

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 710**

51 Int. Cl.:

C12N 9/58 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 10711273 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2411512**

54 Título: **Proteasa coagulante de la leche de tipo mejorado derivada de un microorganismo**

30 Prioridad:

24.03.2009 JP 2009071592

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

04.03.2014

73 Titular/es:

**MEITO SANGYO CO., LTD. (100.0%)
41, Sasazuka-cho 2-chome, Nishi-ku, Nagoya-shi
Aichi 451-8520, JP**

72 Inventor/es:

**HARADA, KAZUNORI;
KOBAYASHI, HIROYUKI;
SUGA, TARO;
YAMAGUCHI, HIROYUKI;
TSUNODA, AKIRA y
KATO, SHIGEAKI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 445 710 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

Proteasa coagulante de la leche de tipo mejorado derivada de un microorganismo

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una proteasa que tiene una actividad coagulante de la leche mejorada derivada de un microorganismo. La proteasa se utiliza preferentemente para la producción de queso.

10 **Técnica antecedente**

Durante muchos años se ha utilizado el cuajo de ternero como enzima coagulante de la leche para la producción de queso. La actividad coagulante de la leche del cuajo de ternero se atribuye principalmente a la quimosina, que es una proteasa ácida y que tiene una actividad proteasa específica del sitio para la caseína de la leche con una baja actividad no específica del sitio (digiere específicamente la unión peptídica entre fenilalanina en la posición 105 y metionina en la posición 106 en la secuencia aminoacídica de la κ -caseína). La actividad proteasa no específica se cree que da lugar a la reducción en el rendimiento de la producción de leche y a generar un péptido de sabor amargo durante la maduración. Por esta razón, la quimosina es una enzima coagulante de la leche excelente.

20 Sin embargo, el descenso de la matanza de terneros y el aumento de la demanda de queso han hecho que sea difícil el suministro de cuajo de ternero. Hoy día, se utiliza ampliamente como enzima coagulante de la leche una enzima coagulante de la leche derivada de microorganismos tales como *Rhizomucor miehei* y *Rhizomucor pusillus*, y una quimosina recombinante producida por la introducción del gen de la quimosina de ternero en hongos o levaduras.

25 La enzima coagulante de la leche mencionada anteriormente derivada de un microorganismo, cuando se compara con la quimosina de ternero o la quimosina recombinante, tiene una actividad proteasa no específica más alta. Es un problema cuando la relación C/P (relación entre actividad de coagulación láctea con respecto a la actividad proteasa), que es una importante característica de la enzima de coagulación láctea, es baja. Con el fin de resolver este problema, se expresó y se evaluó una variante del gen de la enzima que coagula la leche en *Rhizomucor pusillus*, obtenida por mutagénesis dirigida al sitio por manipulación genética. En la variante, la relación C/P se mejoró para que fuera mejor que el tipo silvestre sustituyendo el ácido glutámico de la posición 19 con alanina en la secuencia aminoacídica de la enzima coagulante de la leche (Documento No patente 1).

35 Sin embargo, aunque la actividad coagulante de la leche de la enzima coagulante de la leche desciende aproximadamente en un 40 % con la sustitución de aminoácidos, era difícil poner dicha enzima en una aplicación práctica. Por tanto, se desea una enzima coagulante de la leche derivada de un microorganismo en la que la relación C/P sea alta y la actividad coagulante de la leche se mantenga o se mejore.

40 Además, se ha intentado la acilación de la enzima coagulante de la leche derivada de microorganismos tales como *Rhizomucor pusillus* y *Rhizomucor miehei* con anhídrido dicarboxílico con el fin de mejorar la relación C/P. (Documento patente 1). Con este procedimiento, se obtuvo alguna mejoría, sin embargo no es aún satisfactorio.

[Documento Patente 1] Patente Japonesa N° 3-18834B

45 [Documento No Patente 1] J. Biochem. 129, 791-794, 2001

Sumario de la Invención

50 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una proteasa adecuada para la coagulación láctea en la que la actividad (a partir de ahora denominada "actividad proteasa no específica") para digerir un enlace peptídico distinto del enlace entre fenilalanina en la posición 105 y metionina en la posición 106 de la secuencia aminoacídica de la κ -caseína es baja, y se mantiene o mejora la actividad coagulante de la leche.

55 Los inventores de la presente invención han estudiado intensamente para superar el problema descrito anteriormente, y aislaron, entre las cepas mutantes de microorganismos que producen una enzima coagulante de la leche, una cepa mutante que produce una enzima coagulante de la leche en la que la relación C/P está mejorada debido a la reducción de la actividad proteasa no específica; aislaron un gen de la enzima coagulante de la leche de tipo mejorado; determinaron la secuencia de nucleótidos del mismo; expresaron el gen; y midieron la actividad coagulante de la leche y la relación C/P de la enzima coagulante de la leche de tipo mejorado, completando de esta manera la presente invención.

65 En consecuencia, la presente invención proporciona una proteasa derivada de los microorganismos que tienen una actividad coagulante de la leche, cuya actividad coagulante de la leche se mantiene o está aumentada y la relación C/P está aumentada, también proporciona un ADN que codifica esa proteasa, un vector que contiene el ADN y una célula transformada en la que se ha introducido el vector.

Un aspecto de la presente invención es proporcionar una proteasa de tipo mejorado que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 75 % idéntica a la SEC ID N° 3, dicha proteasa de tipo mejorado tiene al menos una mutación seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 5 (A) sustitución de la glutamina correspondiente a la glutamina en la posición 265 de la SEC ID N° 3 con un aminoácido ácido; y
 (B) sustitución de la glutamina en la posición 266 de la SEC ID N° 3 con un aminoácido ácido, y en el que dicha proteasa de tipo mejorado tiene actividad coagulante de la leche.

- 10 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar la proteasa de tipo mejorado como se describió anteriormente, la cual se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- (A) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43 excepto por que la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 se ha(n) sustituido con un aminoácido ácido.
 15 (B) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica de la SEC ID N° 3 o 43 excepto por que la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 se ha(n) sustituido con un aminoácido ácido y no más de 10 aminoácidos (preferentemente no más de 5 aminoácidos, más preferentemente no más de 3 aminoácidos, más preferentemente no más de 2 aminoácidos) en posiciones distintas de 265 y 266 se han sustituido, borrado, insertado o añadido, y en el que dicha proteasa de tipo mejorado tiene actividad coagulante de la leche.

- 20 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar la proteasa de tipo mejorado como se ha descrito anteriormente, en el que dicho aminoácido ácido es ácido glutámico o ácido aspártico.

- Otro aspecto de la presente invención es proporcionar la proteasa de tipo mejorado que se ha descrito anteriormente, en la que el ácido glutámico de la posición 19 se sustituye con valina, alanina, isoleucina o leucina.

- 25 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar la proteasa de tipo mejorado que se ha descrito anteriormente, en la que la treonina de la posición 81 se ha sustituido con glutamina o ácido aspártico.

Un aspecto más de la presente invención es proporcionar un ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado que se ha descrito anteriormente.

- 30 Un aspecto más de la presente invención es proporcionar un vector de expresión que comprende el ADN que se ha descrito anteriormente.

Un aspecto más de la presente invención es proporcionar una célula transformada en la que se ha introducido el vector de expresión descrito anteriormente.

Un aspecto más de la presente invención es proporcionar la células transformada que se ha descrito anteriormente, siendo dicha célula transformada *Saccharomyces cerevisiae*.

- 35 Un aspecto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir una proteasa de tipo mejorado que tiene una actividad coagulante de la leche, que comprende las etapas de cultivo de la célula transformada que se ha descrito anteriormente en un medio de cultivo y la recolección de la proteasa del tipo mejorado en el medio de cultivo.

- 40 Como la actividad coagulante de la leche se mantiene o se mejora y la relación C/P es alta, se espera que el rendimiento de producción de queso sea más alto con la enzima de tipo mejorado de la presente invención. Además, generalmente una relación C/P más alta implica que el desarrollo de sabor amargo en el queso durante la maduración se reduce, es decir se puede fabricar queso de alta calidad con la enzima mejorada.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la estructura de un vector de expresión JS4.

La Figura 2 muestra el alineamiento de la secuencia de la proteasa proveniente de *Rhizomucor pusillus* (RMPP) y la proteasa proveniente de *Rhizomucor miehei* (RMMP).

50 **Descripción de las realizaciones de la invención**

La presente se ilustrará en detalle a continuación.

- 55 1. Proteasa de tipo mejorado (enzima de coagulante de la leche) de la presente invención

La proteasa tipo mejorado de la presente invención comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 75 % idéntica a la SEC ID N° 3, y tiene al menos una mutación seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 60 (A) la sustitución de glutamina correspondiente a la glutamina en la posición 265 de la SEC ID N° 3 por un aminoácido ácido; y
 (B) la sustitución de glutamina en la posición 266 de la SEC ID N° 3 por un aminoácido ácido, y que tiene actividad de coagulación láctea.

- 65 Ejemplos del aminoácido ácido mencionado anteriormente incluyen el ácido glutámico y el ácido aspártico. La proteasa de tipo mejorado de la presente invención tiene preferentemente una identidad de secuencia no menor

del 90 %, más preferentemente no menor del 95 % con la secuencia aminoacídica completa SEC ID N° 3,

En una realización, la proteasa de tipo mejorado de la presente invención se puede obtener introduciendo la(s) mutación(es) en una proteasa de tipo silvestre derivada de *Rhizomucor miehei* (SEC ID N° 3). En esta realización, la proteasa tipo mejorado de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:

(A) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 excepto por la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 que se ha(n) sustituido con un aminoácido ácido.

(B) una proteína que comprende secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 excepto por la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 que se ha(n) sustituido con un aminoácido ácido y además no se han sustituido, delecionado, insertado o añadido más de 10 aminoácidos en las otras posiciones distintas de la 265 y 266.

La Fig. 2 muestra el alineamiento de la secuencia de la proteasa de *Rhizomucor pusillus* y la proteasa de *Rhizomucor miehei*. En ambas secuencias, los aminoácidos de las posiciones 265 y 266 se conservan, por lo que la proteasa de tipo mejorado de la presente invención también se pueden obtener introduciendo una(s) mutación(es) en una proteasa tipo silvestre de *Rhizomucor pusillus* (SEC ID N° 43). Por eso, en otra realización, la proteasa de tipo mejorado de la presente invención puede ser una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEC ID N° 43 excepto que la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 se ha(n) sustituido por un aminoácido ácido. Además, esta proteasa de tipo mejorado puede tener otra mutación (sustituciones, deleciones, inserciones, o adiciones de no más de 10 aminoácidos) distinta de la(s) sustitución(es) en la glutamina de la posición 265 y/o la glutamina de la posición 266, siempre y cuando tenga actividad coagulante de la leche.

En la proteasa de tipo mejorado de la presente invención, el ácido glutámico en la posición 19 y la treonina en la posición 81 de la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43 se pueden sustituir con otros aminoácidos. El ácido glutámico en la posición 19 se sustituye, preferentemente, con valina, alanina, isoleucina o leucina, mientras que la treonina en la posición 81 se sustituye preferentemente con glutamina o ácido aspártico.

En la presente invención, "posición 265", "posición 266", "posición 19" y "posición 81" no indica necesariamente una posición absoluta a partir del extremo N de la proteasa sino que indica una relación relativa en comparación con la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43. Por ejemplo, en la proteasa que tiene la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43, cuando se produce la deleción de un aminoácido en el lado del extremo N desde la posición 265, la posición 265 mencionada anteriormente entonces es la posición 264. Incluso en tal caso, el aminoácido en la posición 264 contada desde el resto del extremo N es el aminoácido de "posición 265" en la presente invención. La posición absoluta del aminoácido se determina por el alineamiento de la secuencia aminoacídica de una proteasa de interés con la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43. El aminoácido indicado por la expresión "que corresponde a" también significa un aminoácido en una posición relativa comparada con la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43.

Las SEC ID N° 3 y SEC ID N° 43 son secuencias aminoacídicas de la proteasa tipo maduro. La proteasa tipo mejorado de la presente invención puede incluir la secuencia aminoacídica de un péptido de señal, un propéptido y similares.

Con el procedimiento que se describe en los Ejemplos de esta descripción, reproduciendo una cepa mutante que produce una proteasa de tipo mejorado con una relación C/P alta a partir de un microorganismo de tipo silvestre que produce una proteasa que tiene una actividad coagulante de la leche con una relación C/P comparativamente baja y cultivando la cepa mutante en un medio, se puede obtener la proteasa de tipo mejorado de la presente invención a partir de la célula de la cepa mutante o del medio. Ejemplos de microorganismos que producen la proteasa de tipo silvestre con una relación C/P comparativamente baja incluye una cepa del tipo silvestre de *Rhizomucor miehei* (ATCC 16457), *Rhizomucor pusillus* (ATCC 16458), y cepas derivadas de las mismas. Estas cepas se pueden adquirir en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108 EEUU). La proteasa de tipo mejorado de la presente invención también se puede obtener aislando un ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de la cepa mutante mencionada anteriormente y expresando el ADN.

Además, la proteasa tipo mejorado de la presente invención también se puede obtener aislando un ADN que codifica la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 o 43 de una cepa tipo silvestre de *Rhizomucor miehei* (ATC 16457), *Rhizomucor pusillus* (ATCC 16458), o cepas derivadas de las mismas y modificando el ADN por mutagénesis dirigida al sitio para que codifique la proteasa de tipo mejorado de la presente invención, y a continuación expresando el ADN modificado.

La expresión del ADN mencionado anteriormente puede llevarse a cabo construyendo un vector de expresión que contenga el ADN mencionado anteriormente e introduciéndolo en una célula huésped. Aunque la célula huésped puede ser una célula procariota o una célula eucariota, es preferible que sea una célula eucariota. Ejemplos de células eucariotas incluyen células de levaduras, células de hongos, y células vegetales. Se prefieren las células de levaduras y son particularmente preferidas las células de *Saccharomyces cerevisiae*.

La relación C/P de la proteasa tipo mejorado de la presente invención es mayor que la relación C/P de la proteasa tipo silvestre correspondiente (SEC ID N° 3 o 43). La relación C/P de la proteasa tipo mejorado de la presente invención es preferentemente no menos de 1,2 veces, más preferentemente no menos de 1,5 veces, y más preferentemente aún, no menos de 2,0 veces más alta que la relación C/P de la proteasa de tipo silvestre (SEC ID

N° 3 o 43).
La relación C/P en el presente documento indica [actividad coagulante de la leche (ACL)] / [actividad proteasa (AP)]. La medición de AP y ACL se puede llevar a cabo con los procedimientos descritos a continuación. Aunque para la medición de la ACL hay un Procedimiento de Referencia Internacional (descrito en ISO15174, IDF 176; Cebadora edición 01-09-2002, Especificaciones Autoimpuestas para Aditivos Alimentarios), el valor de ACL en la presente descripción se calculó por procedimiento siguiente (denominado en el presente documento como procedimiento Meito).

[1] Medición de AP

La caseína producida a partir de leche (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se disuelve en una solución de fosfato hidrógeno disódico 0,05 M y se ajusta el pH a 6,0 con una solución de ensayo de ácido clorhídrico a 1 mol/l, para preparar una solución sustrato de caseína al 0,6 %. Una muestra de ensayo (0,2 ml), que se había diluido adecuadamente, se añade a 1 ml de esta solución sustrato. La mezcla de deja reaccionar a 37 °C durante 10 a 30 minutos y luego se finaliza la reacción añadiendo 1 ml de una solución de parada de reacción (una solución que es una mezcla de ácido tricloroacético a 0,11 mol/l, acetato sódico anhidro a 0,21 mol/l, y ácido acético a 0,33 mol/l). Se obtiene el sobrenadante por centrifugación y se añade 1 ml de carbonato sódico anhidro 0,55 mol/l a 0,4 ml de sobrenadante, y luego se añaden 0,2 ml de un reactivo de fenol fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (reactivo de Folin-Ciocalteu) diluido dos veces. La mezcla se deja reaccionar a 37 °C durante 30 minutos y se mide la absorbancia (longitud del camino óptico) a 660 nm. De manera separada, se añade un mililitro de la solución de parada de reacción a 1 ml de la solución sustrato, y a continuación se añaden 0,2 ml de una muestra de ensayo. A partir de entonces, se prepara la mezcla de la misma manera y el resultante se utiliza como un blanco. Un valor obtenido restando la absorbancia del blanco de la absorbancia de la muestra de ensayo se convierte en cantidad de tirosina libre para calcular el valor de la AP. La unidad de AP es Unidades/ml. Esta 1 Unidad se refiere a la cantidad de enzima que produce un aumento en la coloración de la sustancia reactivo de fenol equivalente a 1 μmol de tirosina en 1 minuto en el procedimiento mencionado anteriormente. También, la ecuación de correlación entre la tirosina y la coloración de una sustancia reactiva de fenol se obtiene preparando una curva de calibración de tirosina como se describe a continuación.

Curva de calibración de tirosina

Se seca una tirosina de referencia (peso molecular 181,2, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 105 °C durante 3 horas. Luego se pesan con precisión 0,050 g de la tirosina de referencia y se disuelve en solución de ensayo de ácido clorhídrico a 0,2 mol/l hasta alcanzar exactamente un volumen final de 50 ml. Se miden precisamente 1, 2, 3 y 4 ml de esta solución y se añade a cada una solución de ensayo de ácido clorhídrico a 0,2 mol/l hasta alcanzar un volumen exacto de 100 ml. Se miden precisamente dos ml de cada solución. Luego se añaden 5 ml de solución de ensayo de carbonato sódico de 0,55 mol/l y 1 ml de reactivo de fenol diluido dos veces. Inmediatamente después de esto, la mezcla se mezcla con agitado y se deja permanecer a 37±0,5 °C durante 30 minutos. De la solución obtenida se toman 2 ml y se miden las absorbancias A1, A2, A3 y A4 a una longitud de onda de 660 nm junto a una solución de control preparada de forma similar. Poniendo las absorbancias A1, A2, A3 y A4 a lo largo del eje vertical y la cantidad de tirosina (μmol) en 2 ml de cada solución a lo largo del eje horizontal, se prepara la curva de calibración para determinar la cantidad de tirosina (μmol) para una diferencia de absorbancia de 1.

[2] Procedimiento de ensayo para ACL (procedimiento Meito)

Se disuelve leche desnatada desecada, preferentemente fabricada por CHR.HANSEN (al 10 %) en cloruro cálcico 0,01 M (pH 6,0) para usarla como sustrato. Una solución de muestra de ensayo (0,5 ml) preparada a una concentración a la que se forman coágulos durante 2 a 5 minutos, preferentemente cada 2 minutos 30 segundos, se añaden a 5 ml de este sustrato, y la mezcla de mantiene a 35 °C. Mientras se agita la mezcla con una varilla de cristal, se observa la formación de coágulos para medir el tiempo de formación. Se compara con un valor de la referencia de la cual se conoce la ACL, que es un valor que se mide de manera similar, se determina la ACL calculando cuánta (veces adecuadas) cantidad más de sustrato se necesita para coagular el sustrato en una unidad de tiempo. La ecuación para calcularlo es la siguiente:

$$ACL \text{ (Mu/ml)} = S \times (T_s \times W_s) / (T \times W)$$

S: actividad específica de la enzima coagulante de la leche de la referencia (Mu/g)

T_s: Tiempo para la coagulación de la solución de referencia (segundos)

W_s: cantidad de la referencia en 1 ml de solución de referencia (g)

T: tiempo para la coagulación de leche de la solución de la muestra de ensayo (segundos)

W: cantidad de la muestra de ensayo en 1 ml de la solución de la muestra de ensayo (ml)

Además, la ACL se puede calcular también por cantidad de unidad proteica cuantificando la cantidad total de proteínas contenida en la muestra de ensayo. En el Ejemplo 13 descrito posteriormente, se calcula la ACL por 1 mg de proteína (Mu/mg de proteína).

- 5 El valor de la ACL calculada por el procedimiento mencionado anteriormente tiene una correlación con el valor de ACL calculado por el Estándar Internacional (descrito en ISO15174, IDF 176; Cebadora edición 01-09-2002, Especificaciones Autoimpuestas para Aditivos Alimentarios). La correlación se puede mostrar con la siguiente fórmula.

10 **1 unidad estándar internacional (IMCU/ml) \approx 1 unidad procedimiento Meito (Mu/ml) / 100**

La ACL de la proteasa de la presente invención es preferentemente sustancialmente igual a o mayor que la ACL de la proteasa de tipo silvestre. Cuando la proteasa de la presente invención y la proteasa del tipo silvestre (SEC ID N° 3 o 43) se preparan bajo condiciones idénticas para comparar sus ACL, la ACL de la proteasa de tipo mejorado de la presente invención es preferentemente no menor de 0,8 veces, más preferentemente no menor de 0,9 veces, más preferentemente aún no menor de 1,0 vez más alta que la ACL de la proteasa de tipo silvestre.

Un ejemplo de preparación de la proteasa tipo mejorado de la presente invención y la proteasa tipo silvestre bajo condiciones idénticas incluye la incorporación del ADN que codifica cada proteasa en un vector idéntico para la expresión génica, introduciendo cada uno de estos vectores de expresión en una célula de una cepa idéntica en unas condiciones idénticas, y cultivar la célula bajo condiciones idénticas de cultivo para obtener un cultivo como una solución de proteasa. El cultivo obtenido se puede condensar de una manera idéntica o purificar de manera idéntica para utilizarse.

2. ADN que codifica la proteasa tipo mejorado de la presente invención

25 El ADN de la presente invención es un ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de la presente invención. Ejemplos específicos del ADN de la presente invención incluyen un ADN que comprende los nucleótidos 208 a 1.290 de la SEC ID N° 1 y un ADN que comprende una secuencia que se hibrida con la secuencia de nucleótidos complementaria a los nucleótidos 208 a 1.290 de la SEC ID N° 1 bajo condiciones estrictas; y que codifica la proteasa de tipo mejorado que tiene las propiedades mencionadas anteriormente. Ejemplos específicos del ADN de la presente invención incluyen también un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 42 y un ADN que comprende una secuencia que se hibrida con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 42 bajo condiciones estrictas; y que codifica la proteasa tipo mejorado que tiene las propiedades descritas anteriormente. Condiciones estrictas significa condiciones en las que se forma el denominado híbrido específico mientras que no se forma un híbrido no específico. Aunque las condiciones varían dependiendo de la secuencia de nucleótidos o su longitud, los ejemplos de las mismas incluyen condiciones en las que el ADN con alta homología, por ejemplo los ADN que tienen una homología no menor del 75 %, preferentemente no menor del 90 %, más preferentemente no menor del 95 %, se hibridan mutuamente, y los ADN que tienen una homología menor no se hibridan, o condiciones de hibridación, que sean las condiciones normales para el lavado en la hibridación de Southern, a 60 °C y SSC 1x, un 0,1 % SDS, preferentemente SSC 0,1x y una concentración de sal equivalente a un 0,1 % de SDS.

45 El ADN que codifica una proteasa de la presente invención se puede aislar de la cepa mutante que tiene la proteasa tipo mejorado mencionada anteriormente por procedimientos convencionales de clonación genética. Por ejemplo, se puede aislar seleccionando el ADN de una biblioteca de genes de la cepa mutante mencionada anteriormente por hibridación con una sonda de oligonucleótidos sintética que tenga como base la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1 o 42.

50 También, se puede obtener el ADN que codifica una proteasa de tipo mejorado de la presente invención diseñando cebadores basados en la secuencia de nucleótidos conocida del ADN genómico o del ADNc del gen de la proteasa del tipo silvestre, y amplificando el ADN que proviene de la biblioteca de ADN genómico o del ADNc de la cepa mutante mencionada anteriormente utilizando los cebadores.

55 El ADN obtenido introduciendo una mutación dirigida al sitio en un ADN tipo silvestre está incluido también entre los ADN que codifican una proteasa de la presente invención.

60 Por ejemplo, un ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de la presente invención se puede obtener fácilmente aislando un ADN que codifique la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3 de la cepa tipo silvestre de *Rhizomucor miehei* (ATCC 16457) o su cepa derivada, e introduciendo la mutación dirigida al sitio en él. También se puede obtener un ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de la presente invención aislando el ADN que codifica la secuencia aminoacídica SEC ID N° 43 de la cepa tipo silvestre de *Rhizomucor pusillus* (ATCC 16458) o su cepa derivada, e introduciendo la mutación dirigida al sitio en él.

65 La introducción de la mutación dirigida al sitio se puede llevar a cabo por un procedimiento que es conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir sintetizando cebadores que tienen un sitio de escisión de enzimas de restricción en un extremo y que contienen el sitio de mutación en el otro extremo, y

sustituyendo una parte correspondiente en un gen no mutado con la parte mutada (procedimiento mutación con casete).

Como procedimientos para la introducción de la mutación dirigida al sitio, por ejemplo, se conocen el procedimiento dúplex Gapped y el procedimiento Kunkel. El procedimiento Kunkel se basa en un principio en el cual el gen no mutado se clona en un fago de cadena sencilla; y se sintetiza una cadena complementaria utilizando un ADN sintético que contiene una falta de coincidencia para un punto mutado como cebador, y luego se producen un nuevo fago y un ADN replicado solamente con la cadena complementaria obtenida que contiene la mutación como matriz. La mutagénesis dirigida al sitio puede llevarse a cabo utilizando un kit disponible comercialmente.

3. Vector de expresión de la presente invención

El vector de expresión de la presente invención se utiliza para expresar la proteasa de tipo mejorado de la presente invención. Puede tener una estructura en la que una secuencia promotora que controla la expresión del ADN está ligada corriente arriba del ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de la presente invención. Además, también puede haber un terminador ligado corriente abajo del ADN.

Se puede utilizar como promotor mencionado anteriormente, cuando el huésped es *E. coli*, *trp*, *lac*, *taq*, λ P_L o similares. Cuando el huésped es una levadura, se prefieren los promotores GAL7, ADH, TPI, o PHO5 o similares, y entre estos, se prefiere GAL7 debido a que promueve la expresión génica fuertemente (Nogi Y. y col. Nucl. Acids Res. 11, 8555-8568 (1983)).

Ejemplos del terminador incluyen TPI, GAPDH, y GAL 10. El vector de la presente invención se puede construir uniendo el promotor mencionado anteriormente, el ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de la presente invención, el terminador mencionado anteriormente en orden desde el 5' corriente arriba al 3' corriente abajo e insertando el resultado en un vector.

Como un vector capaz de replicarse en levaduras, se puede utilizar cualquier tipo de los plásmidos denominados Ylp, YRp, YEp y YCp. Desde el punto de vista del número de copias y de estabilidad, se prefiere el tipo YEp. Aunque estos plásmidos generalmente contienen una secuencia innecesaria, en atención a la estabilidad del plásmido, o con el fin de facilitar la modificación del plásmido, se prefiere eliminar la secuencia innecesaria.

Se puede insertar también en el vector de expresión de la presente invención, un gen marcador de selección para seleccionar un recombinante o un gen indicador para comprobar la expresión del gen introducido. Ejemplos del gen marcador incluyen los genes de resistencia a la hidromicina, genes resistentes a la kanamicina, y genes de resistencia a la ampicilina. Ejemplos de genes indicadores incluyen genes beta-glucuronidasa (GUS), genes de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), genes de la luciferasa (LUC) y genes GFP. Además, se puede incluir una secuencia adicional en el vector de expresión de la presente invención con el fin de expresar la proteasa de tipo mejorado de la presente invención como un tipo secretor o para facilitar la purificación de la proteasa que se expresa. En este caso la proteasa de la presente invención se expresa como una proteína de fusión con una proteína o péptido que están codificados por la secuencia adicional. Ejemplos de la secuencia adicional incluyen una secuencia de nucleótidos que codifican un péptido de señal o propéptido y la secuencia de nucleótidos que codifican una marca His, o una marca GST.

4. Célula transformada de la presente invención

Una célula transformada de la presente invención en la que se ha introducido el vector de expresión de la presente invención, es una célula capaz de producir la proteasa de tipo mejorado de la presente invención. Aunque la célula puede ser una célula procarionota o puede ser una célula eucariota, se prefiere que sea una célula eucariota.

Ejemplos de células eucariotas incluyen células de levaduras, células de hongos, y células vegetales. Se prefieren las células de levaduras y particularmente se prefiere el *Saccharomyces cerevisiae*. Ejemplos de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las cepas SHY3, D13-1A y MC 16.

Un procedimiento para introducir el vector de expresión en la célula huésped se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de los tipos de células huésped. Tales procedimientos son conocidos por los expertos en la técnica. Un transformante de *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, se puede obtener por el siguiente procedimiento.

El *Saccharomyces cerevisiae* cultivado en el medio de cultivo YPD (un 1 % de extracto de levadura (fabricado por Difco), un 2 % de Bactopeptona (fabricado por Difco) y un 2 % de glucosa) durante una noche, se inocula en un medio de cultivo YPD recién preparado hasta un volumen final del 10 %, se cultiva a 30 °C durante 4 horas. El cultivo obtenido (1,5 ml) se somete a centrifugación ligera con una centrífuga desk-top para recolectar las células. Las células se aclaran con LiSCN 0,2 M (fabricado por Kanto Chemical Co. Inc.) y se suspenden en 0,02 ml de LiSCN 1 M.

Posteriormente, se mezclan 0,01 ml de una solución que contiene el vector de expresión (aproximadamente 1 a 10 µg) y 0,02 ml de PEG4000, y la mezcla se mantiene a 30 °C durante 1 hora. Esta mezcla se diluyó añadiendo 0,14

ml de agua estéril y luego se colocaron en dos placas SDah (un 0,67 % de Bacto-yeast con base de nitrógeno con o sin aminoácidos, un 2 % de glucosa, un 0,002 % de sulfato de adenina, un 0,002 % de L-histidina-HCl, un 2 % de agar). Después de incubarse a 30 °C durante 2 o 3 días, se obtuvieron los transformantes.

5 5. Procedimiento para producir la proteasa de tipo mejorado que tiene actividad coagulante de la leche de la presente invención

10 Se puede producir la proteasa de tipo mejorado de la presente invención cultivando la célula transformada de la presente invención, y se puede, expresando la proteasa de tipo mejorado de la presente invención como una proteína de fusión con un péptido de señal para la secreción, acumular en un medio la proteasa de tipo mejorado de la presente invención. Cuando se utiliza un promotor inducible, la inducción se lleva a cabo preferentemente durante el cultivo. Aunque varían los procedimientos de cultivo de la célula transformada dependiendo de los tipos de célula, se pueden emplear los procedimientos convencionales.

15 Un ejemplo de procedimiento para cultivar los transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* se describirá posteriormente.

20 El transformante se cultiva con agitado a 30 °C durante dos días en 50 ml de medio de cultivo YPD en un matraz de Sakaguchi de 500 ml para la proliferación de células de levadura. El medio de cultivo se centrifuga a 1000x g durante 4 minutos para recolectar las células. Las células se vuelven a suspender en 100 ml de medio de cultivo YPGal (un 1 % de extracto de levadura, un 2 % de Bactopeptona, un 4 % de galactosa (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) y se cultivan con agitado en el matraz de Sakaguchi de 500 ml a 30 °C durante tres días.

25 La proteasa que tiene actividad coagulante de la leche, proteasa que se segrega en el medio, se puede utilizar en el estado en el que está en el sobrenadante del cultivo y también se puede utilizar condensando el sobrenadante del cultivo. La proteasa que tiene actividad coagulante de la leche, proteasa que se segrega en el medio, puede purificarse o purificarse parcialmente. Se puede llevar a cabo la purificación o la purificación parcial, utilizando un procedimiento general para purificar proteínas. Por ejemplo, se puede utilizar una técnica que incluya una cromatografía tal como de intercambio iónico o por filtración en gel, aplicando una sal de sulfato amónico o sedimentando con un disolvente orgánico.

30 La enzima purificada se puede condensar también por liofilización, ultrafiltración por membrana, sedimentación con el disolvente orgánico o similar.

35 Ejemplos

0053 En adelante, la presente invención se describirá ahora concretamente por medio de ejemplos pero el ámbito técnico de la presente invención no se restringe a estas ilustraciones ejemplares. También, todas las manipulaciones genéticas se pueden llevar a cabo como se describe en Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

40 [Ejemplo 1]

45 Adquisición de la cepa mutante de *Rhizomucor miehei* que produce una proteasa con una relación C/P mejorada
Se sometió una cepa parental de *Rhizomucor miehei* (CBS 182-67 (una cepa derivada de ATCC 16457)) que produce una proteasa a un tratamiento de mutagénesis, obteniéndose de este modo una cepa mutante que segrega una proteasa con la relación C/P mejorada. Los detalles se ilustran posteriormente.

(1) Tratamiento de mutagénesis

50 La cepa parental de *Rhizomucor miehei* se cultivó en una placa de malta (2 % de extracto de malta, 2 % de glucosa, 0,1 % de peptona, 2 % de agar), y se mantuvo durante 3 días a una semana a 37 °C para permitir la formación de esporas. Estas esporas se resuspendieron en agua estéril utilizando un esparcidor de cristal.

55 Se añadió Nitrosoguanidina (N-metil- N'- nitro- N-nitrosoguanidina, fabricada por SIGMA CHEMICAL CO.) a la suspensión de esporas hasta una concentración final de 200 µg/ml. La mezcla se trató a temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos hasta una tasa de mortalidad del 90 %. Una cantidad apropiada de esta mezcla se colocó en la placa malta, y la placa resultante se mantuvo a 37 °C. Al día siguiente, cada grupo de diminutas hifas fúngicas obtenidas se inocularon en 8 ml de medio de cultivo YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 2 % de glucosa), y se utilizó el sobrenadante del cultivo después de cultivarlas a 37 °C durante 4 días, como muestra para medir la actividad proteasa (AP) y la actividad coagulante de la leche (ACL). Las células se almacenaron a -80 °C.

(2) Búsqueda de la proteasa de tipo mejorado

65 Según el resultado de la medición de ACL y AP por el procedimiento descrito anteriormente se había obtenido una proteasa de tipo mejorado cuya AP era mucho menor que la de la cepa parental y cuya relación C/P (ACL/AP) se había aumentado mucho, como 4,6 veces al compararse con la cepa parental.

[Ejemplo 2]

Aislamiento de un gen de proteasa de la cepa mutante

5 (1) Adquisición del ADN cromosómico de la cepa mutante y la cepa parental

La cepa mutante obtenida en el Ejemplo 1 y la cepa parental se cultivaron en placas de malta, y se mantuvieron a 37 °C durante tres días a una semana para permitir la formación de esporas. Estas esporas se suspendieron en agua estéril utilizando un dispersador de cristal. Esta suspensión de esporas se sembró en 200 ml de medio YPD líquido en un matraz de Sakaguchi de 500 ml de forma que cada matraz contenía aproximadamente 1×10^8 esporas, y se cultivaron durante dos días a 37 °C. En el momento que las células formaron un aglomerado con un tamaño de aproximadamente 0,5 a 2 mm, el medio se filtró y se eliminó la humedad excesiva para obtener un peso húmedo de aproximadamente 5 g de células.

15 Después de congelarlas con nitrógeno líquido, las células se transfirieron a un mortero preenfriado y se añadieron 3 g de arena marina (850 a 1400 μm). La mezcla se molió finamente con una mano de mortero bajo enfriamiento con nitrógeno líquido, hasta que se pulverizó. Se suspendió este polvo en 15 ml de una solución que contenía EDTA 0,05 M pH 8,5 y 0,2 % de SDS, dicha solución se había precalentado a 68 °C durante 14 minutos. Luego se dejó estar y se permitió que se enfriara hasta alcanzar la temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante turbio por centrifugación. Después de añadir un volumen 1/10 de acetato sódico 3 M a la solución recolectada, la mezcla se agitó medianamente y se recolectó el sobrenadante por centrifugación. A continuación, cuando se añadieron 15 ml de isopropanol al sobrenadante recolectado y se mezcló lentamente, apareció un conglomerado de ADN genómico y proteínas. Después, se aclaró el precipitado generado con etanol al 70 %, y el resultante se secó bajo presión reducida, se disolvió en 400 μl de TE, y 10 μl de solución de RNasa (10 mg/ml). La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 1 hora. Después del final del tratamiento con RNasa, se llevó a cabo un tratamiento con fenol/cloroformo y un tratamiento con cloroformo, seguidos por una precipitación en etanol, obteniéndose de esta manera el ADN genómico.

30 (2) Aislamiento del gen de la proteasa del ADN cromosómico de la cepa mutante y la cepa parental

El gen de la proteasa se aisló por PCR utilizando el ADN cromosómico derivado de la cepa mutante que se obtuvo anteriormente y la cepa parental como matriz. Basándose en la secuencia de la proteasa de *Rhizomucor miehei* registrada en el banco de genes (número de registro DDBJ: E01264), se prepararon los cebadores de la SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6. Las condiciones de la PCR fueron (a) a 94 °C durante 2 minutos; (b) 28 ciclos de 94 °C durante 30 segundos- 55 °C durante 30 segundos- 72 °C durante 3 minutos; y (c) 72 °C durante 5 minutos. Se utilizó como polimerasa TajaRa Ex Taq (fabricada por Takara Bio Inc.). Como resultado de la determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN obtenido por PCR, se reveló que la secuencia aminoacídica codificada por el ADN amplificado con el ADN cromosómico de la cepa parenteral como matriz contenía la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3. La secuencia aminoacídica codificada por el ADN amplificado con el ADN cromosómico de la cepa mutante como matriz contenía la secuencia aminoacídica SEC ID N° 4, de forma que el aminoácido en la posición 19 se había sustituido valina y el aminoácido en la posición 266 había sido sustituido con ácido glutámico.

De aquí en adelante, la proteasa derivada de la cepa parental de *Rhizomucor miehei* se denomina RMMP tipo silvestre, y la proteasa de tipo mejorado se llama "RMMP mejorada" y un gen que codifica la proteasa tipo mejorado se llama "gen RMMP mejorado".

45 [Ejemplo 3]

Construcción de un plásmido vector JS4 para expresar un proteína ajena utilizando como huésped levadura germinada (*Saccharomyces cerevisiae*) MC16.

50 Se utilizó el JS5 (descrito en la Patente Japonesa N° 3012377 [0109]) como material de partida para construir el plásmido vector JS4.

Cebadoro, se llevó a cabo una PCR utilizando cebadores ADN de la SEC ID N° 7 y 8 con JS5 como matriz, obteniéndose de esta manera el producto de PCR de 0,55 kpb que contenía una región promotora GAL7. Las condiciones de la PCR fueron (a) 94 °C durante 2 minutos (b) 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos-52 °C durante 30 segundos-72 °C durante 1 minuto; y (c) 72 °C durante 5 minutos. Se utilizó como polimerasa TaKaRa Ex Taq (fabricada por Takara Bio Inc.). Como ciclador térmico se utilizó el Thermal Cycler Dice Gradient PCR TaKaRa (fabricado por Takara Bio Inc.).

60 Después, el producto PCR obtenido se digirió por las enzimas de restricción EcoR I y *Bam*HI y se insertó en pUC18 el cual también había sido digerido por EcoR I y *Bam*HI. El plásmido obtenido se introdujo en *E. coli* DH5 α , y las células se dispersaron en una placa LB agar que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, IPTG 0,1 mM y 0,04 mg/ml de X-GAL, y se incubaron a 37 °C durante 14 a 16 horas. Se extrajo el plásmido de las células recolectadas por centrifugación utilizando el kit QIAprep Miniprep (QIAGEN, de aquí en adelante todas las extracciones de plásmido se llevaron a cabo utilizando este kit). Se llevó a cabo la secuenciación del fragmento insertado para confirmar que no se habían introducido mutaciones no deseadas.

Posteriormente, el plásmido que contenía el fragmento insertado se digirió con *EcoR* I y *Bam*HI para obtener un fragmento de ADN de 0,55 kpb, y luego se unieron este fragmento de ADN y el fragmento de ADN de aproximadamente 6 kpb obtenido por digestión del JS5 con *Bam*HI seguida por la digestión parcial con *EcoR* I. El plásmido resultante se introdujo en *E. coli* DH5 α y la *E. coli* transformada se cultivó en medio LB agar que contenía

5 100 μ g/ml de ampicilina a 37 °C durante 16 horas. La colonia que apareció se cultivó con agitado en mismo medio de cultivo a 37 °C durante 14 a 16 horas y a continuación se extrajo el plásmido del transformante recolectado por centrifugación. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción *EcoR* I, *Bam*H I, y *Pst* I, para confirmar el patrón de migración por el análisis de electroforesis en gel de agarosa. De esta manera se preparó el vector de expresión JS4.

10 Como material de partida para construir este plásmido vector, además del JS5, también se puede utilizar por ejemplo, el JS52 (número de registro FERM BP-3898) descrito en el párrafo 0112 de la Patente Japonesa N° 3012377.

[Ejemplo 4]

15 Construcción del plásmido vector para la expresión el gen RMMP tipo silvestre y el gen RMMP mejorado

Utilizando los cebadores (SEC ID N° 9 y 10) diseñados para tener un sitio *Bam*HI en ambos extremos de la secuencia de nucleótidos que contiene el ADN que codifica la RMMP tipo silvestre o la RMMP mejorada con las mutaciones Glu19Val/Gln266Glu, que se obtuvo en el Ejemplo 2, se llevó a cabo la PCR. El producto de la PCR que se obtuvo se digirió con *Bam*HI, se insertó en el JS4 que igualmente se había desfosforilado y digerido con *Bam*HI, y el vector obtenido se introdujo en *E. coli* DH5 α .

20

Utilizando un cebador directo que se puede hibridar con el promotor GAL7 y un cebador inverso que se puede hibridar con el extremo 3' del gen RMMP (SEC ID N° 11 y 10), se llevó a cabo la PCR directa de la colonia. Se sometió un transformante de *E. coli* que tenía el plásmido vector en el que se había confirmado que la dirección del gen insertado era correcta, a cultivo líquido como se describió anteriormente. El plásmido se extrajo y se sometió a secuenciación para confirmar que no se habían introducido errores no deseados, y de esta manera se obtuvieron los plásmidos vectores para expresar el gen RMMP tipo silvestre y el gen RMMP mejorado.

25

30 [Ejemplo 5]

Construcción del vector de expresión de los genes RMMP mejorados en los que se introduce la mutación dirigida al sitio (I)

35 El producto PCR del gen RMMP de tipo silvestre obtenido por el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, que contenía una secuencia prepro y los sitios *Bam*H I en cada extremo, se digirió con *Bam*H I y se insertó en pUC18 que igualmente se digirió con *Bam*HI y se desfosforiló. El plásmido resultante se introdujo en *E. coli* DH5 α y luego se extrajo el plásmido del transformante obtenido y se confirmó su secuencia de nucleótidos y de esta manera se obtuvo el pRMMP-wt.

40

A continuación llevando a cabo una PCR utilizando el pRMMP-wt como matriz, los pares cebadores de SEC ID N° 12 y 13, SEC ID N° 14 y 15, SEC ID N° 16 y 17, SEC ID N° 18 y 19, SEC ID N° 20 y 21, SEC ID N° 22 y 23, o SEC ID N° 24 y 25 y el kit básico de mutagénesis PrimeSTAR (Takara Bio Inc., de aquí en adelante denominado "kit" para acortar), se introdujeron mutaciones tales como la sustitución de un resto de ácido glutámico en la posición 19 o glutamina en la posición 266 de la SEC ID N° 3 con otro aminoácido. Los experimentos de diseño de cebadores para introducir la mutación y la PCR se llevaron a cabo en referencia al manual adjunto de este kit. Los experimentos de mutagénesis se llevaron a cabo según el manual.

45

Los productos obtenidos por PCR se introdujeron en *E. coli* DH5 α , y las células se dispersaron en una placa LB agar que contenía 100 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 37 °C durante 16 horas, obteniéndose así los transformantes. Se extrajeron los plásmidos de estos transformantes por el mismo procedimiento que se describe anteriormente y se sometieron a secuenciación para confirmar que no se habían introducido mutaciones no deseadas.

50 Por tales procedimientos, se prepararon los genes que codificaban las RMMP mejoradas que tenían una mutación de Glu19Val, Glu19Ala, Glu19Ile, Glu19Leu, Glu19Phe, Gln266Glu, o Gln266Asp. Estos plásmidos vectores que contenían el gen RMMP mejorado se denominaron respectivamente como pRMMP-E19V, pRMMP-E19A, pRMMP-E19I, pRMMP-E19L, pRMMP-E19F, pRMMP-Q266E y pRMMP-Q266D.

60 Después, se llevó a cabo la PCR utilizando pRMMP-Q266E y pRMMP-Q266D como matriz, los pares cebadores SEC ID N° 12 y 13, SEC ID N° 14 y 15, SEC ID N° 16 y 17 o SEC ID N° 18 y 19 así como el kit mencionado anteriormente. Los productos obtenidos por PCR se introdujeron en *E. coli* DH5 α y luego se extrajeron los plásmidos de los transformantes obtenidos de la misma manera que se describe anteriormente y se secuenciaron, de forma que se obtuvieron los genes que codificaban la RMMP mejorada que tenían las mutaciones Glu19Val / Gln266Asp,

65

Glu19Ala / Gln266Glu, Glu19Ala / Gln266Asp, Glu19Ile / Gln266Glu, Glu19Ile / Gln266Asp, o Glu19Leu / Gln266Glu. Estos plásmidos vectores que contenían el gen RMMP mejorado se denominaron respectivamente pRMMP-E19VQ266D, pRMMP-E19AQ266E, pRMMP-E19AQ266D, pRMMP-E19IQ266E, pRMMP-E19IQ266D, and pRMMP-E19LQ266E.

5 Los plásmidos vectores obtenidos de esta manera se digirieron con *BamH* I, se insertaron los fragmentos obtenidos en el JS4 por los procedimientos descritos anteriormente, y de esta manera se obtuvieron los vectores de expresión para cada uno de los genes RMMP mejorados mencionados anteriormente.

10 [Ejemplo 6]

Construcción del vector de expresión de los genes RMMP mejorados en los que se introduce la mutación dirigida al sitio (II)

15 Posteriormente, utilizando el pRMMP-wt como matriz, utilizando los pares cebadores SEC ID N° 26 y 27, SEC ID N° 28 y 29, SEC ID N° 30 y 31, SEC ID N° 32 y 33, SEC ID N° 34 y 35 o SEC ID N° 36 y 37 así como el kit mencionado anteriormente se llevó a cabo la PCR. Los productos obtenidos de la PCR se introdujeron en *E. coli* DH5 α y se extrajeron los plásmidos de los transformantes obtenidos de la misma manera que se describió anteriormente y se secuenciaron, de esta manera se obtuvieron los genes que codifican la RMMP mejorada que tenían las mutaciones
20 Gln265Glu, Gln265Asp, Gln265Glu / Gln266Glu, Gln265Glu / Gln266Asp, Gln265Asp / Gln266Glu o Gln265Asp / Gln266Asp. Estos plásmidos vectores que contenían el gen RMMP mejorado se denominaron respectivamente pRMMP-Q265E, pRMMP-Q265D, pRMMPQ265EQ266E, pRMMP-Q265EQ266D, pRMMP-Q265DQ266E y pRMMP-Q265DQ266D.

25 Los genes RMMP mejorados se obtuvieron por digestión de los plásmidos vectores así obtenidos con *BamH* I y se insertaron en JS4 por el procedimiento descrito anteriormente, de esta manera se obtuvieron los vectores de expresión de los genes RMMP mejorados mencionados anteriormente.

[Ejemplo 7]

30 Construcción de los vectores de expresión de los genes RMMP mejorados en los que se introduce la mutación dirigida al sitio (III)

35 Se llevó a cabo la PCR utilizando pRMMP-E19V, pRMMP-E19A o pRMMP-E19I como matriz, los pares cebadores SEC ID N° 30 y 31, SEC ID N° 32 y 33, SEC ID N° 34 y 35 o SEC ID N° 36 y 37 así como el kit mencionado anteriormente. Los productos obtenidos de la PCR se introdujeron en *E. coli* DH5 α y se extrajeron los plásmidos de los transformantes obtenidos de la misma manera que se describió anteriormente y se secuenciaron, de esta manera se obtuvieron los genes que codifican la RMMP mejorada que tenían las mutaciones Glu19Val / Gln265Glu / Gln266Glu, Glu19Val / Gln265Glu / Gln266Asp, Glu19Val / Gln265Asp / Gln266Glu, Glu19Val / Gln265Asp / Gln266Asp, Glu19Ala / Gln265Glu / Gln266Glu, Glu19Ala / Gln265Glu / Gln266Asp, Glu19Ala / Gln265Asp / Gln266Glu, Glu19Ala / Gln265Asp / Gln266Asp, Glu19Ile / Gln265Glu / Gln266Glu, Glu19Ile / Gln265Glu / Gln266Asp, Glu19Ile / Gln265Asp / Gln266Glu o Glu19Ile / Gln265Asp / Gln266Asp. Estos plásmidos vectores que
40 contenían el gen RMMP mejorado se denominaron respectivamente pRMMP-E19VQ265EQ266E, pRMMP-E19VQ265EQ266D, pRMMP-E19VQ265DQ266E, pRMMP-E19VQ265DQ266D, pRMMP-E19AQ265EQ266E, pRMMP-E19AQ265EQ266D, pRMMP-E19AQ265DQ266E, pRMMP-E19AQ265DQ266D, pRMMP-E19IQ265EQ266E, pRMMP-E19IQ265EQ266D, pRMMP-E19IQ265DQ266E y pRMMP-E19IQ265DQ266D.

45 Los genes RMMP mejorados se obtuvieron por digestión de los plásmidos vectores así obtenidos con *BamH* I y se insertaron en JS4 por el procedimiento descrito anteriormente, de esta manera se obtuvieron los vectores de expresión de los genes RMMP mejorados mencionados anteriormente.

[Ejemplo 8]

55 Transformación de levadura MC16 en germinación con el vector de expresión que contiene el tipo silvestre o mejorado del gen RMMP

Los vectores de expresión producidos y descritos anteriormente se introdujeron en la levadura MC16 en germinación (*MATa*, *leu2*, *his4*, *ade2*) por el procedimiento de Gietz y Schiestl (1995), y las células se dispersaron en una placa SDah, y se incubaron a 30 °C durante 3 días, de esta manera se obtuvieron los transformantes.

60 [Ejemplo 9]

Expresión secretora de las RMMP tipo silvestre y mejorado

65 Los transformantes obtenidos por el procedimiento descrito anteriormente se cultivaron con agitado a 200 rpm en 100 ml de medio líquido YPD a 30 °C durante 24 horas, que se había preparado anteriormente en un matraz de

Erlenmeyer de 500 ml. Las células de levadura recolectadas por centrifugación se resuspendieron en una cantidad doble de medio líquido YPGal, y se transfirieron a un matraz de Erlenmeyer estéril, y después se cultivaron con agitado de la misma manera durante 72 a 96 horas para la expresión secretora. Después del cultivo, el medio de cultivo se centrifugó obteniendo así el sobrenadante del cultivo que contenía la RMMP mencionada anteriormente.

5

[Ejemplo 10]

Medición de ACL y AP y evaluación de la relación C/P

- 10 Así, en el sobrenadante del cultivo que contenía la RMMP, se midieron la ACL y la AP para calcular la relación C/P. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Nº	Mutaciones	Relación C/P relativa (la relación C/P del tipo silvestre se toma como 1)
Tipo Silvestre	RMMP tipo silvestre	1,0
Tipo Mejorado	Glu19Val/Gln266Glu	3,8
1.	Glu19Val	1,9
2.	Glu19Ala	2,2
3.	Glu19Ile	1,7
4.	Glu19Leu	0,9
5.	Glu19Phe.	N.D.
6.	Gln266Glu	1,4
7.	Gln266Asp	1,7
8.	Glu19Ala/Gln266Glu	2,9
9.	Glu19Ile/Gln266Glu	2,6
10.	Glu19Leu/Gln266Glu	1,7
11.	Glu19Val/Gln266Asp	3,7
12.	Glu19Ala/Gln266Asp	2,7
13.	Glu19Ile/Gln266Asp	3,0
14.	Gln265Glu	1,3
15.	Gln265Asp	1,5
16.	Glu265Glu/Gln266Glu	2,2
17.	Gln265Glu/Gln266Asp	2,8
18.	Gln265Asp/Gln266Glu	2,7
19.	Gln265Asp/Gln266Asp	3,0
20.	Glu19Val/Gln265Glu/Gln266Glu	4,9
21.	Glu19Val/Gln265Glu/Gln266Asp	5,1
22.	Glu19Val/Gln265Asp/Gln266Glu	4,0
23.	Glu19Val/Gln265Asp/Gln266Asp	4,7
24.	Glu19Ala/Gln265Glu/Gln266Glu	3,5
25.	Glu19Ala/Gln265Glu/Gln266Asp	3,3
26.	Glu19Ala/Gln265Asp/Gln266Glu	3,2
27.	Glu19Ala/Gln265Asp/Gln266Asp	3,3
28.	Glu19Ile/Gln265Glu/Gln266Glu	3,5
29.	Glu19Ile/Gln265Glu/Gln266Asp	3,6
30.	Glu19Ile/Gln265Asp/Gln266Glu	3,5
31.	Glu19Ile/Gln265Asp/Gln266Asp	3,5

N.D.: no detectado (La actividad coagulante de la leche y la actividad proteasa no se pudieron detectar).

- 15 La relación C/P de la RMMP que tiene la mutación Glu19Val/Gln266Glu derivada de *Rhizomucor miehei* (cepa mutante) era 3,8 veces mayor que la del tipo silvestre.

La RMMP que tenía las mutaciones de Glu19Val, Glu19Ala, y Glu19Ile mostraban una relación C/P mayor. En *Rhizomucor pusillus*, la mutación de Glu19Ala ya se conocía (J. Biochem. 129, 791-794, 2001).

- 20 En la RMMP de tipo silvestre, como se muestra en la SEC ID Nº 3, los aminoácidos en las posiciones 265 y 266 ambos son glutamina. Se confirmó que la relación C/P de la RMMP que tiene solo una sustitución de glutamina en la posición 265 con un aminoácido ácido, Gln265Glu y Gln265Asp (el tipo mejorado 14 y 15 en la Tabla 1) eran mayores ambas, al compararse con las del tipo silvestre. De manera similar, la relación C/P de la RMMP que tienen solamente la sustitución de glutamina en la posición 266 con el aminoácido ácido, Gln266Glu y Gln266Asp (los tipos mejorados 6 y 7 en la Tabla 1) eran ambas mayores, al compararse con el tipo silvestre.

- 25 La presente invención ha revelado por Cebadora vez que la relación C/P aumenta por la sustitución de glutamina en la posición 265 o 266.

Además, se confirmó que cuando se combinan la sustitución de glutamina en la posición 266 con el aminoácido ácido y la sustitución del ácido glutámico en la posición 19 (los tipos mejorados 8 a 13 en la Tabla 1), la relación C/P es más alta que en el caso en el que solo se sustituía la glutamina en la posición 266.

5 Además, la relación C/P de las RMMP que tienen las mutaciones Gln265Glu/Gln266Glu, Gln265Glu/Gln266Asp, Gln265Asp/Gln266Glu y Gln265Asp/Gln266Asp, en las que los aminoácidos en las posiciones 265 y 266 se sustituyeron simultáneamente con aminoácidos ácidos (los tipos mejorados 16 a 19 en la Tabla 1), era significativamente mayor que la de las RMMP que tenían la mutación en la que se había sustituido solamente la glutamina en la posición 265 o solamente la glutamina en la posición 266 con aminoácidos ácidos.

10 Además, la relación C/P de las RMMP que tienen las mutaciones Glu19Val/Gln265Glu/Gln266Glu, Glu19Val/Gln265Glu/Gln266Asp, Glu19Val/Gln265Asp/Gln266Glu y Glu19Val/Gln265Asp/Gln266Asp, en las que los aminoácidos de las posiciones 265, 266 y 19 se sustituyeron simultáneamente con aminoácidos ácidos (los tipos 20 a 23 en la Tabla 1), era significativamente mayor (hasta aproximadamente cinco veces), al compararse con la RMMP tipo silvestre. Esto confirmaba que las proteasas de tipo mejorado eran extremadamente excelentes como enzimas coagulantes de leche.

[Ejemplo 11]

20 Construcción del vector de expresión de los genes RMMP mejorados en los que se introduce la mutación dirigida al sitio (IV)

Posteriormente, se preparó un vector de expresión del gen RMMP que tiene la mutación en la que la treonina en la posición 81 de la SEC ID N° 3 se sustituyó por glutamina o ácido aspártico.

25 Se llevó a cabo la PCR utilizando pRMMP-wt o pRMMP-Q265EQ266E como matrices, los cebadores de las SEC ID N° 38 y 39, así como el kit mencionado anteriormente. Los productos que se obtuvieron por PCR se introdujeron en *E. coli* DH5 α y luego los plásmidos se extrajeron de los transformantes obtenidos de la misma manera que se describió anteriormente y se secuenciaron, obteniendo los genes que codifican RMMP mejoradas que tienen mutaciones Thr81Gln y Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu. Estos plásmidos vectores que contienen los genes RMMP mejorados fueron denominados respectivamente pRMMP-T81Q y pRMMP-T81QQ265EQ266E.

30 Posteriormente se llevó a cabo una PCR utilizando RMMP-Q265EQ266D como matriz, los ADN cebadores de la SEC ID N° 40 y 41, así como el kit mencionado anteriormente. El producto obtenido de la PCR se introdujo en *E. coli* DH5 α y luego el plásmido se extrajo de los transformantes obtenidos de la misma manera que se describió anteriormente y se secuenció, obteniendo los genes que codifican RMMP mejoradas que tienen las mutaciones Thr81Asp/Gln265Glu/Gln266Asp. El plásmido vector que contenía el gen RMMP mejorado se denominó pRMMP-T81DQ265EQ266D.

40 Además, se llevó a cabo una PCR, utilizando pRMMP-E19VQ265EQ266E, pRMMP-E19VQ265 EQ266D, pRMMP-E19VQ265DQ266E, pRMMP-E19VQ265DQ266D, pRMMP-E19AQ265EQ266E, pRMMP-E19AQ265EQ266D, pRMMP-E19IQ265EQ266E, pRMMP-E19IQ265EQ266D, pRMMP-E19IQ265DQ266E o pRMMP-E19IQ265DQ266D como matrices, los cebadores de la SEC ID N° 38 y 39, así como el kit mencionado anteriormente. Los productos que se obtuvieron por PCR se introdujeron en *E. coli* DH5 α y luego los plásmidos se extrajeron de los transformantes obtenidos de la misma manera que se describió anteriormente y se secuenciaron, obteniendo los genes que codifican RMMP mejoradas que tienen las mutaciones

45 Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu,
Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Asp,
Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Glu,
Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Asp,
50 Glu19Ala/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu,
Glu19Ala/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Asp,
Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu,
Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Asp,
55 Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Glu, o
Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Asp. Estos plásmidos vectores que contienen los genes RMMP mejorados se denominaron respectivamente pRMMP-E19VT81QQ265EQ266E, pRMMP-E19VT81QQ265EQ266D, pRMMP-E19VT81QQ265DQ266E, pRMMP-E19VT81QQ265DQ266D, pRMMP-E19AT81QQ265EQ266E, pRMMP-E19AT81QQ265EQ266D, pRMMP-E19IT81QQ265EQ266E, pRMMP-E19IT81QQ265EQ266D, pRMMP-E19IT81QQ265DQ266E y pRMMP-E19IT81QQ265DQ266D.

Los genes RMMP mejorados se obtuvieron digiriendo los plásmidos vectores obtenidos de esa manera con *Bam*H I e insertándolos en JS4 por el procedimiento descrito anteriormente, de esta manera se obtuvieron los vectores de expresión de los genes RMMP mejorados que se mencionaron anteriormente.

65

[Ejemplo 12]

De acuerdo con los procedimientos descritos en los Ejemplos 8 a 10, los vectores de expresión que se prepararon en el Ejemplo 11 se introdujeron en levadura MC16 en germinación y los transformantes se sometieron a cultivo líquido, de forma que se obtuvo un sobrenadante del cultivo que contenía la RMMP mejorada. Así, en el sobrenadante del cultivo que contenía la RMMP, se midieron la ACL y la AP para calcular la relación C/P. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Nº	Mutaciones	Relación C/P relativa (la relación C/P del tipo silvestre se toma como 1).
Tipo Silvestre	RMMP tipo silvestre	1,0
Tipo Mejorado	Glu19Val/Gln266Glu	3,8
32.	Thr81Gln	1,1
33.	Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu	2,6
34.	Thr81Asp/Gln265Glu/Gln266Asp	4,4
35.	Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu	4,3
36.	Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Asp	3,8
37.	Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Glu	4,8
38.	Glu19Val/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Asp	2,9
39.	Glu19Ala/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu	3,2
40.	Glu19Ala/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Asp	3,0
41.	Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Glu	3,0
42.	Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Glu/Gln266Asp	2,8
43.	Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Glu	2,7
44.	Glu19Ile/Thr81Gln/Gln265Asp/Gln266Asp	3,0

- 10 Como se muestra en la Tabla 2, se confirmó que la RMMP que tiene las sustituciones en la treonina de la posición 81 con glutamina o ácido aspártico y las glutaminas de las posiciones 265 y 266 con aminoácidos ácidos (los tipos mejorados 33 y 34 en la Tabla 2) mostraron una relación C/P mayor que la de la RMMP tipo silvestre. En particular, la relación C/P de la RMMP que tenía las mutaciones Thr81Asp/Gln265Glu/Gln266Asp aumentaron hasta 4,4 veces, al compararse con la de la RMMP tipo silvestre.
- 15 En casos en los que la sustitución del ácido glutámico en la posición 19 se combinó con las sustituciones anteriores, la relación C/P fue mayor que la de la RMMP tipo silvestre (los tipos mejorados 35 a 44 en la Tabla 2) En particular, la relación C/P de la RMMP que tenía la mutación Glu19Val/Thr81Gln/ Gln265Asp/Gln266Glu aumentó hasta 4,8 veces, en comparación con el de la RMMP tipo silvestre.
- 20 Los resultados mostrados en la Tabla 1 y la Tabla 2 indican que cuando la glutamina en las posiciones 265 y/o 266 en la secuencia aminoacídica SEC ID Nº 3 se sustituye(n) con aminoácidos ácidos, aumenta la relación C/P, al compararse con la de la RMMP tipo silvestre, y la combinando la(s) sustitución(es) de aminoácidos en las posiciones 19 y/u 81, la relación C/P aumenta más.

25 [Ejemplo 13]

Purificación de las RMMP de tipo silvestre y mejorada y evaluación de la enzima purificada

30 La levadura MC16 que albergaba el vector de expresión que contenía el gen RMMP de tipo silvestre, o el gen RMMP mejorado que tenía las mutaciones Glu19Val/Gln266Glu, Glu19Val, Glu19Ala, Gln266Glu, Gln266Asp, Glu19Ala/Gln266Glu, Gln265Glu, Gln265Asp, Gln265Glu/Gln266Glu, Gln265Glu/Gln266Asp, Gln265Asp/Gln266Glu, Gln265Asp/Gln266Asp, Glu19Val/Gln265Glu/Gln266Asp o Glu19Val/ Gln265Asp/ Gln266Asp se cultivó según el procedimiento descrito anteriormente para permitir la expresión secretora de RMMP. Se aplicó el sobrenadante del cultivo recolectado por centrifugación en una columna cargada con HiTrap Q HP(fabricado por GE Healthcare), que se había equilibrado antes con tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5,5, para absorber la proteína RMMP. Después del lavado de la columna con el mismo tampón, se eluyó la proteína con tampón de NaCl 0,3 M. Se pusieron dos µl de la fracción en una placa de leche desnatada (un 1 % de leche desnatada (fabricada por Difco), tampón de ácido acético 100 mM pH 5,2, y un 1 % de agar) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos, se detectó la fracción activa por la aparición de un halo turbio.

40 La fracción activa obtenida se concentró con una membrana de ultrafiltración y luego se purificó en por cromatografía líquida de altas prestaciones utilizando la columna de filtración en gel Super SW3000 (fabricada por Tosoh Corporation). Cuando la fracción purificada se analizó por SDS-PAGE, se observó una única banda. Los resultados de la medición de ACL para la RMMP purificada obtenida de este modo se muestran en la Tabla 3.

45 La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el Reactivo de Ensayo Proteico BCA (fabricado por Pierce).

[Tabla 3]

Mutaciones	ACL ($\times 10^3$ Mu/mg-proteína)
RMPP tipo silvestre	3,89
Glu19Val/Gln266Glu	4,15
Glu19Val	2,19
Glu19Ala	2,43
Gln266Glu	4,24
Gln266Asp	4,01
Glu19Ala/Gln266Glu	4,23
Gln265Glu	4,22
Gln265Asp	4,03
Gln265Glu/Gln266Glu	3,91
Gln265Glu/Gln266Asp	3,74
Gln265Asp/Gln266Glu	3,90
Gln265Asp/Gln266Asp	3,92
Glu19Val/Gln265Glu/Gln266Asp	4,52
Glu19Val/Gln265Asp/Gln266Asp	4,27

A partir de estos resultados, la ACL disminuye con la sustitución del ácido glutámico en la posición 19 solo, mientras que se incrementa con la sustitución de la glutamina en la posición 265 o 266. La ACL también se incrementa con las sustituciones en las posiciones 19 y 266 y las sustituciones en las posiciones 19, 265 y 266.

5

[Ejemplo 14]

Medición del peso de sustancia seca en el suero lácteo

10 La producción de queso es una de las características importantes del uso comercial de una enzima coagulante de la leche. La medición del peso de sustancia seca en el suero es un índice útil para evaluar la producción de queso. Un peso bajo de materia seca en el suero de leche indica un rendimiento mayor de queso.

A continuación se describirá la medición del peso de la sustancia seca del suero utilizando la enzima RMMP de tipo silvestre y la RMMP E19V/Q266E, ambas se expresan en levaduras.

15

Se cultivó la levadura MC16 en germinación que albergaba el vector de expresión que contenía el gen RMMP tipo silvestre o el gen RMMP mejorado que tenía las mutaciones Glu19Val/Gln266Glu por el procedimiento descrito anteriormente para permitir la expresión secretora de la RMMP. Se recolectó el sobrenadante del cultivo por centrifugación, se concentró por una membrana de ultrafiltración y el resultado se utilizó como una enzima coagulante de la leche.

20

(1) Operación de la coagulación láctea

Se puso leche de vaca pasteurizada no homogenizada disponible comercialmente (Takanashi milk products Co. Ltd.) (500 g) en un vaso de precipitados y se calentó a 32 °C. En el momento que la leche de vaca alcanzó los 32 °C, se añadieron 0,4 g de D-(+) glucono-1,5-lactona (ácido D-glucónico δ -lactona, fabricada por Wako Pure Chemical) y se agitó y luego se añadió gradualmente cloruro cálcico (fabricado por Wako Pure Chemical) hasta una concentración final de 1 mM y se agitó. Después de la adición de los reactivos, se añadió la enzima coagulante de la leche (2.000 Mu), se agitó durante un minuto, y se mantuvo a 32 °C. Se considera que treinta minutos después de que se añade la enzima coagulante de la leche es el tiempo de cuajado. La cuajada se cortó en cuadrados de 1 a 1,5 cm, y se dejó reposar durante 10 minutos. Después de dejarlo reposar, los coágulos se rompieron con cuidado. Los coágulos se mantuvieron a 32 °C durante 20 minutos, mientras se agitaban suavemente ocasionalmente. Luego, el vaso de precipitados se transfirió a una incubadora y se aumentó la temperatura interna hasta los 37 °C (unos 0,5 °C por 1 minuto). En el momento en que los coágulos alcanzaron los 37 °C, se dejaron reposar durante otros 30 minutos, mientras se agitaba con cuidado ocasionalmente. Después de que se dejaron reposar los coágulos, se separaron los coágulos y el suero con una gasa. Los coágulos se envolvieron en la gasa, y se puso en un molde exclusivo para producción de queso. Aplicando presión (5 MPa durante 90 minutos), el resto del suero fluyó y se recolectó. Todo el suero de leche recolectado se mezcló y se filtró con un papel de filtro de calidad n°1 (ADVANTEC). El suero resultante se consideró como el suero total.

40

(2) Medición del peso de sustancia seca del suero

0103 Un vaso de precipitados se seca antes a 105 °C con un horno de secado. No menos de 30 minutos después, el vaso de precipitados se saca del horno de secado y se coloca en un desecador, y se mide el peso. Se ponen aproximadamente 25 g del suero de leche obtenido anteriormente en el vaso de precipitados, y se seca en el horno de secado a 105 °C durante 12 a 15 horas o más. Tras el secado, el vaso de precipitados se coloca en el desecador. No menos de 30 minutos después, se mide el peso. El valor que se obtiene restando el peso del vaso de precipitados medido antes se toma como el peso de sustancia seca.

45

ES 2 445 710 T3

De acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, se midieron por duplicado el contenido de sustancia seca de 15 lotes de suero y el total del peso de sustancia seca, y los resultados se muestran en la Tabla 4

Tabla 4

Sustancia seca contenida en el suero (% p/p)			Sustancia seca total en el suero (g)		
Lote N°	RMMP	RMMP	Lote N°	RMMP	RMMP
	tipo silvestre	Glu19Val/ Gln266Glu		tipo silvestre	Glu19Val/ Gln266Glu
1	7,257	7,141	1	28,648	28,238
2	7,248	7,183	2	28,605	28,468
3	7,190	7,168	3	28,891	28,218
4	7,177	7,058	4	28,651	28,219
5	7,128	7,025	5	28,621	27,890
6	7,133	7,032	6	28,502	28,300
7	7,054	6,977	7	28,397	27,985
8	7,153	6,966	8	28,514	28,104
9	7,270	7,087	9	29,053	28,526
10	7,129	7,086	10	28,637	28,423
11	7,167	7,019	11	28,789	28,142
12	7,135	7,010	12	28,231	27,521
13	7,037	6,976	13	27,656	27,577
14	7,098	7,189	14	27,696	27,792
15	7,181	7,080	15	28,323	27,364
Media	7,157	7,066	Media	28,481	28,051
DS	0,065	0,071	DS	0,203	0,214

El total de sustancia seca en el suero RMMP tipo silvestre y RMMP Glu19Val/ Gln266Glu fue de 28,4810 g y 28,0511 g, respectivamente. La presencia de una diferencia significativa se confirmó utilizando el ensayo de Student (de dos colas). Se encontró una diferencia significativa entre ellos ($p < 0,01$). Por tanto, se descubrió que la RMMP Glu19Val/ Gln2 podía alcanzar un mayor rendimiento de queso que la RMMP tipo silvestre, concretamente, puede producir aproximadamente un 1,51 % más de queso que el RMMP tipo silvestre. Esto es equivalente a 85,97 kg en el caso de producir queso utilizando 100 toneladas de leche.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Meito Sangyo Co., Ltd

<120> PROTEASA COAGULANTE DE LA LECHE DE TIPO MEJORADO DERIVADA DE UN MICROORGANISMO

<130> C9326-PCT

<150> JP2009-071592

<151> 24-03-2009

<160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1293

<212> ADN

<213> *Rhizomucor miehei*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1290)

<220>

<223> Cepa parental

ES 2 445 710 T3

Tyr Tyr Asp Phe Asp Leu Glu Glu Tyr Ala Ile Pro Val Ser Ile Gly	
85 90 95	
act cct ggt caa gac ttt ttg ctc ttg ttc gac act ggc agc tcc gat	336
Thr Pro Gly Gln Asp Phe Leu Leu Leu Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp	
100 105 110	
act tgg gtt cca cac aag ggt tgc acc aag tct gaa ggt tgt gtt ggc	384
Thr Trp Val Pro His Lys Gly Cys Thr Lys Ser Glu Gly Cys Val Gly	
115 120 125	
agc cga ttc ttt gat cca tcg act tcc tcc act ttt aaa gca act aac	432
Ser Arg Phe Phe Asp Pro Ser Thr Ser Ser Thr Phe Lys Ala Thr Asn	
130 135 140	
tac aac cta aac atc acc tac ggt act ggc ggc gca aac ggt ctt tac	480
Tyr Asn Leu Asn Ile Thr Tyr Gly Thr Gly Gly Ala Asn Gly Leu Tyr	
145 150 155 160	
ttt gaa gac agc atc gct atc ggc gac acc act gtg acc aag caa att	528
Phe Glu Asp Ser Ile Ala Ile Gly Asp Thr Thr Val Thr Lys Gln Ile	
165 170 175	
ctg gct tac gtc gat aat gtt cgc ggc cca act gct gag cag tct cct	576
Leu Ala Tyr Val Asp Asn Val Arg Gly Pro Thr Ala Glu Gln Ser Pro	
180 185 190	
aac gct gac att ttc ctt gat ggt ctc ttt ggt gca gcc tac cca gac	624
Asn Ala Asp Ile Phe Leu Asp Gly Leu Phe Gly Ala Ala Tyr Pro Asp	
195 200 205	
aac acg gcc atg gaa gca gag tat gga tcg act tat aac act gtt cac	672
Asn Thr Ala Met Glu Ala Glu Tyr Gly Ser Thr Tyr Asn Thr Val His	
210 215 220	
gtc aac ctc tac aag caa ggc ttg atc tct tct cct ctt ttc tcg gtc	720
Val Asn Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Ile Ser Ser Pro Leu Phe Ser Val	
225 230 235 240	
tac atg aac act aac agc ggc act gga gag gtc gtc ttt ggt gga gtc	768
Tyr Met Asn Thr Asn Ser Gly Thr Gly Glu Val Val Phe Gly Gly Val	
245 250 255	
aac aac acg ctt ctc agc ggc gac att gcc tac acg gac gtt atg agt	816
Asn Asn Thr Leu Leu Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Thr Asp Val Met Ser	
260 265 270	
cgt tat ggt ggt tat tac ttc tgg gac gca ccc gtc aca ggt atc acc	864
Arg Tyr Gly Gly Tyr Tyr Phe Trp Asp Ala Pro Val Thr Gly Ile Thr	
275 280 285	
gtc gat gga tct gct gct gtc agg ttc tcc aga ccc caa gca ttc acc	912
Val Asp Gly Ser Ala Ala Val Arg Phe Ser Arg Pro Gln Ala Phe Thr	
290 295 300	
atc gat act ggc acc aac ttt ttc att atg ccc tca agc gcc gct tct	960
Ile Asp Thr Gly Thr Asn Phe Phe Ile Met Pro Ser Ser Ala Ala Ser	
305 310 315 320	
aag att gtc aaa gca gct ctc oct gat gcc act gaa acc cag cag ggc	1008

ES 2 445 710 T3

Lys Ile Val Lys Ala Ala Leu Pro Asp Ala Thr Glu Thr Gln Gln Gly
 325 330 335
 tgg gtt gtt cct tgc gct agc tac cag aac tcc aag tcg act atc agc 1056
 Trp Val Val Pro Cys Ala Ser Tyr Gln Asn Ser Lys Ser Thr Ile Ser
 340 345 350
 atc gtc atg caa aag tcc ggc tca agc agt gac act att gag atc tcg 1104
 Ile Val Met Gln Lys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Ile Glu Ile Ser
 355 360 365
 gtt cct gtc agc aaa atg ctt ctt cca gtc gac caa tcg aac gag act 1152
 Val Pro Val Ser Lys Met Leu Leu Pro Val Asp Gln Ser Asn Glu Thr
 370 375 380
 tgc atg ttt atc att ctt ccc gac ggt ggt aac cag tac att gtt ggc 1200
 Cys Met Phe Ile Ile Leu Pro Asp Gly Gly Asn Gln Tyr Ile Val Gly
 385 390 395 400
 aac ttg ttc ctg cgc ttc ttt gtc agc gtt tac gac ttt ggc aac aac 1248
 Asn Leu Phe Leu Arg Phe Phe Val Ser Val Tyr Asp Phe Gly Asn Asn
 405 410 415
 cgt atc ggc ttt gca cct ttg gcc tcg gct tat gaa aac gag taa 1293
 Arg Ile Gly Phe Ala Pro Leu Ala Ser Ala Tyr Glu Asn Glu
 420 425 430

<210> 2
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> *Rhizomucor miehei*

5

<220>
 <223> Proteasa inmadura de cepa parental

10

<400> 2

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

ES 2 445 710 T3

			100					105					110		
Thr	Trp	Val	Pro	His	Lys	Gly	Cys	Thr	Lys	Ser	Glu	Gly	Cys	Val	Gly
		115					120					125			
Ser	Arg	Phe	Phe	Asp	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	Lys	Ala	Thr	Asn
		130				135					140				
Tyr	Asn	Leu	Asn	Ile	Thr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Tyr
145					150					155				160	
Phe	Glu	Asp	Ser	Ile	Ala	Ile	Gly	Asp	Thr	Thr	Val	Thr	Lys	Gln	Ile
				165					170					175	
Leu	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Glu	Gln	Ser	Pro
			180					185					190		
Asn	Ala	Asp	Ile	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ala	Tyr	Pro	Asp
		195					200					205			
Asn	Thr	Ala	Met	Glu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Asn	Thr	Val	His
		210				215						220			
Val	Asn	Leu	Tyr	Lys	Gln	Gly	Leu	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Phe	Ser	Val
225					230					235					240
Tyr	Met	Asn	Thr	Asn	Ser	Gly	Thr	Gly	Glu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Val
				245					250					255	
Asn	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Gly	Asp	Ile	Ala	Tyr	Thr	Asp	Val	Met	Ser
			260					265					270		
Arg	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Asp	Ala	Pro	Val	Thr	Gly	Ile	Thr
		275					280						285		
Val	Asp	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Arg	Pro	Gln	Ala	Phe	Thr
		290				295					300				
Ile	Asp	Thr	Gly	Thr	Asn	Phe	Phe	Ile	Met	Pro	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser
305					310					315					320
Lys	Ile	Val	Lys	Ala	Ala	Leu	Pro	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Gln	Gln	Gly
				325					330						335
Trp	Val	Val	Pro	Cys	Ala	Ser	Tyr	Gln	Asn	Ser	Lys	Ser	Thr	Ile	Ser
			340					345						350	
Ile	Val	Met	Gln	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Thr	Ile	Glu	Ile	Ser
		355				360						365			
Val	Pro	Val	Ser	Lys	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Asp	Gln	Ser	Asn	Glu	Thr
		370				375					380				
Cys	Met	Phe	Ile	Ile	Leu	Pro	Asp	Gly	Gly	Asn	Gln	Tyr	Ile	Val	Gly
385					390					395					400
Asn	Leu	Phe	Leu	Arg	Phe	Phe	Val	Ser	Val	Tyr	Asp	Phe	Gly	Asn	Asn
				405					410					415	
Arg	Ile	Gly	Phe	Ala	Pro	Leu	Ala	Ser	Ala	Tyr	Glu	Asn	Glu		
		420						425					430		

<210> 3
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> *Rhizomucor miehei*

5

<220>
 <223> Proteasa madura de cepa parental

ES 2 445 710 T3

<400> 3

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

ES 2 445 710 T3

Met Leu Leu Pro Val Asp Gln Ser Asn Glu Thr Cys Met Phe Ile Ile
 305 310 315 320
 Leu Pro Asp Gly Gly Asn Gln Tyr Ile Val Gly Asn Leu Phe Leu Arg
 325 330 335
 Phe Phe Val Ser Val Tyr Asp Phe Gly Asn Asn Arg Ile Gly Phe Ala
 340 345 350
 Pro Leu Ala Ser Ala Tyr Glu Asn Glu
 355 360

<210> 4
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> *Rhizomucor miehei*

5

<220>
 <223> Proteasa madura de cepa mutante

10

<400> 4

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

ES 2 445 710 T3

Tyr Phe Trp Asp Ala Pro Val Thr Gly Ile Thr Val Asp Gly Ser Ala
 210 215 220
 Ala Val Arg Phe Ser Arg Pro Gln Ala Phe Thr Ile Asp Thr Gly Thr
 225 230 235 240
 Asn Phe Phe Ile Met Pro Ser Ser Ala Ala Ser Lys Ile Val Lys Ala
 245 250 255
 Ala Leu Pro Asp Ala Thr Glu Thr Gln Glu Gly Trp Val Val Pro Cys
 260 265 270
 Ala Ser Tyr Gln Asn Ser Lys Ser Thr Ile Ser Ile Val Met Gln Lys
 275 280 285
 Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Ile Glu Ile Ser Val Pro Val Ser Lys
 290 295 300
 Met Leu Leu Pro Val Asp Gln Ser Asn Glu Thr Cys Met Phe Ile Ile
 305 310 315 320
 Leu Pro Asp Gly Gly Asn Gln Tyr Ile Val Gly Asn Leu Phe Leu Arg
 325 330 335
 Phe Phe Val Ser Val Tyr Asp Phe Gly Asn Asn Arg Ile Gly Phe Ala
 340 345 350
 Pro Leu Ala Ser Ala Tyr Glu Asn Glu
 355 360

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 5
 gggccaactg taggtagatc 20

 15 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 6
 cacccaaaca agaataagcg 20

 25 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Cebador

 <400> 7
 ttgaattcga gctcgcccca 20

 35 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 445 710 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 8
 5 ctcagagtgg atcccctt 18

 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9
 15 aaggatccat gctcttctt cagattactt ctg 33

 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 10
 25 cgcgatcct tactcgtttt cataagccg 29

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 11
 35 tatgcagagc atcaacatga 20

 <210> 12
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 12
 45 ctggagggtg atgctattcc ggtctc 26

 <210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 13
 55 agcatacacc tccagatcaa agtctg 26

 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 445 710 T3

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 14
 ctggaggctt atgctattcc ggtctcc 27

 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 15
 agcataagcc tccagatcaa agtcgta 27

 <210> 16
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 25 <400> 16
 ctggagattt atgctattcc ggtctcc 27

 <210> 17
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 17
 agcataaatc tccagatcaa agtcgta 27

 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18
 50 ctggagtgt atgctattcc ggtctc 26

 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Cebador

 <400> 19
 60 agcataacaac tccagatcaa agtcgta 27

 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 445 710 T3

	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 20	ctggagtttt atgctattcc ggtctcc	27
	<210> 21		
	<211> 27		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
15	<400> 21	agcataaaac tccagatcaa agtcgta	27
	<210> 22		
	<211> 27		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
25	<400> 22	accagaggagg gctgggtgt tcctgc	27
	<210> 23		
	<211> 27		
30	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
35	<400> 23	ccagccctcc tgggttcag tggcatc	27
	<210> 24		
	<211> 27		
40	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
45	<400> 24	accaggatg gctgggtgt tcctgc	27
50	<210> 25		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 25	ccagccatcc tgggttcag tggcatc	27
60	<210> 26		
	<211> 26		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

ES 2 445 710 T3

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 26
 tgaaccgag cagggtggg ttgtc 26

 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 27
 ccctgctcg ttcagtggc atcagg 26

 <210> 28
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 25 <400> 28
 tgaaccgat cagggtggg ttgtc 26

 <210> 29
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 29
 ccctgatcg ttcagtggc atcagg 26

 <210> 30
 <211> 27
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 45 <400> 30
 gaaaccgagg agggctgggt tgtcct 27

 <210> 31
 <211> 27
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 55 <400> 31
 gccctcctcg gttcagtgg catcagg 27

 <210> 32
 <211> 27
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

 65

ES 2 445 710 T3

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 32
 accgaggatg gctgggtgt tcctgc 27

 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 33
 ccagccatcc tcggttcag tggca 25

 <210> 34
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 25 <400> 34
 gaaaccgacg agggctgggt tgttct 27

 <210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 35
 gccctcgtcg gtttcagtgg catca 25

 <210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador

 <400> 36
 50 accgacgatg gctgggtgt tcctgc 27

 <210> 37
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Cebador

 <400> 37
 60 ccagccatcg tcggttcag tggcatca 28

 <210> 38
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 445 710 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 38
 5 aacatccaat acggtactgg cggcgca 27

 <210> 39
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 39
 15 accgtattgg atgtttaggt thtagtt 27

 <210> 40
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 40
 25 aacatcgatt acggtactgg cggcgca 27

 <210> 41
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 41
 accgtaatcg atgtttaggt thtagtt 27

 <210> 42
 <211> 1086
 <212> ADN
 <213> *Rhizomucor pusillus*

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1083)

 <400> 42
 50

ES 2 445 710 T3

100	105	110	
aac gtc agc ggc cca act gct gag cag tct ccc gac tct gaa ctc ttc			384
Asn Val Ser Gly Pro Thr Ala Glu Gln Ser Pro Asp Ser Glu Leu Phe			
115	120	125	
ctt gat ggt atc ttc ggc gca gcc tac cct gac aac act gcc atg gaa			432
Leu Asp Gly Ile Phe Gly Ala Ala Tyr Pro Asp Asn Thr Ala Met Glu			
130	135	140	
gcc gaa tac gga gat act tac aac act gtc cac gtt aac ctc tac aag			480
Ala Glu Tyr Gly Asp Thr Tyr Asn Thr Val His Val Asn Leu Tyr Lys			
145	150	155	160
cag ggc ttg atc tct tct cct gtc ttc tct gtg tac atg aac acc aac			528
Gln Gly Leu Ile Ser Ser Pro Val Phe Ser Val Tyr Met Asn Thr Asn			
165	170	175	
gac ggt ggc ggc caa gtt gtc ttt ggt ggc gtc aac aac acc ctt ctc			576
Asp Gly Gly Gly Gln Val Val Phe Gly Gly Val Asn Asn Thr Leu Leu			
180	185	190	
gga gga gac att caa tac act gac gtt ttg aag agc cga ggc ggc tac			624
Gly Gly Asp Ile Gln Tyr Thr Asp Val Leu Lys Ser Arg Gly Gly Tyr			
195	200	205	
ttc ttc tgg gat gcc cct gtc acc ggt gtc aaa att gat gga tct gac			672
Phe Phe Trp Asp Ala Pro Val Thr Gly Val Lys Ile Asp Gly Ser Asp			
210	215	220	
gct gtc agc ttc gac ggc gcc cag gca ttc acc atc gat acc ggc acc			720
Ala Val Ser Phe Asp Gly Ala Gln Ala Phe Thr Ile Asp Thr Gly Thr			
225	230	235	240
aac ttc ttc atc gca ccc tcc agc ttt gcc gag aag gtt gta aag gct			768
Asn Phe Phe Ile Ala Pro Ser Ser Phe Ala Glu Lys Val Val Lys Ala			
245	250	255	
gca ctc ccc gat gct acc gag tgc cag cag ggt tat act gtt cct tgc			816
Ala Leu Pro Asp Ala Thr Glu Ser Gln Gln Gly Tyr Thr Val Pro Cys			
260	265	270	
tcc aag tac cag gat tcc aag acc acc ttc agc ctt gtt ctg caa aag			864
Ser Lys Tyr Gln Asp Ser Lys Thr Thr Phe Ser Leu Val Leu Gln Lys			
275	280	285	
tct ggt tcc agc agc gat acc att gac gtc tgc gtt cct att agc aag			912
Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Ile Asp Val Ser Val Pro Ile Ser Lys			
290	295	300	
atg ctt ctt cca gtc gat aag tgc ggc gag act tgc atg ttc atc gta			960
Met Leu Leu Pro Val Asp Lys Ser Gly Glu Thr Cys Met Phe Ile Val			
305	310	315	320
ctt ccc gat ggc ggt aac cag ttc att gtt ggc aac ctc ttc ttg cgc			1008
Leu Pro Asp Gly Gly Asn Gln Phe Ile Val Gly Asn Leu Phe Leu Arg			
325	330	335	
ttc ttc gtc aac gtt tac gac ttt ggc aag aac cgt atc ggc ttt gca			1056
Phe Phe Val Asn Val Tyr Asp Phe Gly Lys Asn Arg Ile Gly Phe Ala			

ES 2 445 710 T3

340 345 350 1086
 cct ttg gct tcc gga tac gag aac aac taa
 Pro Leu Ala Ser Gly Tyr Glu Asn Asn
 355 360

5

<210> 43
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> *Rhizomucor pusillus*

<400> 43

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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteasa de tipo mejorado que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 75 % idéntica a la SEC. ID. Nº 3, dicha proteasa de tipo mejorado tiene al menos una mutación seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- (A) sustitución de la glutamina correspondiente a la glutamina en la posición 265 de la SEC ID Nº 3 con un aminoácido ácido; y
- 10 (B) sustitución de la glutamina en la posición 266 de la SEC ID Nº 3 con un aminoácido ácido, y en la que dicha proteasa de tipo mejorado tiene actividad coagulante de la leche.
2. La proteasa de tipo mejorado de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 15 (A) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEC ID Nº 3 o 43 excepto por que la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 se ha(n) sustituido con un aminoácido ácido.
- (B) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEC ID Nº 3 o 43 excepto por que la glutamina en la posición 265 y/o la glutamina en la posición 266 se ha(n) sustituido con un aminoácido ácido y no más de 10 aminoácidos en posiciones distintas de 265 y 266 se han sustituido, delecionado, insertado o añadido, y en la que dicha proteasa de tipo mejorado tiene actividad coagulante de la leche.
- 20 3. La proteasa de tipo mejorado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho aminoácido ácido es ácido glutámico o ácido aspártico.
- 25 4. La proteasa de tipo mejorado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el ácido glutámico en la posición 19 se sustituye con valina, alanina, isoleucina o leucina.
5. La proteasa de tipo mejorado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la treonina en la posición 81 se sustituye con glutamina o ácido aspártico.
- 30 6. Un ADN que codifica la proteasa de tipo mejorado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de expresión que comprende el ADN de acuerdo con la reivindicación 6.
- 35 8. Una célula transformada distinta de una célula humana en la que se introduce el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una célula transformada de acuerdo con la reivindicación 8 que es una célula de levadura, una célula fúngica o una célula vegetal.
- 40 10. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 8, siendo dicha célula transformada *Saccharomyces cerevisiae*.
- 45 11. Un procedimiento para producir una proteasa de tipo mejorado que tiene actividad coagulante de la leche, que comprende las etapas de cultivo de la célula transformada de acuerdo con la reivindicación 8, 9 o 10 en un medio de cultivo y la recolección de la proteasa de tipo mejorado en el medio de cultivo.

Fig. 1

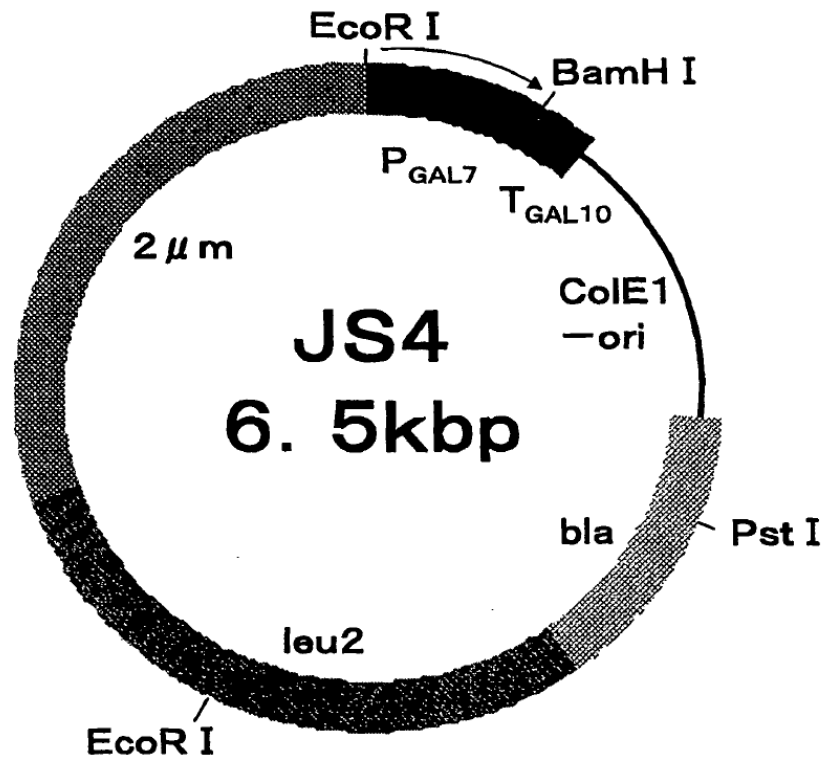


Fig. 2

RMPP	1	AEGDGSVDTPGLYDFDLEEYAIPVSI	IGTPGQDFYLLFDTGSSDTWVPHKGC	DNSEGCVGK	60
		A DGSVDTPG YDFDLEEYAIPVSI	IGTPGQDF LLFDTGSSDTWVPHKGC	SEGCVG	
RMMP	1	AAADGSVDTPGYDFDLEEYAIPVSI	IGTPGQDFLLLFDTGSSDTWVPHKGCTK	SEGCVGS	60
RMPP	61	RFFDPSSTFKETDYNLNITYGTGGANGI	YFRDSITVGGATVKQQTLAYVDNVSGPTAE	120	
		RFFDPS+SSTFK T+YNLNITYGTGGANG+YF	DSI +G TV +Q LAYVDNV GPTAE		
RMMP	61	RFFDPSTSTFKATNYNLNITYGTGGANGLY	FEDSIAIGDTTVKQILAYVDNVRGPTAE	120	
RMPP	121	QSPDSEFLDGI	FGAAYPDNTAMEAEYGDYNTVHVNL	YKQGLISSPVFSVYMNTNDGGG	180
		QSP++++FLDG+FGAAYPDNTAMEAEYG	TYNTVHVNL	YKQGLISSP+FSVYMNTN G G	
RMMP	121	QSPNADIFLDGL	FGAAYPDNTAMEAEYGSTYNTVHVNL	YKQGLISSPLFSVYMNTNSGTG	180
RMPP	181	QVVFEGVNNTLLGGDI	QYTDVLKSRGGYFFWDAPVTG	VKIDGSDAVSFDGAQAFTIDTGT	240
		+VVFEGVNNTLL GDI YTDV+	GGY+PWDAPVTG+ +DGS AV F QAFTIDTGT		
RMMP	181	EVVFEGVNNTLLSGDI	AYTDVMSRYGGYFFWDAPVTG	ITVDGSAAVRFSRPAFTIDTGT	240
RMPP	241	NFFIAPSSFAEKVKAALPDATES	QQGYTVPCSKYQDSKTTFSLVLQKSGSSSDT	IDVSV	300
		NFFI PSS A K+VKAALPDATE+QQG+	VPC+ YQ+SK+T S+V+QKSGSSSDT	++SV	
RMMP	241	NFFIMPSSAASKIVKAALPDATET	QQGWVPCASYQNSKSTISIVMQKSGSSSDT	IEISV	300
RMPP	301	PISKMLLPVDKSGETCMFI	ILPDGGNQFIVGNLFLRFFVNVYDFG	KNRIGFAPLASGYEN	360
		P+SKMLLPVD+S ETCMFI+LPDGGNQ+	IVGNLFLRFFV+VYDFG NRIGFAPLAS YEN		
RMMP	301	PVSKMLLPVDQSNETCMFI	ILPDGGNQYIVGNLFLRFFVSVYDFG	NNRIGFAPLASAYEN	360