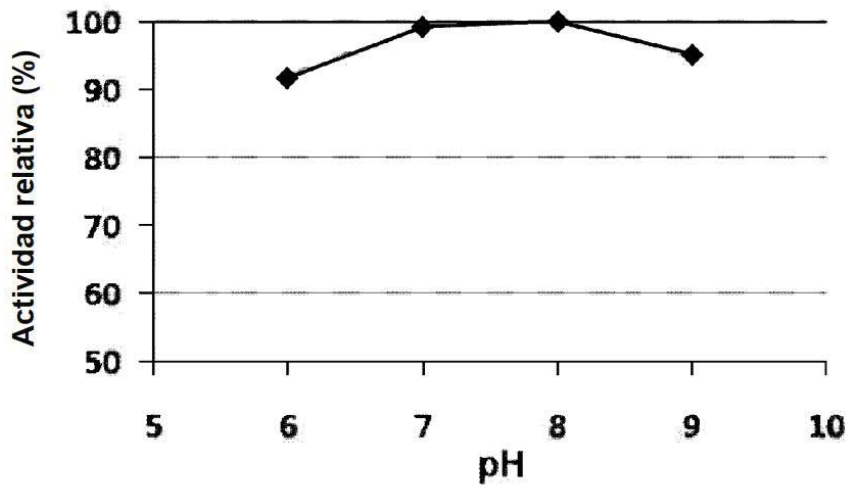
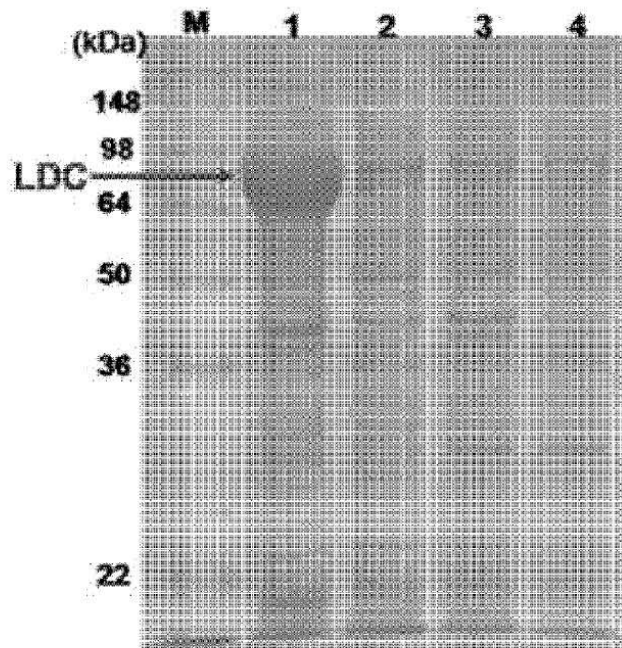


FIG. 6



- M: marcador
- 1: Expresión de PaLDC (lisado celular)
- 2: Expresión de PaLDC (proteína soluble)
- 3: Expresión de PrLDC (lisado celular)
- 4: Expresión de PrLDC (proteína soluble)

FIG. 7

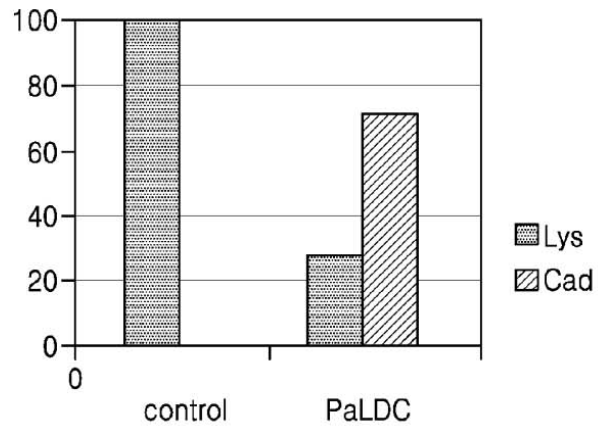


FIG. 8

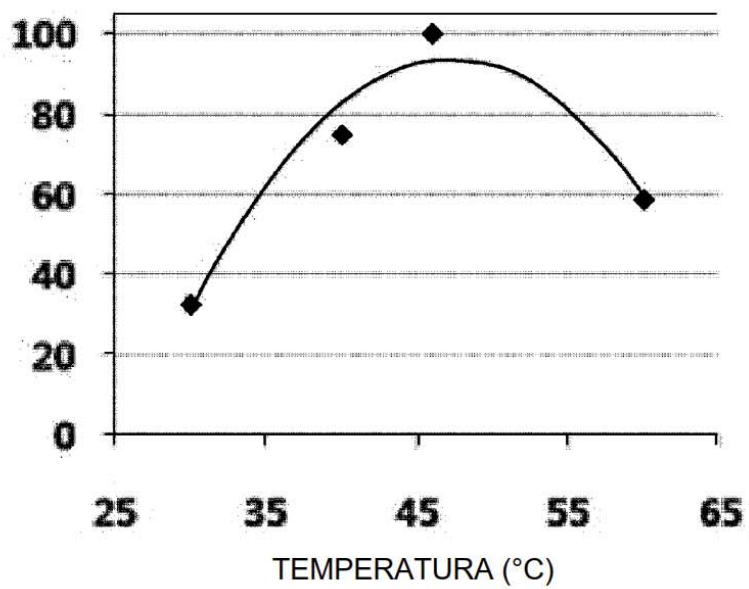


FIG. 9

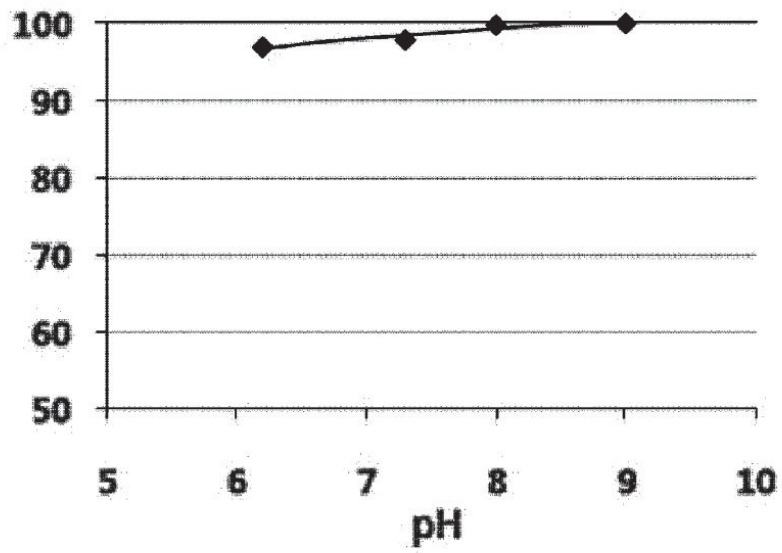


FIG. 10

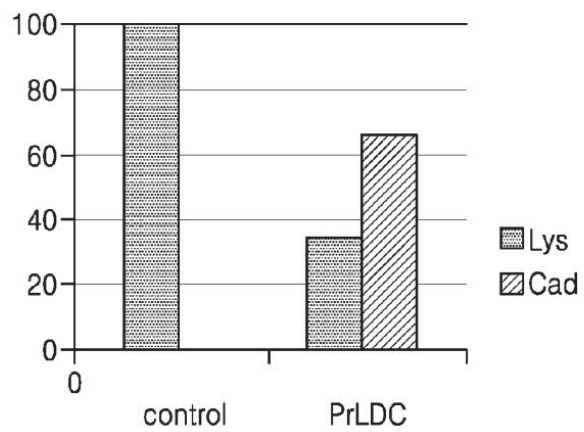


FIG. 11

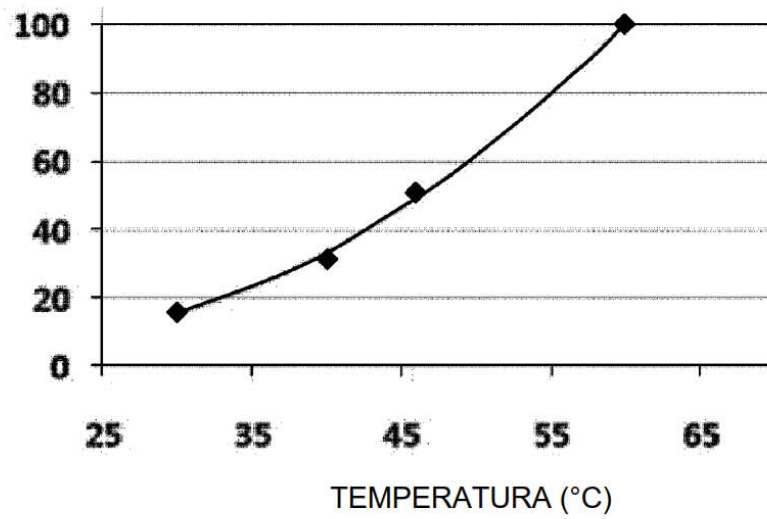


FIG. 12

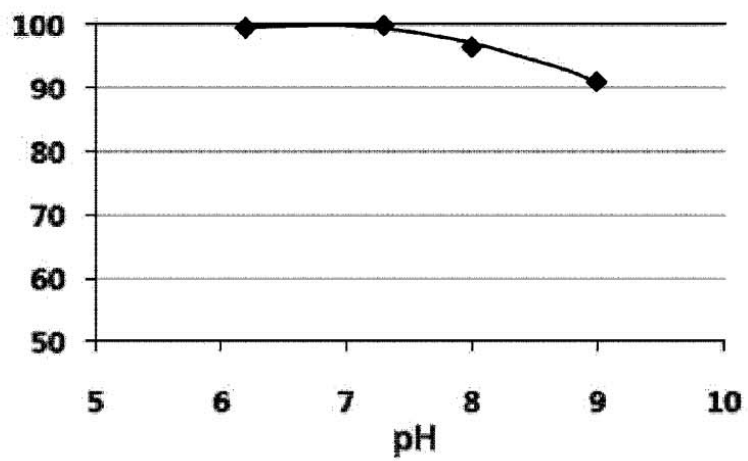
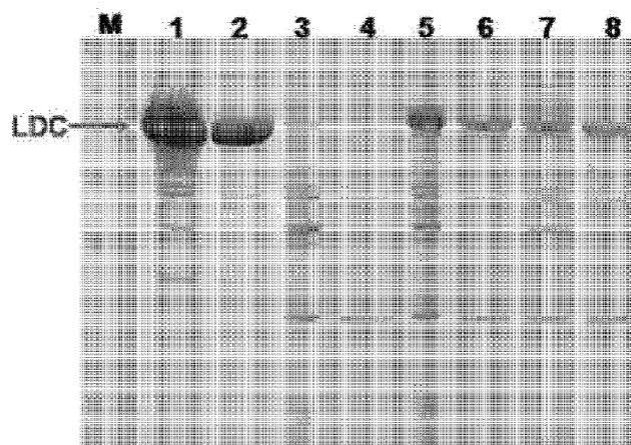


FIG. 13



M: marcador

- 1: Expresión de EcLDC (lisado celular)
- 2: Expresión de EcLDC (proteína soluble)
- 3: Expresión de PpLDC (lisado celular)
- 4: Expresión de PpLDC (proteína soluble)
- 5: Expresión de PtLDC (lisado celular)
- 6: Expresión de PtLDC (proteína soluble)
- 7: Expresión de PxLDC (lisado celular)
- 8: Expresión de PxLDC (proteína soluble)

FIG. 14

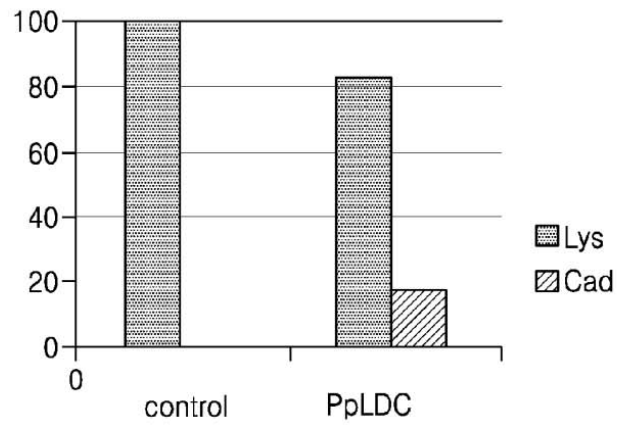


FIG. 15

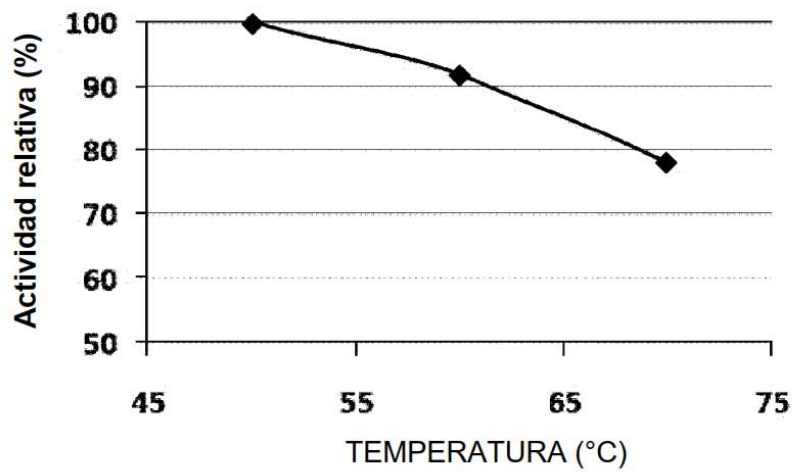


FIG. 16

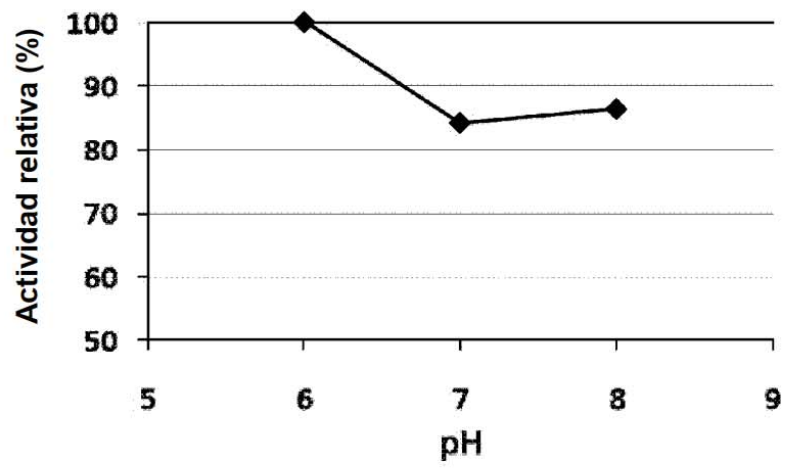


FIG. 17

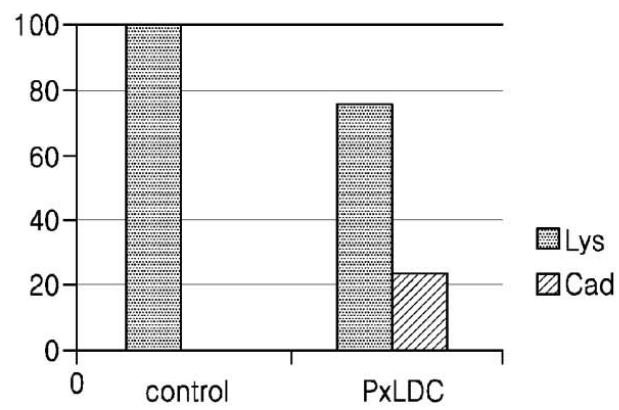


FIG. 18

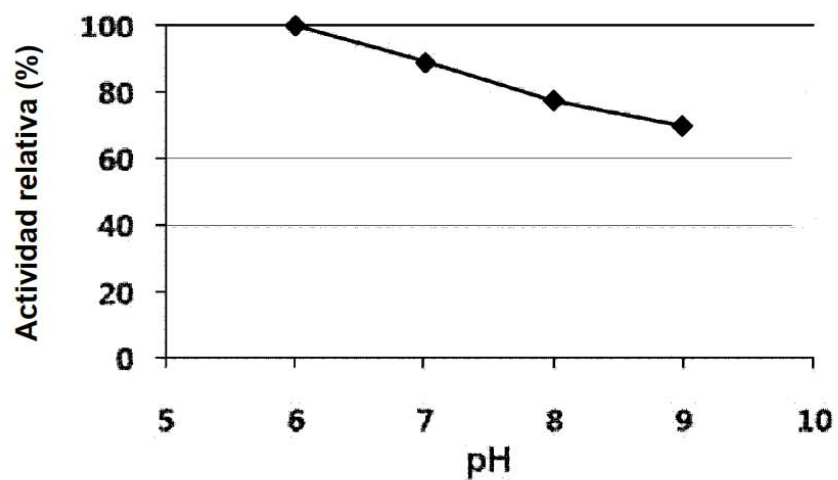


FIG. 19

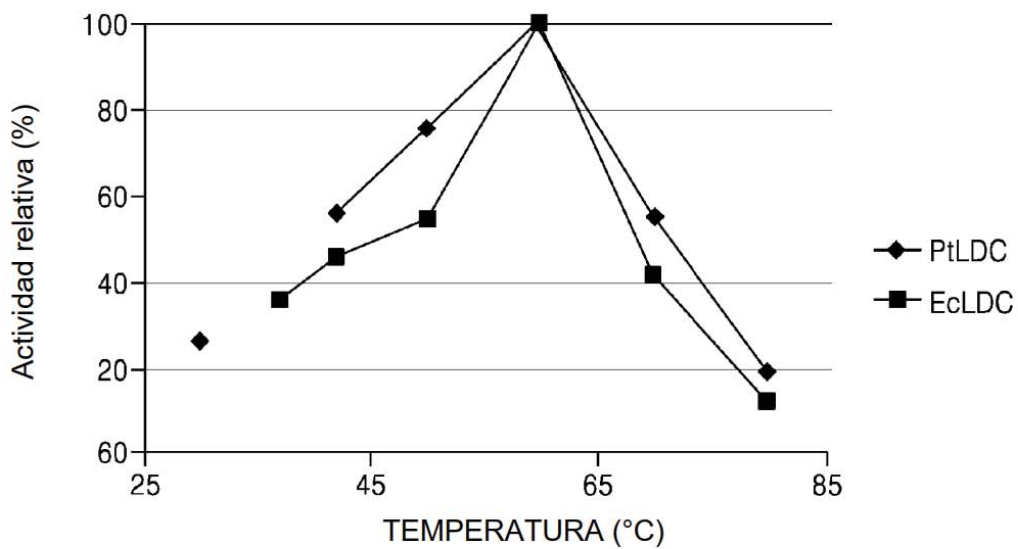


FIG. 20

