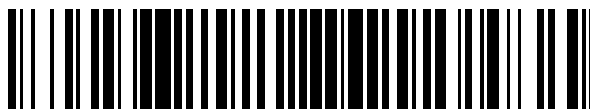


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 536**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2003** **E 03795322 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013** **EP 1548110**

54 Título: **Cepa productora de transglutaminasa**

30 Prioridad:

10.09.2002 JP 2002263834

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

04.12.2013

73 Titular/es:

AMANO ENZYME INC. (100.0%)
2-7, Nishiki 1-chome, Naka-ku Nagoya-shi
Aichi 460-0003, JP

72 Inventor/es:

YUUKI, KENSUKE y
WASHIZU, KINYA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 432 536 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 productora de transglutaminasa

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a una cepa que produce transglutaminasa derivada de actinomicetos y a un proceso para producir la transglutaminasa usando la cepa.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] La transglutaminasa es una enzima que cataliza una reacción de transferencia de acilo de un grupo γ -carboxamida de un resto de glutamina en una cadena peptídica. En particular, la transglutaminasa induce la formación intramolecular o intermolecular de entrecruzamiento ϵ -(γ -Gln)-Lys a un grupo ϵ -amino de un resto de lisina en una proteína. La enzima ha sido ampliamente utilizada para el procesamiento de proteínas usando esta propiedad en los campos de la alimentación y la medicina.

[0003] Desde hace mucho tiempo se conoce la transglutaminasa derivada de animales. Se ha publicado que se han encontrado transglutaminasas en animales, por ejemplo, en el hígado de cobayas y en órganos y en la sangre de mamíferos (Connellan y col., Journal of Biological Chemistry, vol. 246, N.º 4, pág. 1093-1098 (1971)), Folk y col., Advances in Enzymology, vol. 38, pág. 109-191 (1973)) y Folk y col., Advances in Protein Chemistry, vol. 31, pág. 1-133 (1977)) y se han estudiado sus propiedades enzimáticas. Por otro lado, se ha encontrado un tipo diferente de transglutaminasa que no es dependiente de calcio (Ca^{2+}) y es, por tanto, diferente de la transglutaminasa derivada de animales mencionada anteriormente. Específicamente, se ha aislado e identificado una transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* [nombre anterior: *Sireptovercillium mobaraense*] IFO 13819 (publicación de patente japonesa sin examinar N.º S64-27471), de *Streptomyces griseocarneus* [nombre anterior: *Streptovercillium griseocarneum*] IFO 12776 y de *Streptomyces cinnamoneus* [nombre anterior: *Streptovercillium cinnamoneum*] IFO 12852 (publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2001-186884), etc.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0004] Convencionalmente, puesto que la transglutaminasa se ha producido mediante extracción y aislamiento, etc., a partir de animales, microorganismos y similares, que están presentes en la naturaleza, hay muchos problemas que resolver como un bajo rendimiento de producción y un coste de producción caro, etc. Entre tanto, para la transglutaminasa derivada de microorganismos se ha estudiado intensamente el proceso de producción usando recombinación genética. Por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 1 225 217 A1 se describe un procedimiento de producción secretora de transglutaminasa mediante un microorganismo usando un plásmido de expresión que contiene un gen de transglutaminasa de una bacteria *Streptomyces* bajo el control de su promotor nativo. De forma similar, en la solicitud de patente europea EP 0 481 504 se describe la clonación del gen de la transglutaminasa a partir de *Streptovercillium sp.*, y la expresión recombinante de la enzima en un huésped microbiano. Sin embargo, según la primera publicación de un proceso usando recombinación genética (Biosci. Biotech. Biochem., 58,82-87 (1994), publicación de patente japonesa sin examinar N.º His-199883), la cantidad de producción fue de aproximadamente 0,1 mg/l, lo que estaba lejos del nivel de producción industrial. Además, según la notificación reciente (publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2001-186884) aunque el nivel de producción se mejoró en cierto grado, el cultivo microbiano de dos semanas dio lugar a una productividad de sólo aproximadamente 40 a 50 mg/l. En este caso, tampoco puede decirse que se obtuviera una productividad suficiente.

[0005] La presente invención se hizo en base a los antecedentes mencionados anteriormente y el objeto de la presente invención es proporcionar una cepa capaz de producir transglutaminasa con una alta eficacia y un proceso para producir la transglutaminasa usando la cepa.

[0006] Para solucionar los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han investigado con avidez. Esto significa que, para expresar la transglutaminasa derivada de actinomicetos, los presentes inventores han investigado la combinación de un gen estructural de la transglutaminasa, un promotor, un vector y un huésped actinomiceto. Como resultado, los presentes inventores han obtenido con éxito un transformante que tiene una productividad extremadamente alta de transglutaminasa y han completado la presente invención. Por consiguiente, la presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. En esta se describe:

- [1] Un transformante de *Streptomyces mobaraensis*, que comprende un gen estructural de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis* y un promotor y un terminador que actúan sobre el gen estructural los cuales se introducen de forma externa.
- 5 [2] El transformante de *Streptomyces mobaraensis* según [1], en el que el promotor es un promotor de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
- [3] El transformante de *Streptomyces mobaraensis* descrito en [1] o [2], en el que el terminador es un terminador de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
- 10 [4] El transformante de *Streptomyces mobaraensis* descrito en cualquiera de los puntos [1] a [3], en el que el gen estructural comprende una secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.
- 15 [5] Un transformante de *Streptomyces mobaraensis* que comprende un fragmento de ADN que tiene una secuencia introducida de forma externa mostrada en la SEC ID N.º 2 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.
- 20 [6] El transformante de *Streptomyces mobaraensis* descrito en cualquiera de los puntos [1] a [5], que es un transformante de *Streptomyces mobaraensis* S-8112 o una cepa mutante del mismo.
- [7] Un proceso para la producción de transglutaminasa que comprende las etapas de:
- 25 cultivar el transformante de *Streptomyces mobaraensis* que comprende un gen estructural de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis* y un promotor y un terminador que actúan sobre el gen estructural y que se introducen de forma externa, en las condiciones en las que el gen estructural puede expresarse y recoger la transglutaminasa producida.
- 30 [8] El transformante de *Streptomyces mobaraensis* según [7], en el que el promotor es un promotor de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
- [9] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en los puntos [7] u [8], en el que el terminador es un terminador de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
- 35 [10] El proceso para la producción de transglutaminasa en cualquiera de los puntos [7] a [9], en el que el gen estructural comprende una secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.
- 40 [11] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en cualquiera de los puntos [7] a [9], en el que el transformante de *Streptomyces mobaraensis* comprende un fragmento de ADN que tiene una secuencia introducida de forma externa mostrada en la SEC ID N.º 2 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.
- 45 [12] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en cualquiera de los puntos [7] a [11], en el que el transformante de *Streptomyces mobaraensis* es un transformante de *Streptomyces mobaraensis* S-8112 o una cepa mutante del mismo.
- [13] Un transformante de *Streptomyces lividans* que comprende un gen estructural de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis* y un promotor y un terminador que actúan sobre el gen estructural los cuales se introducen de forma externa.
- 50 [14] El transformante de *Streptomyces lividans* descrito en el punto [13], en el que el promotor es un promotor de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
- 55 [15] El transformante de *Streptomyces lividans* descrito en el punto [13] o [14], en el que el terminador es un terminador de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
- [16] El transformante de *Streptomyces lividans* descrito en cualquier de los puntos [13] a [15], en el que el gen

estructural comprende una secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.

[17] Un transformante de *Streptomyces lividans* que comprende un fragmento de ADN que tiene una secuencia introducida de forma externa mostrada en la SEC ID N.º 2 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.

[18] El transformante de *Streptomyces lividans* descrito en cualquiera de los puntos [13] a [17], que es un transformante de *Streptomyces lividans* 3131 o una cepa mutante del mismo.

[19] Un proceso para la producción de transglutaminasa que comprende las etapas de:

cultivar el transformante de *Streptomyces lividans* que comprende un gen estructural de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis* y un promotor y un terminador que actúan sobre el gen estructural y que se introducen de forma externa, en las condiciones en las que el gen estructural puede expresarse y recoger la transglutaminasa producida.

[20] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en el punto [19], en el que el promotor es un promotor de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.

[20] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en los puntos [19] o [20], en el que el terminador es un terminador de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.

[22] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en cualquier de los puntos [19] a [21], en el que el gen estructural comprende una secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.

[23] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en cualquier de los puntos [19] a [21], en el que el gen transformante de *Streptomyces lividans* comprende un fragmento de ADN que tiene una secuencia introducida de forma externa mostrada en la SEC ID N.º 2 o una secuencia obtenida modificando una parte de la secuencia, codificando la secuencia la transglutaminasa.

[24] El proceso para la producción de transglutaminasa descrito en cualquiera de los puntos [19] a [23], en el que el transformante de *Streptomyces lividans* es un transformante de *Streptomyces lividans* 3131 o una cepa mutante del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0007]

En la Figura 1 se muestra el procedimiento de construcción de un vector lanzadera pSV1 de los Ejemplos.

En la Figura 2 se muestra el procedimiento de construcción de un plásmido de expresión para secreción pUJ51BD que contiene un gen de transglutaminasa.

En la Figura 3 se muestra una secuencia de bases de una región promotora de un gen de transglutaminasa (BTG) determinado en los Ejemplos.

En la Figura 4 se muestra una secuencia de bases de una región promotora y una parte de un gen estructural de un gen de transglutaminasa (BTG).

En la Figura 5 se muestra una secuencia de bases de una parte de un gen estructural y una región terminadora de un gen de transglutaminasa (BTG).

La Figura 6 es una tabla en la que se resumen los resultados de la medición de la cantidad de BTG en el sobrenadante de cultivo de los transformantes ABL-1 y ABM-1, respectivamente.

En la Figura 7 se muestran los resultados de una electroforesis del sobrenadante del cultivo de los transformantes ABL-1 y ABM-1 (gel después de la tinción con plata). En los pocillos 1, 2, 3, 4 y 5 se aplica el sobrenadante de los

cultivos de *S. lividans* 3131-TS, sobrenadante del cultivo de ABL-1, BTG purificada, sobrenadante del cultivo de *S. mobaraensis* S-8112 y sobrenadante del cultivo de ABM-1, respectivamente. En el pocillo M se aplica un marcador de peso molecular (Pharmacia).

5 MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

[0008] A partir de aquí en este documento se describirá la configuración detallada de la presente invención. La presente invención proporciona un transformante de actinomiceto (*Streptomyces mobaraensis* o *Streptomyces lividans*) que comprende un gen estructural de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis* y un promotor y un terminador que actúan sobre el gen estructural los cuales se introducen de forma externa.

[0009] En este documento, la clase de gen estructural de la transglutaminasa no está limitada especialmente siempre que derive de *Streptomyces mobaraensis*. Por ejemplo, puede usarse un gen estructural de transglutaminasa portado por *Streptomyces mobaraensis* S-8112. Un ejemplo específico del gen estructural puede incluir un ADN compuesto por una secuencia de bases mostrada en la SEC ID N.º 1. Observe aquí que *Streptomyces mobaraensis* S-8112 está depositado (número de acceso: FERM P-18980) en la siguiente agencia de depósito.

Agencia de depósito

[0010]

Nombre: Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología avanzada, Organismo Internacional Depositario de Patentes,

Dirección: Chuo No. 6, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón

Fecha de depósito: 20 de agosto de 2002

[0011] El gen estructural de la transglutaminasa puede obtenerse del siguiente modo, por ejemplo. Es decir, se construye una biblioteca de ADN genómico de *Streptomyces mobaraensis* y esta biblioteca se analiza usando una sonda específica para el gen estructural de la transglutaminasa. A continuación se obtiene el fragmento de ADN insertado mediante tratamiento con una enzima de restricción a partir del clon seleccionado. Observe aquí que el gen estructural de la transglutaminasa puede prepararse también mediante un procedimiento sintético bien conocido usando un método de PCR, etc.

[0012] El ADN obtenido mediante modificación de una parte del ADN mostrado en la SEC ID N.º 1 (denominado también a partir de ahora en este documento «ADN modificado») también puede usarse como el gen estructural de la presente invención siempre que la proteína codificada por este tenga actividad transglutaminasa. Observe aquí que es preferible que el nivel de actividad transglutaminasa sea lo más alto posible. Por ejemplo, es preferible que la actividad transglutaminasa esté al mismo nivel que la actividad transglutaminasa de una proteína codificada por el ADN compuesto por la secuencia mostrada en SEC ID N.º 1.

[0013] Un ejemplo específico del ADN modificado puede incluir un ADN que hibrida con el ADN que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene actividad transglutaminasa. Observe aquí que «condiciones rigurosas» en este documento indica condiciones en las que se forma un híbrido denominado específico y no se forma un híbrido no específico. Por ejemplo, entre las condiciones rigurosas se incluyen cuando la incubación se lleva a cabo usando una solución de hibridación (formamida al 50%, SSC 10x (NaCl 0,15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7,0), solución Denhardt 5x, SDS al 1%, sulfato de dextrano al 10%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 10 µg/ml y tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,5)) a 42°C, seguido de lavado con SSC 0,1x y SDS al 0,1% a 68°C. Entre las condiciones rigurosas adicionales preferidas pueden incluirse condiciones en las que se usa una solución de hibridación (formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 0,15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7,0), solución de Denhardt 1x, SDS al 1%, sulfato de dextrano al 10%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 10 µg/ml y tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,5)).

[0014] Otro ejemplo del ADN modificado puede incluir ADN compuesto por una secuencia de bases que incluye sustitución, delección, inserción, adición o inversión de una o varias bases en una secuencia de bases mostrada en la SEC ID N.º 1 y que codifica una proteína que tiene actividad transglutaminasa. La mutación como

sustitución de una base puede estar en diversos sitios. En este documento, «diversidad» indica de 2 a 40, preferiblemente de 2 a 20 y, más preferiblemente, de 2 a 10 aunque es diferente dependiendo de las clases o posiciones de aminoácidos codificados por las bases que se van a mutar. Observe aquí que esta modificación incluye la introducción de un sitio de restricción en el extremo 5', en el extremo 3' o en otros sitios o la adición de una

5 [0015] El ADN modificado mencionado anteriormente puede obtenerse modificando genéticamente ADN que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 de modo que los restos de aminoácidos en una cita determinada incluye sustitución, delección, inserción, adición o inversión mediante el uso de, por ejemplo, un procedimiento de mutación específico de sitio. Asimismo, el ADN modificado mencionado anteriormente puede obtenerse usando un proceso de mutación bien conocido que incluye el procesamiento de *Streptomyces mobaraensis* portador de un gen de transglutaminasa con luz ultravioleta y, a continuación, el aislamiento del gen estructural de la transglutaminasa modificada y similar.

15 [0016] Observe aquí que la mutación mencionada anteriormente, como sustitución, inserción, adición, inversión o similares, de bases incluye una mutación natural, por ejemplo, mutación basada en una diferencia individual de *Streptomyces mobaraensis*.

[0017] Por ejemplo, cuando el *Streptomyces mobaraensis* natural tiene dicho ADN modificado, se extrae el ADN genómico (cromosoma) de la cepa y se procesa con una enzima de restricción apropiada, seguido de la selección y aislamiento del ADN que hibrida en condiciones rigurosas en una selección con el uso del ADN de SEC ID N.º 1 o una parte del ADN como sonda. De este modo, puede obtenerse un ADN modificado.

[0018] Puede emplearse un promotor que actúa sobre el gen estructural mencionado anteriormente. Preferiblemente, se emplea un promotor de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*. Preferiblemente además se emplea un promotor cuyo origen es el mismo que el del gen estructural que se va a usar. Por ejemplo, cuando el gen estructural de la transglutaminasa se obtiene a partir de *Streptomyces mobaraensis* como se menciona anteriormente, se obtiene un fragmento de ADN que incluye además una región promotora del mismo además del gen estructural y puede usarse este fragmento de ADN como el gen estructural y el promotor de la presente invención.

[0019] También como terminador se emplea un terminador que actúa sobre el gen estructural mencionado anteriormente. Preferiblemente, se emplea un terminador de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*. Preferiblemente además se emplea un terminador cuyo origen es el mismo que el del gen estructural que se va a usar. Por ejemplo, cuando el gen estructural de la transglutaminasa se obtiene a partir de *Streptomyces mobaraensis* como se menciona anteriormente, se obtiene un fragmento de ADN que incluye además una región terminadora del mismo además del gen estructural y puede usarse este fragmento de ADN como el gen estructural y el terminador de la presente invención.

40 [0020] En este documento es especialmente preferible que tanto el promotor, el gen estructural como el terminador deriven del mismo *Streptomyces mobaraensis*. Un ejemplo de esta realización incluye el caso del uso de un *Streptomyces mobaraensis* huésped que contiene un fragmento de ADN que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 2. Puede prepararse este fragmento de ADN de modo que incluya las regiones promotora y terminadora además del gen estructural cuando el gen estructural de la transglutaminasa se obtiene a partir de *Streptomyces mobaraensis* como se mencionó anteriormente.

[0021] En este documento, incluso si el ADN que consta de la secuencia mostrada en SEC ID N.º 2 es un ADN obtenido modificando una parte de la secuencia (ADN modificado), dicho ADN puede usarse siempre que la proteína codificada por el mismo tenga actividad transglutaminasa. Observe aquí que es preferible que el nivel de actividad transglutaminasa sea lo más alto posible. Por ejemplo, es preferible que la actividad transglutaminasa esté al mismo nivel que la actividad transglutaminasa de una proteína codificada por el ADN compuesto por la secuencia mostrada en SEC ID N.º 2.

[0022] Como en el caso del ADN de SEC ID N.º 1, un ejemplo específico del ADN modificado puede incluir un ADN que hibrida con el ADN que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 2 en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene la actividad transglutaminasa, y ADN compuesto por la secuencia de bases que incluye sustitución, delección, inserción, adición o inversión de una o varias bases en la secuencia de bases mostrada en la SEC ID N.º 2 y que codifica una proteína que tiene actividad transglutaminasa. Además, el intervalo capaz de ser modificado, el procedimiento de preparación del ADN modificado y similares son los mismos que los del ADN

mostrado en la SEC ID N.º 1.

- [0023]** Se produce Un transformante de actinomiceto (*Streptomyces mobaraensis* o *Streptomyces lividans*) dentro del cual se introdujo de forma externa el gen estructural, promotor y terminador mencionados anteriormente se produce mediante la transformación de un actinomiceto (*Streptomyces mobaraensis* o *Streptomyces lividans*) huésped con el uso de un vector de expresión que contiene el gen estructural, etc.
- [0024]** Como el *Streptomyces mobaraensis* utilizado para la transformación puede usarse, por ejemplo, *Streptomyces mobaraensis* S-8112 (número de acceso: FERM P-18980) o la cepa mutante del mismo. Por otro lado, como *Streptomyces lividans* puede usarse, por ejemplo, *Streptomyces lividans* 3131 (ATCC 35287) o la cepa mutante del mismo. Para la producción de la cepa mutante, por ejemplo, puede usarse un procedimiento bien conocido como la radiación ultravioleta.
- [0025]** Para la construcción del vector de expresión, puede usarse un vector bien conocido como un vector disponible en el mercado que puede usarse para la transformación de actinomicetos. Por ejemplo, puede construirse un vector de expresión combinando un plásmido, pUC19, pBR322, pBluescript, etc., usando *Escherichia coli* como huésped y un plásmido, pIJ702, etc., portado por *Streptomyces lividans* 3131, usando actinomicetos como huésped. A continuación se muestran ejemplos específicos del plásmido de expresión. En primer lugar, se construye un vector lanzadera que tiene tanto el origen de replicación de *Escherichia coli* como el origen de replicación de los actinomicetos usando pUC19 y pIJ702. Por otro lado, el fragmento de ADN que contiene un promotor, un gen estructural y un terminador de la transglutaminasa se aísla a partir de *Streptomyces mobaraensis* y se inserta en un sitio de restricción apropiado de pUC19. A continuación se usa pIJ702 y el vector lanzadera mencionado anteriormente para insertar un gen *tsr* (resistencia a tioestreptón) dentro de este plásmido. Por tanto, se obtiene un vector de expresión que contiene un origen de replicación de *Escherichia coli*, un gen Amp^r (resistencia a ampicilina), un origen de replicación de actinomicetos y un gen *tsr* (resistencia a tioestreptón) así como un promotor, un gen estructural y un terminador de transglutaminasa.
- [0026]** El tratamiento con la enzima de restricción, la inserción de un fragmento de ADN y similares, para la construcción de un vector pueden llevarse a cabo mediante un procedimiento rutinario.
- [0027]** Observe aquí que un vector de expresión que incluye un gen estructural de transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis* y un promotor y terminador que actúan sobre el gen estructural pueden usarse para la transformación de microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces* distintos a *Streptomyces mobaraensis*.
- [0028]** La transformación de actinomicetos (*Streptomyces mobaraensis* o *Streptomyces lividans*) usando el vector de expresión construido como se menciona anteriormente puede llevarse a cabo mediante un procedimiento de introducción de un vector de expresión en un protoplasto del actinomiceto huésped. Es preferible que esta transformación se lleve a cabo en condiciones en las que los actinomicetos como huésped puedan crecer. Según la investigación de los presentes inventores, la eficacia de transformación aumenta notablemente mediante este procedimiento. Pueden llevarse a cabo otras condiciones y procedimientos de trabajo, etc., seleccionados de forma apropiada las condiciones y procedimientos empleados en un método rutinario (por ejemplo, el procedimiento de Turner y col. (Gene, 36, 321-331(1985)). En este documento, «las condiciones en las que puede crecer un actinomiceto como huésped» indica las condiciones en las que una solución de reacción contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento del actinomiceto. Entre los ejemplos específicos de dichas condiciones se incluyen condiciones en las que una solución de reacción contiene extracto de carne, extracto de levadura y/o peptona (incluyendo polipeptona, tripeptona, peptona de caseína y similares). Para conseguir una eficacia de transformación superior, es preferible además que tanto el paso de permitir que el huésped sea un protoplasto como el paso de introducir un vector dentro de huésped protoplasto se lleven a cabo en dichas condiciones.
- [0029]** La selección del transformante puede llevarse a cabo usando un marcador de selección como el gen *tsr*, el cual se incorporó con antelación al vector de expresión.
- [0030]** La transglutaminasa puede producirse cultivando el transformante seleccionado, es decir, un actinomiceto huésped (*Streptomyces mobaraensis* o *Streptomyces lividans*) en el que se ha introducido externamente un gen estructural derivado de *Streptomyces mobaraensis*, un promotor y un terminador de transglutaminasa en las condiciones en las que el gen estructural de la transglutaminasa puede expresarse. Como medio para cultivar el transformante, puede usarse un medio que contenga una fuente de carbono, una fuente de

nitrógeno y un cloro inorgánico (ión inorgánico) si es apropiado. Para promover el crecimiento del transformante, puede usarse un medio al cual se añaden vitaminas, aminoácidos y similares. Entre los ejemplos de fuente de carbono pueden incluirse, por ejemplo, glucosa, almidón, dextrina y similares. Entre los ejemplos de fuente de nitrógeno pueden incluirse, por ejemplo, polipeptona, extractos de levadura, extractos de carne y similares. Entre los ejemplos de cloro inorgánico pueden incluirse fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro sódico, cloruro potásico y similares.

[0031] La temperatura de cultivo para cultivar el transformante está, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 37°C y, preferiblemente, en el intervalo de 25 a 35°C. Además, el pH del medio se ajusta a, por ejemplo, de 5,0 a 8,0 y, preferiblemente, de 6,0 a 7,5.

[0032] La transglutaminasa puede recogerse de una solución de cultivo en la que se cultivó el transformante durante un tiempo predeterminado o del cuerpo celular. Cuando la transglutaminasa se recoge a partir de la solución de cultivo, la transglutaminasa puede obtenerse eliminando sustancias insolubles mediante filtración y centrifugación del sobrenadante del cultivo, seguido de aislamiento y purificación mediante la combinación de eliminación de sales como por ejemplo mediante precipitación con sulfato amónico, diálisis, diversas cromatografías y similares. Por otro lado, si la transglutaminasa se recoge a partir del cuerpo celular, por ejemplo, dicha enzima puede obtenerse mediante aislamiento y purificación como se menciona anteriormente después de triturar los cuerpos celulares mediante tratamiento a presión, tratamiento con ultrasonidos, etc. Observe aquí que tras recoger el cuerpo celular de la solución de cultivo por adelantado mediante filtración, centrifugación y similar, puede llevarse a cabo la serie de pasos mencionados anteriormente (triturado, aislamiento y purificación del cuerpo celular).

Ejemplos

[0033] En los Ejemplos de la presente invención, siempre que no se indique otra cosa, se usarán como enzimas de restricción y otras enzimas para los procedimientos genéticos productos de Takara Shuzo Co., Ltd. o TOYOBO CO LTD. Observe aquí que las condiciones de reacción de las enzimas, etc. siguen el manual de instrucciones adjunto.

30 [Ejemplo 1] Obtención del vector pIJ702 de actinomicetos

[0034] *Streptomyces lividans* 3131 (ATCC 35287) que contenía un plásmido pIJ702 se cultivó en las siguientes condiciones de medio a 30°C durante dos días.

Medio YEME + glicina al 0,5% + 50 µg/ml de tioestreptón

35

[0035]

Extracto de levadura	3g
Peptona	5g
40 Extracto de malta	3g
Cloruro de magnesio	1g
Glucosa	10g
Sacarosa	340g
Glicina	5g
45 Solución de tioestreptón a 50 mg/ml (SIGMA: solución de dimetilsulfóxido)	
	1 ml/l (pH 7,0)

[0036] Los 200 ml de medio de cultivo se centrifugaron (12.000 g a 4°C durante 10 minutos) y el cuerpo celular obtenido se resuspendió en 10 ml de solución compuesta por Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM y sacarosa al 25% (denominada a partir de ahora «TE-sacarosa»). A continuación se añadieron a la suspensión 2 ml de TE-sacarosa que contenían 30 mg/ml de lisozima (Sigma Aldrich Japan K.K.) y 4 ml de EDTA 0,25 mM, la cual se incubó a 37° C durante 30 minutos. Tras la incubación, se añadieron 20 ml de SDS al 20%, después se añadieron 5 ml de NaCl 5M y se agitó suavemente tras lo cual se incubó a 0 °C durante la noche.

[0037] A continuación, se añadió polietilenglicol 6000 al 30% al sobrenadante obtenido mediante centrifugación (100.000 g a 4°C durante 40 minutos) de manera que la concentración final fuera del 10% y se incubó

a 0°C durante 4,5 horas. Después de esto, se centrifugó (900 g a 4°C durante 5 minutos) y el precipitado obtenido de este modo se disolvió en una solución compuesta por Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM y NaCl 50 mM. Posteriormente se añadieron a esta 16,8 g de cloruro de cesio y 1,2 ml de una solución compuesta por Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM (denominada a partir de ahora «TE») en la que se había disuelto bromuro de etidio a la concentración de 10 mg/ml. La mezcla resultante se centrifugó (1.300 g a temperatura ambiente durante 15 minutos) para eliminar los residuos y, a continuación, se centrifugó de nuevo (230.000 g a 20°C durante 12 horas). Tras la centrifugación, con irradiación ultravioleta se obtuvo una capa de ADN plasmídico. A continuación, se llevó a cabo una extracción con butanol saturado con TE para eliminar de este modo el bromuro de etidio. La extracción se repitió tres veces. La solución de ADN plasmídico obtenido se sometió a diálisis durante la noche a 4°C usando TE como solución externa de diálisis. Después, se realizó el tratamiento de extracción una vez más con fenol saturado con TE y dos veces con cloroformo y alcohol isoamílico. A este se añadió 1/10 de volumen de solución de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol. Después de 30 minutos a -80°C, la mezcla resultante se centrifugó (12.000 g a 4°C durante 15 minutos) para recoger el precipitado. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se secó. Este se disolvió en 200 µl de TE. Mediante el procedimiento mencionado anteriormente, la cantidad final de ADN fue de aproximadamente 10 µg.

[Ejemplo 2] Obtención de una cepa de *Streptomyces lividans* 3131 (ATCC 35287) sensible a tioestreptón portadora de pIJ702

[0038] *Streptomyces lividans* 3131 (ATCC 35287) que contenía pIJ702 se cultivó a 30°C durante siete días usando un medio YEME. A continuación, una solución de cultivo se diluyó de 10^5 a 10^9 veces con el medio YEME. Se inocularon 100 µl por placa de la solución diluida en cada una de las cinco placas que contenían medio de agar YEME (medio YEME suplementado con 1,5% de agar). Tras el cultivo a 30°C durante una semana, el medio de cultivo se replicó en el medio de agar YEME que contenía 200 µg/ml de tioestreptón usando una almohadilla de transferencia de colonias RepliPlate™ (Takara Shuzo Co., Ltd.) y se cultivó de nuevo a 30°C durante una semana. Se seleccionó una cepa, de la que se perdió el plásmido pIJ702 para convertirse en una cepa sensible a tioestreptón para obtener *Streptomyces lividans* 3131-TS. Esta cepa se usó como huésped para la transformación posterior.

[Ejemplo 3] Obtención del vector lanzadera pSV1

[0039] El vector lanzadera pSV1 se construyó mediante el procedimiento mostrado en la Figura 1. En primer lugar, se preparó un fragmento de ADN obtenido mediante digestión del vector de *E. coli* pUC19 (Takara Shuzo Co., Ltd.) con una enzima de restricción *Bam* HI y un fragmento de ADN que contenía *tsr* obtenido mediante digestión del vector pIJ702 de actinomicetos con *Bcl* I (Takara Shuzo Co., Ltd.). Estos fragmentos de ADN se ligaron entre sí usando un kit de ligación de ADN (Takara Shuzo Co., Ltd.) para producir pUCTSR. A continuación, se prepararon un fragmento de ADN (fragmento largo) obtenido mediante digestión de pUCTSR con *Kpn* I y *Cla* I (Takara Shuzo Co., Ltd.) y un fragmento de ADN (fragmento corto) obtenido mediante digestión de pIJ702 con *Kpn* I y *Cla* I (Takara Shuzo Co., Ltd.) y estos fragmentos de ADN se ligaron entre sí usando un kit de ligación de ADN (Takara Shuzo Co., Ltd.) para transformar la cepa de *E. coli* DH5 (TOYOBO Co., Ltd.). Se obtuvo un plásmido ligando el fragmento pUC19 y el fragmento pIJ702 que son portados por el transformante obtenido de este modo para obtener un vector lanzadera pSV1. El vector lanzadera pSV1 se utilizó para los procedimientos posteriores.

[Ejemplo 4] Fabricación del vector de expresión de secreción de transglutaminasa pUJ51BD

[0040] Se construyó un plásmido de expresión de secreción pUJ51BD que contenía el gen de la transglutaminasa mediante el procedimiento de la Figura 2. En primer lugar, se fabricó un plásmido pBTG-BB cortando aproximadamente 6,6 kb del fragmento *Bgl* II-*Bam* II a partir de un ADN de fago (λBTG, publicación de patente japonesa sin examinar N.º 5-199883) que contenía un fragmento *Bam* HI del gen de transglutaminasa (denominada también a partir de ahora «BTG») aislado a partir de *Streptomyces mobaraensis* S-8112 (número de acceso: FIRM P-18980) e insertando el fragmento en un sitio *Bam* HI de pUC19. Se delecionó una región 3' no necesario a partir de pBTG-BB usando el kit de delección Kilo-Sequence (Takara Shuzo Co., Ltd.) para fabricar un plásmido pU51B que contenía aproximadamente 3,9 kb del gen BTG. A continuación, se fabricó un plásmido pUJ51B insertando un fragmento de ADN digerido con *Pst*-I del vector de actinomicetos pU702 dentro de un sitio *Pst*I de pU51B. Cortando el fragmento *Xba* I-*Cla* I de pUJ51B y sustituyéndolo por un fragmento *Xba* I-*Cla* I del vector lanzadera de *E. coli*-actinomicetos obtenido en el ejemplo 3, se construyó el plásmido de expresión de secreción de BTG pUJ51BD a partir del cual se eliminó el gen *mel* (tirosinasa) de pIJ702.

[Ejemplo 5] Análisis de la secuencia de bases de la región promotora

[0041] Se sintetizó un cebador sintético BB-23 [Invitrogen Corporation] 5'-ACACCGCACTCATAGTGGCG-3' (SEC ID N.º 3) para analizar una secuencia de bases a partir de una secuencia (SEC ID N.º 1) de un gen estructural de BTG. La secuencia de bases del plásmido pBTG-BB se analizó usando un cebador BB-23 desde el extremo 3' de la región promotora y usando un M13-RV (Takara Shuzo Co., Ltd.) del extremo 5' de la región promotora. A partir de los resultados del análisis de la secuencia de bases resultante, se sintetizaron los cebadores adicionales BB-19 5'-TCCGTGCGAGTGGGAAGAACG-3' (SEC ID N.º 4) y SP6-20 5'-GACGGCCTCCGAATAAC-3' (SEC ID N.º 5). Mediante el procedimiento de desplazamiento del cebador usando estas secuencias, se determinó la secuencia de bases completa de aproximadamente 700 pb de la región promotora (Figura 3). De forma similar, la secuencia de bases de aproximadamente 500 pb de la región terminadora se determinó mediante el procedimiento de desplazamiento del cebador usando los cebadores sintéticos SP6-32 5'-ATGTCGAGGGACAGGAAC-3' (SEC ID N.º 6) y SP6-36 5'-CACCACGAAAGTCGCTAC-3' (SEC ID N.º 7). Como resultado, se identificó una secuencia de bases (SEC ID N.º 2) compuesta por una región promotora, un gen estructural y una región terminadora (Figuras 4 y 5). Para la reacción de secuencia, se usó el BigDye™ Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit (Applied Biosystems) y para el análisis, se usó ABI PRISM 310 Sequencer (Applied Biosystems).

[Ejemplo 6] Preparación del protoplasto de *Streptomyces lividans* 3131-TS

[0042] *Streptomyces lividans* 3131-TS que se había obtenido en el Ejemplo 2 se cultivó usando un medio YEME (glicina al 0,5%) a 30°C durante dos días. Los 200 ml de medio de cultivo se centrifugaron (1.300 g a temperatura ambiente durante 10 minutos). El cuerpo celular obtenido se resuspendió en 72 ml de solución de sacarosa 0,35 M. A continuación, esta suspensión se centrifugó (1.300 g a temperatura ambiente durante 10 minutos) y el cuerpo celular se resuspendió de nuevo en 60 ml de solución tampón P que contenía 1 mg/ml de lisozima (Sigma Aldrich Japan K.K.) y la suspensión se incubó a 30° C durante 2,5 horas. La suspensión tras la incubación se filtró con algodón absorbente para eliminar los residuos. A continuación, el filtrado resultante se centrifugó (1.300 g a temperatura ambiente durante 10 minutos) y el sedimento se lavó con 25 ml de solución tampón P. Este lavado se repitió dos veces y la precipitación se resuspendió en 1 ml de solución tampón P para obtener una suspensión de protoplasto.

Solución tampón P

[0043]
TES [ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico]
5,73g
Sacarosa 103g
35 Cloruro de magnesio 2,03g
Sulfato de potasio 0,5g
Cloruro cálcico 3,68g
Solución de oligoelementos 2ml/l (pH 7,4)

40 **[0044]** Observe aquí que la solución de fosfato potásico monobásico al 1% se preparó por separado que se añadió en la cantidad de 1ml por cada 100 ml de solución tampón P inmediatamente antes de su uso.

Solución de oligoelementos

[0045]
Cloruro de cinc 40 mg
45 Cloruro férrico 200 mg
Cloruro cúprico 10 mg
Cloruro de manganesio 10 mg
Tetraborato sódico 10 mg
Molibdato amónico 10 mg/l

[Ejemplo 7] Transformación de *Streptomyces lividans* 3131-TS

Cada una de las siguientes soluciones se mezcló hasta la cantidad total 140 µl

Solución de ADN del plásmido de expresión de secreción de BTG pUJ51D	20 µl
Protoplasto de <i>Streptomyces lividans</i> 3131-TS	100 µl
Solución de sacarosa 0,35 M	20 µl

- 5 **[0047]** A continuación, se añadieron 1,5 ml de solución tampón P que contenía polietilenglicol 1000 al 20% a la mezcla de reacción y se agitó suavemente mediante pipeteo. Se dejó que la mezcla resultante siguiera durante dos minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó (1.700 g a temperatura ambiente durante 10 minutos) para recoger el precipitado. El protoplasto obtenido como precipitado se lavó dos veces con solución tampón P. El sedimento precipitado lavado se resuspendió en 1 ml de solución tampón P y se aplicaron 200 µl en cada de la suspensión en un medio R-2.

10

[0048] Por otro lado, se prepararon R-2/A y R-2/B como se muestra a continuación.
R-2/A

Sulfato de potasio	0,5 g
Cloruro de magnesio	20,2 g
15 Cloruro cálcico	5,9 g
Glucosa	20,0 g
Prolina	6,0 g
Ácido casamino	0,2 g
Solución de oligoelementos	4 ml

20 Agar 44,0 g/l

R-2/B

TES	11,5 g
Extracto de levadura	10,0 g
Sacarosa	203 g/l (pH 7,4)

- 25 **[0051]** Cuando se produjo un medio en placa, se mezclaron R-2/A y R-2/B y se mezcló adicionalmente una solución de KH_2PO_4 al 1% en la cantidad de 1 ml por cada 200 ml de volumen final. La mezcla se incubó a 30°C durante 18 horas. La superficie del medio en placa se cubrió con 1 ml de solución tampón P compuesta por 200 µg/ml de tioestreptón y 400 µg/ml de tirosina. Las placas resultantes se incubaron adicionalmente a 30°C durante 7 días para obtener un transformante resistente a tioestreptón (ABL-1).

30

[Ejemplo 8] Preparación de protoplastos de *Streptomyces mobaraensis*

- [0052]** Como precultivo, se cultivó *Streptomyces mobaraensis* S-8112 usando un medio YEME + glucosa al 1% + cloruro de magnesio 25 mM (pH 7,0) a 27°C durante tres días. A continuación, la solución de cultivo
 35 precultivada al 0,5% se inoculó en un medio YEME + glucosa al 1% + cloruro de magnesio 4 mM + glicina (pH 7,0) y se cultivó a 27°C durante tres días. El medio de cultivo se centrifugó (3.000 g a 4°C durante 10 minutos) y se determinó el peso húmedo del cuerpo celular obtenido. Se lavaron 0,6 g de cuerpo celular húmedo con 10 ml de solución de sacarosa 0,3 M y se centrifugó de nuevo (3.000 g a 4°C durante 10 minutos). El cuerpo celular se resuspendió en 4 ml de solución tampón BS-L compuesta por 0,4 mg/ml de lisozima (Roche Japan) y 0,1 mg/ml de
 40 acromopeptidasa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se agitó suavemente a 30°C durante 30 minutos. A continuación se añadieron 5 ml de solución tampón BS-P en hielo y se filtraron con algodón absorbente mientras que se lavaron con 3 ml de solución tampón BS-P como cuando se llevó a cabo la filtración. La suspensión obtenida se centrifugó (1.500 g a 4°C durante 5 minutos), se resuspendió en 10 ml de solución tampón BS-P y, a continuación, se centrifugó de nuevo (1.500 g a 4°C durante 5 minutos). El precipitado obtenido se resuspendió en
 45 0,5 ml de solución tampón BS-P para obtener una suspensión de protoplasto, que se usó para la transformación mencionada a continuación.

Solución tampón BS-L

Extracto de carne al 10%	10 ml
50 Extracto de levadura	1 g
Peptona	2 g
Glucosa	10 g

Sacarosa	171,15 g
Cloruro cálcico	0,277 g
Cloruro de magnesio	0,508 g/l (pH 7,0)

5 Solución tampón BS-P

Extracto de carne al 10%	10 ml
Extracto de levadura	1 g
Peptona	2 g
Glucosa	10 g

10 Sacarosa	171,15 g
Cloruro cálcico	2,77 g
Cloruro de magnesio	2,03 g/l (pH 7,0)

15 **[Ejemplo 9] Transformación de *Streptomyces mobaraensis***

- 15 **[0055]** Después se mezclaron 100 µl de la suspensión de protoplasto (concentración de protoplasto: 1×10^9 /ml) obtenida en el ejemplo 8 y 10 µl de solución de sacarosa 2M que contenía 1 µg de plásmido de expresión de secreción de BTG pUJ51D obtenido en el ejemplo 4, inmediatamente se dejó que siguiera la mezcla durante 10 segundos. A continuación, después se añadieron 0,5 ml de solución tampón P que contenía polietilenglicol 1000 al
- 20 25% (Sigma Aldrich Japan K.K.) a la mezcla, ésta se dejó inmediatamente en hielo durante un minuto. Luego, después se añadieron 2 ml de solución tampón BS-P a la mezcla la cual se centrifugó inmediatamente (1.500 g a 4°C durante 10 minutos). El precipitado resultante se resuspendió en 0,5 ml de solución tampón BS-P y 0,1 ml por placa de la suspensión se dispensaron superpuestos sobre un medio de agar SBS usando 3 ml de medio agar SBS con agitación. Después de retirar la tapa, el agar se secó durante exactamente dos horas y, a continuación, se
- 25 cultivó durante exactamente 24 horas a 27°C. Adicionalmente, se superpusieron 3 ml de medio de agar blando SBS que contenían 200 µg/ml de tioestreptón y se cultivó a 27° C. El transformante obtenido tras la operación mencionada anteriormente se definió como ABM-1.

Medio agar SBS (pH 7,0)

30 Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	7,5 g
Peptona triptica	1 g
Glucosa	10 g
Sacarosa	308,07 g
35 Agar	25 g/l (pH 7,0)

Medio agar blando SBS (pH 7,0)

Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	7,5 g
Peptona triptica	1 g
40 Glucosa	10 g
Sacarosa	308,07 g
Agarosa Sea Plaque	25 g/l (pH 7,0)

[Ejemplo 10] Cultivo del transformante en que el que se incorporó el gen BTG

- 45 **[0058]** El transformante ABL-1 obtenido en el ejemplo 7 y el transformante ABM-1 obtenido en el ejemplo 9 se cultivaron a 30° C durante 7 días en las siguientes condiciones, respectivamente.

Polipeptona	20 g
Almidón soluble	20 g
50 Extracto de levadura	2 g

Fosfato dipotásico	2 g
Sulfato de magnesio	1 g
Adekanol LG126	0,5 g
Solución de tioestreptón a 50 mg/ml	0,5 ml/l (pH 7,0)

5 **[0059]** El medio de cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente se centrifugó (12.000 g a 4°C durante 10 minutos) y el sobrenadante obtenido se sometió a un procedimiento de ELISA.

10 **[Ejemplo 11] Medición de la cantidad de producción de BTG (procedimiento de ELISA)**

10 **[0060]** A partir del sobrenadante del cultivo de *Streptomyces mobaraensis* S-8112 se midió la cantidad de BTG en el sobrenadante del cultivo obtenido en el ejemplo 10 mediante un procedimiento de ELISA usando un anticuerpo anti-BTG producido mediante inmunización de un conejo usando como antígeno un antígeno BTG purificado mediante cromatografía de afinidad en Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia).

15 **[0061]** En primer lugar, a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos se dispensaron 100 µl por pocillo de solución de anticuerpo anti-BTG que se había diluido con tampón PBS, se incubó durante una hora a 37°C y se inmovilizó sobre la placa. Tras retirar la solución de anticuerpo, cada pocillo se lavó con 200 µl de solución de Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd) diluida 10 veces que contenía Tween20 al 0,1% (denominada a partir de
20 ahora en este documento «solución de lavado»). El lavado se realizó tres veces sucesivas. A continuación, se dispensaron 200 µl de una solución de Block Ace diluida 4 veces en cada pocillo y se incubó a 37°C durante una hora para que se bloquease. Tras retirar la solución de Block Ace diluida 4 veces, se lavó cada pocillo tres veces con la solución de lavado. Después, la muestra de medida, es decir, el sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo de ABL-1 o ABM-1) se diluyó apropiadamente con solución de Block Ace diluida 10 veces, se dispensaron en cada
25 pocillo 50 µl de la solución diluida y se incubó a 37°C durante una hora. Observe aquí que como patrones se preparó BTG purificado que había sido diluido con solución de Block Ace diluida 10 veces a diferentes concentraciones. De forma similar a las muestras de medida, los patrones también se añadieron al pocillo que se había sometido al tratamiento de bloqueo.

30 **[0062]** Después de retirar la solución de la muestra de cada pocillo, estos se lavaron tres veces con solución de lavado. A continuación, se dispensaron 100 µl de solución de Block Ace diluida 10 veces que contenía Fab'-HRP obtenido mediante entrecruzamiento de peroxidasa de rábano picante (HRP) con el fragmento Fab' de anticuerpo anti-BTG en cada pocillo y se incubó a 37°C durante una hora. Después, tras retirar la solución de Fab'-HRP, se lavó cada pocillo tres veces con solución de lavado. Posteriormente, se dispensaron 150 µl por pocillo de
35 solución de citrato sódico 50 mM (pH 4,5) que contenía ortofenilendiamina (o-PDA) al 0,04% y solución de peróxido a 0,42% en cada pocillo y se incubó a 37°C para permitir que la o-PDA y el peróxido reaccionaran con HRP para la formación de color. Exactamente después de 20 minutos del inicio de la reacción, se dispensaron 50 µl por pocillo de solución de ácido sulfúrico 3M como solución de parada en cada pocillo y se midió la absorbancia a 492 nm. A continuación, usando una curva de calibración calculada a partir de la absorbancia del patrón, se calculó la cantidad
40 de BTG en cada sobrenadante de cultivo (ABL-1 o ABM-1). En la figura 6 aparece una tabla en la que se muestra la cantidad de BTG por cada sobrenadante de cultivo. Como se muestra en esta tabla, BTG se producía en la cantidad de 0,7 g/l para ABL-1 y de 0,5 g/l para ABM-1. Cuando se comparó con la productividad ya notificada (40 a 50 mg/l), se obtuvieron diez veces o más de ABL-1 y aproximadamente 10 veces de ABM-1. Por tanto, se confirmó la productividad de BTG con una eficacia extremadamente alta.

45 Solución tampón PBS

Cloruro sódico	8,0 g
Fosfato dipotásico	1,1 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Fosfato de potasio monobásico	0,2 g/l (pH 7,4)

50 **[Ejemplo 12] PAGE-SDS**

[0064] Los sobrenadantes de los cultivos del transformante ABL-1 y del transformante ABM-1 se mezclan con solución tampón SDS para electroforesis 2x en una relación 1:1, repetidamente y se permite que se obtengan
55 muestras para PAGE-SDS. Observe aquí que como control se usó un sobrenadante de cultivo de *Streptomyces lividans* 3131-TS, BTG purificado con una solución tampón y se preparó un sobrenadante de cultivo de

Streptomyces mobaraensis S-8112. Cada muestra se sometió a PAGE-SDS usando un gel al 12,5%. Para el PAGE-SDS, se utilizó un Fast-System (Pharmacia Biotech) y para la tinción se llevó a cabo una tinción con plata. En la figura 7 se muestran fotografías del gel tras la tinción con plata. En la figura 7, en los pocillos 1, 2, 3, 4 y 5 se aplica el sobrenadante de los cultivos de *S. lividans* 3131-TS, sobrenadante del cultivo de ABL-1, BTG purificado, sobrenadante del cultivo de *S. mobaraensis* S-8112 y sobrenadante del cultivo de ABM-1, respectivamente. En el pocillo M se aplica un marcador de peso molecular (Pharmacia).

[0065] Como se muestra en la figura 7, en ABL-1 (pocillo 2) y en ABM-1 (pocillo 5), se observaron bandas claras en sustancialmente las mismas posiciones que en el BTG purificado (pocillo 3), lo que muestra que BTG estaba presente a alta concentración. Por otro lado, en el sobrenadante de cultivo de *Streptomyces lividans* (*S. lividans*) 3131-TS (pocillo 1) y en el sobrenadante de cultivo de *Streptomyces mobaraensis* (*S. mobaraensis*) S-8112 (pocillo 4), no se observan bandas que muestren la BTG purificada. Esto muestra que BTG se produce específicamente en ABL-1 y en ABM-1.

Solución tampón 2xSDS

15	Tris-HCl	2,42 g
	EDTA	0,744 g
	SDS	50 g
	β-mercaptoetanol	100 ml (pH 8.0)

20 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

[0067] La presente invención proporciona un actinomiceto capaz de producir transglutaminasa con una productividad extremadamente alta. El uso de los actinomicetos hace posible producir una transglutaminasa con una alta eficacia.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

[0068]

30	<110>	AMANO ENZYME INC. YUUKI, Kensuke WASHIZU, Kinya
	<120>	Hongo que produce transglutaminasa
	<130>	P0201101
	<150>	JP P2002-263834
	<151>	10/09/2002
35	<160>	7
	<170>	PatentIn versión 3.1
	<210>	1
	<211>	1.224
40	<212>	ADN
	<213>	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
	<220>	
	<221>	fuelle
	<222>	(1).. (1.224)
45	<223>	gen de transglutaminasa
	<400>	1

atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc gccactatga gtgcggigt atgcaccgcc 60
 ggattcaatc cgtcggcccg cgaggccgcc gccgacaatg gcgcggsgga agagacgaag 120
 tcttacgccg aaacctaccg cctcacggcg gaitgacgtc cgaacatcaa cgcgcitcaac 180
 gaaagcgtc cgcccgcttc gagcgccggc ccgtcgttcc ggcccccca ciccagacac 240
 aggttaccac ccccccca gccgcctgac aggaatgccg acccgtaacc tccccgtac 300
 ggcaggggcg agacggctc caacaactac atacgcaagt ggcagcaggt ctacagccac 360
 cgcgacggca ggaagcagca gaitaccgag gacgacggg atggctgtc ctacggctgc 420
 gtcggtgtca cctgggtcaa ttccgggtcag taccgacga acagactggc ctctcgttcc 480

 ttgcagcagg acaggttcaa gaacgagctg aagaacggca ggccccgtc cggcgagacg 540
 cggcgcgagt tgcagggccg cgtcgcgaag gagagcttc acgaggagaa gggcttccag 600
 cggcgcgctg aggtggcgtc cgtcaatga agggccctgg agaacgcca cgacgagagc 660
 gcttaccctg acaaccitaa gaaggaactg gcgaacggca acgacgccc gcgcaacgag 720
 gacgcccgt ccccgcttca ctggcgctg cggaacacgc cgtcttcaa ggagcggaac 780
 ggaggcaatc acgaccgtc caggatgaag gccgtatct actcgaagca ctctggagc 840
 ggccaggacc ggtcgagttc ggccgacaag aggaagttac gcgaccgga cgccttccgc 900
 cccgccccgg gcaccggctt ggtcgataig tgcagggaca ggaacatcc gcgcagcccc 960
 accagccccg gtgagggatt cgtcaatitc gactacggct ggttcggctc ccagacggaa 1020
 gcgacgccc acaagaccgt ctggaccac ggaatcaat atcacgcgc caatggcagc 1080
 ctgggtgcca tgcattgtca cgagagcaag ttccgcaact ggtccgaggg ttactcggac 1140
 ttgcacgcg gagcctatgt gattaccitc atccccaga gctggaacac ccccccgac 1200
 aaggtaaacg agggctggcc gtga 1224

<210> 2
 <211> 2.393
 5 <212> ADN
 <213> Streptomyces mobaraensis
 <400> 2

gacatccgg gacatcagag gcgccggagg cgalccgagg cccccgaggc giccgccga	60
agggcgccgc cglccgicc atcccgicc gcgicgacgc ggcccgagg ggggtgcggc	120
ggcgcccllc ggcigigigg acgaagcgc gggicggagg ggcggccgga taicgicctt	180
ggggcggggl ggcgggaall gccccaagg lgtlccggg gaalcgacc gaagacalga	240
tcactctcg talccaccg alcacglatc cgggagtcga gaagtgilac gccgicccc	300

lgccgcgic ctcaccccg lcgccgigac agcgaccgc gllclccac lcgacaggac 360
 ggccccacag gacccttcgg cccgggclcg ccccgccgc lcggtgacgg cclccgaata 420
 acggggccgc cggggccclcg gccggllgac cgalccggg cagcgcccc gccgggcggg 480
 cggccacgic cggclcgcc cggcccgaca lcgglcgca clgcllcgc lcgaccltcl 540
 tcccgcclcc cggcccggt tttccgccc cgaaggigcg gcgacgcgta ccgaatcccc 600
 ctccatcgcg acgiccltc gcacggccgc gilcaacga gttccacgac aaaggagtlg 660
 caggtttcca tgcgcatag ccggagagct clcgcllcg ccactatgag lcgggigtta 720
 tgcaccgcg gattcatgcc gtcggccggc gaggccgcg ccgacaatgg ccggggggaa 780
 gagacgaag cclacgcga aacctaccgc ctacggcgg atgacgtgc gaacatcaac 840
 gcgclcaacg aaagcgtcc ggccgclcg agcgccggcc cgtcgilccg ggcccccgac 900
 lccgacgaca gggcacccc tcccgcgag ccgclcgaca ggaagcccg cccgiaccgt 960
 cccclgtag gcagggccga gacggclcg aacaactaca tacgcaaglg gcagcaggic 1020
 tacagccacc gcgacggcag gaagcagcag atgaccgagg agcagcggga gtggclgicc 1080
 tacggclcg lcgglgicac clgggicaa tgggicagt acccgacgaa cagactggcc 1140
 ttccgclct tgcagagga caggltcaag aacgagctga agaacggcag gccccglic 1200
 ggcgagacgc gggcgagti cgaggccgc gtcggaagg agagcltga cgaggagaag 1260
 ggclccagc gggcggtga ggtggclcg gclgaaca gggccclga gaacgcccac 1320
 gacgagagcg ctaccclga caacctcaag aaggaaclgg cgaacggcaa cgacgccctg 1380
 cgcaacgagg acgcccgtc cccgcltclac lcggcgtlc ggaacacgc gllcltcaag 1440
 gagcggaac gaggcaatca cgaccgtcc aggalgaagg ccgtatcta clcgaagcac 1500
 ttclggagcg gccaggacc gicgagllcg gccgacaaga ggaaglacgg cgaccggac 1560
 gccllccgc cggccccgg caccggcclg gtcgacatgt cgaggacag gaacatccg 1620

cgcagcccca ccagccccgg tgagggaatc glcaatttcg aciacggcig gtlcggcgcc 1680
 cagacggaag cggacgccga caagaccgic lggaccacag gaaalcacia lcacgcgccc 1740
 aalggcagcc tgggigccat gcaigictac gagagcaagl tccgcaactg glccgagggc 1800
 taticggact lcgaccgcgg agcctaigig atcacclica lcccaagag ciggaacacc 1860
 gccccgaca agglaaagca gggctggccg tgaiglgagc ggggtggagg ggagccggti 1920
 gcccggtccc cctccacctt ctcctccgcc accacgaaag tcgtacagc tcgigtcccg 1980
 tcgtgctgic gacgtgcgcc gggagltcgc cctcgiggcg gtcgcccgc gtcggggigc 2040
 ccgtgggttc gaacatgagg atggaggcgc ccggggagga cggctigigt tcggtgccct 2100
 tgggcaccac gaagggtgic cctltgtgca ggcgcaccgt gtgtccgtt ccgtcggagt 2160
 cgcggagcgc cacgtcgaag cggccgtcca ggacgaggaa gaactcgicg gtgtccctgt 2220
 ggacgtgcca gacgtgctcg cctcgggtgt gggcgacgcg gacgtcgtag tcgttcaigc 2280
 gggcgacgat gcgcgggctg tagacgtcgt cgaaggagc gagggccttg gcgaggttga 2340
 cgggtcgggt gtgttcaig gtccgagict cggcgggagc ccgccgcgc glc 2393

<210> 3
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador
 <400> 3

10
 acacgcact catagtggcg 20

<210> 4
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador
 <400> 4

20
 tcgtgcgag tggaagaacg 20

<210> 5
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador
 <400> 5

5 gaaggcctcc gaataac 17

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador
 <400> 6

15 atgtcgaggg acaggaac 18

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador
 <400> 7

25 caccacgaaa gtgcctac 18

REIVINDICACIONES

1. Un transformante de *Streptomyces mobaraensis* o *Streptomyces lividans*, que comprende un vector de expresión que contiene un ADN seleccionado entre el grupo compuesto por:
 - 5 (a) Un ADN que tiene una secuencia mostrada en SEC ID N.º 1 y está unido operativamente este al promotor y al terminador del gen de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis*;
 - (b) Un ADN que hibrida con el ADN que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 1 en condiciones rigurosas y
10 codifica una proteína que tiene actividad transglutaminasa y este está unido de forma operativa a un promotor y un terminador del gen de la transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
 - (c) Un ADN que comprende una secuencia de bases que incluye sustitución, delección, inserción, adición o inversión de una o 2 a 40 bases en la secuencia de bases mostrada en la SEC ID N.º 1 y que codifica una proteína que tiene
15 la actividad transglutaminasa y este está unido de forma operativa a un promotor y un terminador del gen de la transglutaminasa derivado de *Streptomyces mobaraensis*.
 - (d) Un ADN que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 2;
- 20 2. El transformante según la reivindicación 1, el cual es
 - (a) un transformante de *Streptomyces mobaraensis* S-8112 o
 - (b) un transformante de *Streptomyces lividans* 3131.
- 25 3. Un proceso para la producción de transglutaminasa que comprende las etapas de:
 - (a) cultivar el transformante según la reivindicación 1 o 2 en las condiciones en que el gen estructural que codifica la transglutaminasa pueda expresarse y
30 (b) recoger la transglutaminasa producida.

Fig.1

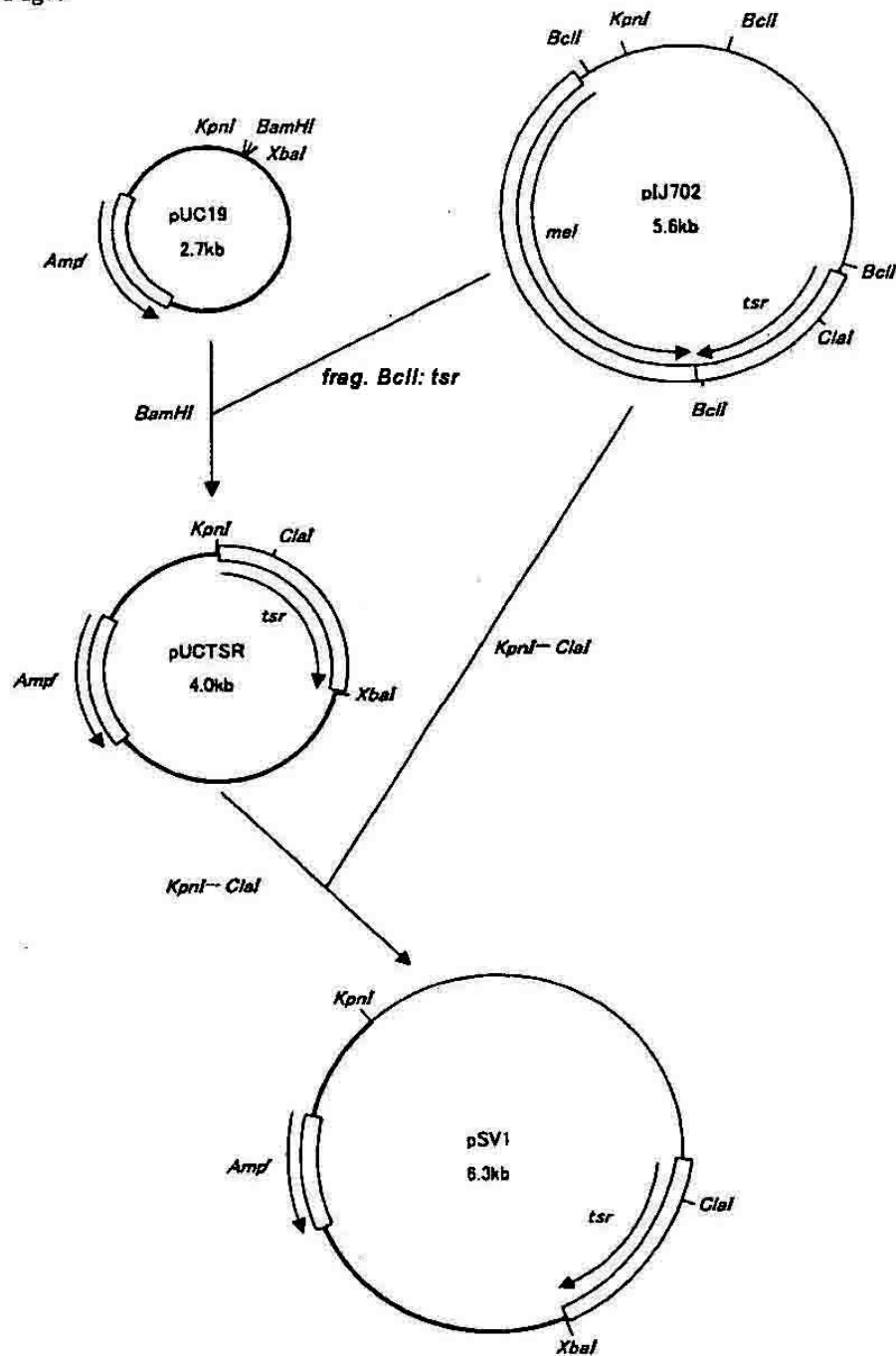


Fig.2

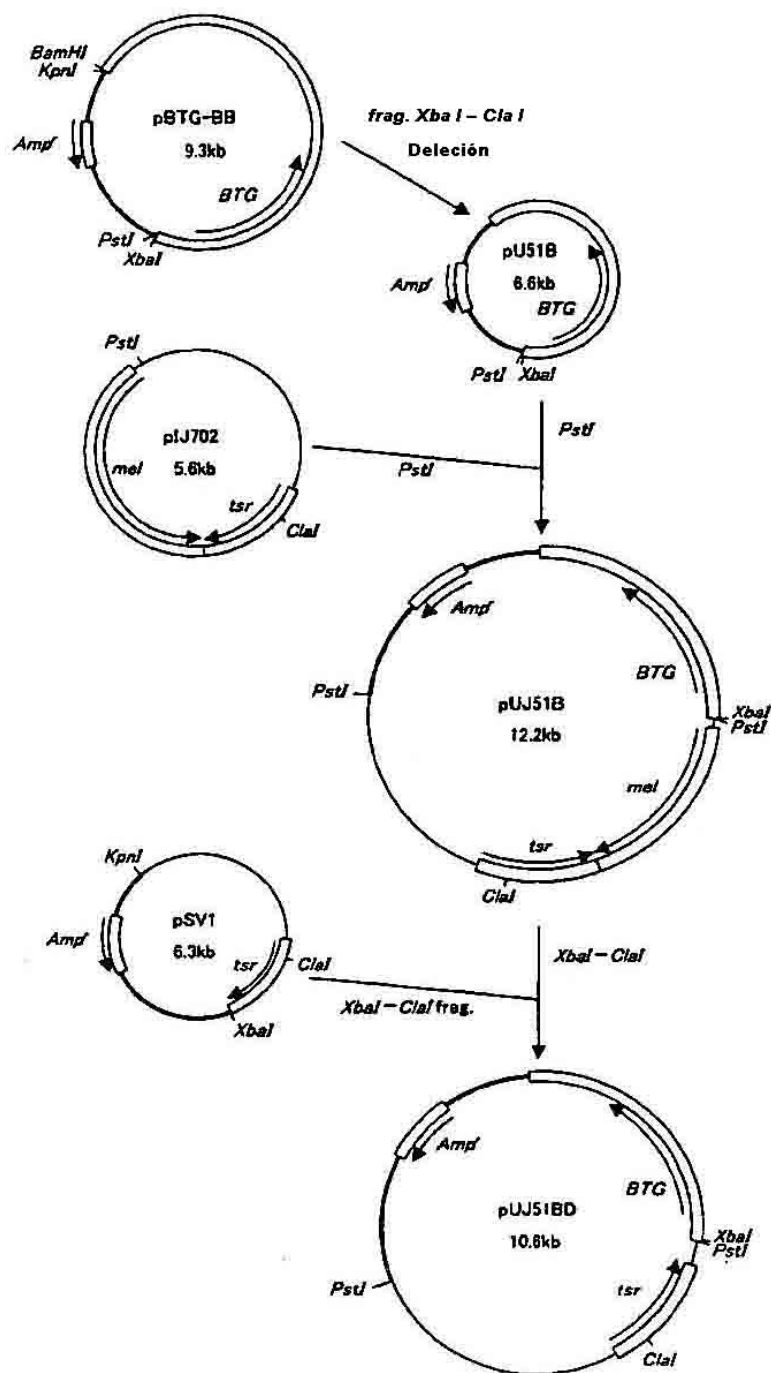


Fig.3

Intervalo de secuencia: 1 a 699

```

      10      20      30      40      50      60
GATCTTCCGG GACATCTGAG GCGCCGGAGG CGATCCGAGG CGCCCGAGGC GTCTCCGCGA

      70      80      90     100     110     120
AGGGCGCCGC CGTGCCGTCC ATCCCCGTCC GCGTCGACGC GGGCCGGGAG GGGGTGCGGC

     130     140     150     160     170     180
GGCGCCCTTC GGCTGTGTGG ACGAAGCGTC GGGTCGGAGG GGCGGCCGGA TATCGTCCTT

     190     200     210     220     230     240
GGGGCGGGGT GGCCGGAATT GCCGCCATGG TGTGCCCGGG GAATCGACCC GAAGACATGA

     250     260     270     280     290     300
TCACTTCTCG TATCCACCCG ATCACGTATC CGGGAGTCGA GAAGTGTTAC GCCGTGCCCC

     310     320     330     340     350     360
TGTCGCGGTC CTCACCCCTG TCGCCGTGAC AGCGACCCGC GTTCTTCCAC TCGCACGGAC

     370     380     390     400     410     420
GGCCCCACAG GACCTTTCCG CCGGGGCTCG CCCC GCCGCC TCGGTGACGG CCTCCGAATA

     430     440     450     460     470     480
ACGCGGCCGC CGGGGCCCTCG GCCGGTTGAC CGATCCGGGT CACGCGCCCC GCCGGGCGGG

     490     500     510     520     530     540
CGGCCACGTC CGGTCTCGCC CCGCCCGACA TCGGCTGCGA CTGCCTTCGC TCGCACTTCT

     550     560     570     580     590     600
TCCCGCCTCC CGGCCGCGTT TTTCGCCCGC CGAAGGTGCG GCGACGCGTA CCGAATCCCC

     610     620     630     640     650     660
CTTCATCGCG ACGTGCTTCC GCACGGCCGC GTTCAACGAT GTTCACGAC AAAGGAGTTG

CAGGTTTCC

```

Fig.4

```

GATCTTCCGG GACATCTGAG GCGCCGGAGG CGATCCGAGG CGCCCGAGGC GTCGCGCGA 60
AGGGCGCCGC CGTGCCGTCC ATCCCCGTCC GCGTCGACGC GGGCCGGGAG GGGGTGCGGC 120
GGCGCCCTTC GGCTGTGTGG ACGAAGCGTC GGGTCGGAGG GGCGGCCGGA TATCGTCCTT 180
GGGGCGGGGT GGCCGGAATT GCGCCATGG TGTGCCGGG GAATCGACCC GAAGACATGA 240
TCACTTCTCG TATCCACCCG ATCACGTATC CGGGAGTCGA GAAGTGTTAC GCGGTGCCCC 300
TGTCGCGTC CTCACCCCTG TCGCCGTGAC AGCGACCCGC GTTCTTCAC TCGCAGGAC 360
GGCCCCACAG GACCTTTCGG CCGGGGCTCG CCGCGCCGCC TCGGTGACGG CTECGAATA 420
ACCGCGCCGC CGGGGCTCG GCGCGTTGAC CGATCCGGGT CACGCGCCCC GCGGGCGGG 480
CGGCCACGTC CGGTCTCGCC CCGCCCGACA TCGGTGCGA CTGCCTTCGC TCGCACTTCT 540
TCCCGCTTCC CGGCCCGTT TTTCCGCCGC CGAAGGTGGC GCGACGCGTA CCGAATCCCC 600
CTTCATCGCG ACGTGCTTCC GCACGGCCGC GTTCAACGAT GTTCCACGAC AAAGGAGTTG 660
CAGGTTTCC ATG CGC ATA CGC CGG AGA GCT CTC GTC TTC GCC ACT ATG AGT
          Met Arg Ile Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser>
              1              5              10

          720
GCG GTG TTA TGC ACC GCC GGA TTC ATG CCG TCG GCC GGC GAG GCC GCC
Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala>

          780
GCC GAC AAT GGC CGC GGG GAA GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC TAC
Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr>

          840
CGC CTC ACG GCG GAT GAC GTC GCG AAC ATC AAC GCG CTC AAC GAA AGC
Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser>

          900
GCT CCG GCC GCT TCG AGC GCC GGC CCG TCG TTC CCG GCC CCC GAC TCC
Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser>

GAC GAC AGG GTC ACC CCT CCC GCC GAG CCG CTC GAC AGG ATG CCC GAC
Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp>

          960
CCG TAC CGT CCC TCG TAC GGC AGG GCC GAG ACG GTC GTC AAC AAC TAC
Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr>

          1020
ATA CGC AAG TGG CAG CAG GTC TAC AGC CAC CGC GAC GGC AGG AAG CAG
Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln>

          1080
CAG ATG ACC GAG GAG CAG CGG GAG TGG CTG TCC TAC GGC TGC GTC GGT
Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly>

          1140
GTC ACC TGG GTC AAT TCG GGT CAG TAC CCG ACG AAC AGA CTG GCC TTC
Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe>

GCG TCC TTC GAC GAG GAC AGG TTC AAG AAC GAG CTG AAG AAC GGC AGG
Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg>

          1200
CCC CGG TCC GGC GAG ACG CGG GCG GAG TTC GAG GGC CGC GTC GCG AAG
Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys>

          1260
GAG AGC TTC GAC GAG GAG AAG GGC TTC CAG CGG GCG CGT GAG GTC GCG
Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala>

```

Fig.5

TCC GTC ATG AAC AGG GCC CTG GAG AAC GCC CAC GAC GAG AGC GCT TAC
 Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr>
 CTC GAC AAC CTC AAG AAG GAA CTG GCG AAC GGC AAC GAC GCC CTG CGC
 Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg>
 AAC GAG GAC GCC CGT TCC CCG TTC TAC TCG GCG CTG CGG AAC ACG CCG
 Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro>
 TCC TTC AAG GAG CCG AAC GGA GGC AAT CAC GAC CCG TCC AGG ATG AAG
 Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys>
 GCC GTC ATC TAC TCG AAG CAC TTC TGG AGC GGC CAG GAC CGG TCG AGT
 Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser>
 TCG GCC GAC AAG AGG AAG TAC GGC GAC CCG GAC GCC TTC CGC CCC GCC
 Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala>
 CCG GGC ACC GGC CTG GTC GAC ATG TCG AGG GAC AGG AAC ATT CCG CGC
 Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg>
 AGC CCC ACC AGC CCC GGT GAG GGA TTC GTC AAT TTC GAC TAC GGC TGG
 Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp>
 TTC GGC GCC CAG ACG GAA GCG GAC GCC GAC AAG ACC GTC TGG ACC CAC
 Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His>
 GGA AAT CAC TAT CAC GCG CCC AAT GGC AGC CTG GGT GCC ATG CAT GTC
 Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val>
 TAC GAG AGC AAG TTC CGC AAC TGG TCC GAG GGT TAC TCG GAC TTC GAC
 Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp>
 CGC GGA GCC TAT GTG ATC ACC TTC ATC CCC AAG AGC TGG AAC ACC GCC
 Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala>
 CCC CAC AAG GTA AAG CAG GGC TGG CCG TGA TGTGAGC GGGGTGGAGG
 Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro ***>
 GGAGCCGGTT GCCCGGCTCC CCTCCACCT CTECCCGCC ACCACGAAAG TCGTACAGC
 TCGTGTCCCG TCGTGTGTC GACGTGGCC GGGAGTTCG CCTCGTGGC GTGCCCCTC
 GTCGGCGTGC CCGTGGGTTC GAACATGAGG ATGGAGCCG CCGGGAGGA CGGCTTGTG
 TCGGTGCCCT TCGGCACCAC GAAGGTGTC CCCTTGTGCA GCGGCACCGT GTGTTCGTT
 CCGTCCGAGT CCGGAGCGC CACGTCAAG CCGCCGTCCA GGACGAGGA GAACCTGTCG
 GTGTCTCGT GGACGTGCA GACGTGCTG CCTCGGGTGT GGGCGACCG GACGTCTAG
 TCGTTCATG GGGCGACGAT GCGGGGCTG TAGACGTCT CGAAGGAGC GAGGGCTTG
 GCGAGGTGA CCGGCTCGT GTCGTTCATG GTCCGAGTCT CCGCGGAGC CCGCCCGGC
 CTC

Fig.6

	Cantidad de BTG en el sobrenadante de cultivo
ABL-1:pUJ51BD / <i>S.lividans</i> 3131TS	0,7 g/L
ABM-1:pUJ51BD / <i>S.mobaraensis</i> S-8112	0,5 g/L

Fig.7

