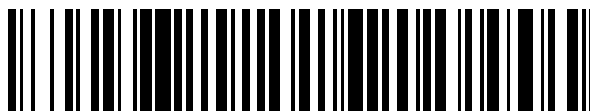


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 292**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/75** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12M 1/107** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2002 E 02774801 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 1451292**

54 Título: **Bacillus subtilis no esporulante que tiene partes del gen que codifica Sigma G eliminadas**

30 Prioridad:

**06.11.2001 FI 20012143**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.03.2014**

73 Titular/es:

**SYNTHETIC BIOLOGICS, INC. (100.0%)**  
**617 Detroit Street**  
**Ann Arbor, MI 48104 , US**

72 Inventor/es:

**KOSKI, PERTTI y**  
**KÄÄRIÄINEN, SUSANNA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 452 292 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

Bacillus subtilis no esporulante que tiene partes del gen que codifica Sigma G eliminadas

## Campo de la invención

La invención se refiere a una cepa de *Bacillus subtilis* no esporulante, a un método para su preparación y a su uso como un organismo de producción. Además, la invención se refiere a un método para la preparación de un producto preparado biológicamente usando una bacteria no esporulante.

## Fundamento de la invención

Las bacterias del género *Bacillus* se usan de forma extensiva en la producción de diferentes enzimas industrialmente significativas. Los huéspedes de producción más significativos son *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* que se usan como productores de proteasas y amilasas, por ejemplo. Los procedimientos industriales generan cantidades significativas de masa bacteriana que necesita desactivarse antes de su descarga en el medioambiente, especialmente si la bacteria es una bacteria manipulada genéticamente. La destrucción de células de producción esporuladas necesita un procesamiento más intensivo que las células asporógenas. Las esporas de *Bacillus* resisten al calor mucho mejor que las células vegetativas y por lo tanto, destruirlas por calentamiento necesita temperaturas altas y tratamientos de larga duración. Estos tratamientos aumentan invariablemente el equipo y costes de operación en la producción. Esto es por lo que es deseable usar una cepa no esporulante de *Bacillus*. La presente invención proporciona una solución al problema de la esporulación que mejora significativamente el uso de *B. subtilis* como un organismo de producción.

La esporulación es un suceso multietapa (I a VII) que se inicia en ciertas condiciones de cultivo en que primero se crea una pre-espora dentro de la célula madre. Finalmente, la célula madre muere y la espora adulta se libera. La espora resiste a mayor sequedad y calor que la célula madre y así asegura la supervivencia de la bacteria en condiciones desfavorables. En condiciones favorables, la espora se activa y la división de la célula bacteriana se reinicia. Las diferentes etapas de esporulación se han establecido por medio de mutaciones genéticas que afectan a la esporulación, y por el momento, se conocen más de 125 genes que afectan a la esporulación (Stragier y Losick, 1996).

La producción de proteínas usando una bacteria *Bacillus* incapaz de la esporulación se describe en el documento WO97/03185, por ejemplo, que propone la omisión de la esporulación mutando los genes de esporulación. La publicación describe la supresión del gen de esporulación *spoIIAC* de *Bacillus licheniformis*. La supresión se realizó usando una plásmido sensible a la temperatura al que se introdujo un producto PCR preparado por la técnica SOE (empalme por extensión de solapamiento), en cuyo producto las regiones de ambos lados del gen *spoIIAC* se unieron de tal manera que el gen *spoIIAC* del medio se excluyó. La técnica SOE se describe en la patente de EE.UU. 5.023.171, por ejemplo. La estructura de supresión *in vitro* puede introducirse dentro de la célula bacteriana por medio del plásmido, y la replicación del plásmido libre puede evitarse elevando la temperatura, revelando así la bacteria recombinante en que está insertado el plásmido en un cromosoma. La supresión del gen deseado tiene lugar cuando el plásmido se separa del cromosoma de una cierta manera. En dicha publicación de patente WO, la técnica descrita fue, sin embargo, incapaz de eliminar el gen *spoIIAC* de la bacteria *B. subtilis*. La recombinación en la etapa de separación del plásmido siempre se da de manera que el gen *spoIIAC* permanece intacto.

Las cepas de *B. subtilis* no esporulantes, se describen, sin embargo, en otra parte. El documento EP 164.117 se refiere a una cepa de *B. subtilis* con una mutación en el gen *spoIIA*, el documento EP 492.274 se refiere a una cepa de *B. subtilis* con una mutación en el gen *spoIID*, y los documentos US 4.450.235 y US 4.450.236 se refieren a una cepa de *B. subtilis* con una supresión en el gen *spoOA*. Dichos genes se asocian con la etapa II esporulante o antes.

Uno de los genes conocidos de la siguiente etapa esporulante (III) es el gen *sigG* (=gen *spoIIIG*) que codifica el factor sigma-G que se une a una ARN polimerasa que a su vez puede unirse al promotor de ciertos genes esporulantes en la pre-espora. Este factor sigma-G es necesario en la tercera etapa de esporulación, y se conoce por controlar al menos 19 transcripciones génicas (Ishii *et al.*, 2001). Los productos de los genes asociados con el sistema de control Sigma-G mejoran la capacidad de supervivencia y re-germinación de las esporas (Haldenwang, 1995).

Fougler y Errington (1989) han descrito una cepa *B. subtilis* 646 que es un mutante de *sigG* formado espontáneamente. La única cosa conocida de la mutación es que está fuera del promotor y los 30 primeros codones. Esta información se ha obtenido a partir de una fusión activa *spoIIIG-lacZ* que se insertó en un cromosoma. En el caso de dichos mutantes espontáneos o provocados de forma aleatoria, la posición o acción exacta de la mutación no se conoce normalmente. La posibilidad de mutación inversa, es decir, la inversión de la esporulación tal como era, de dichas cepas, no puede controlarse y la posibilidad de varias mutaciones del supresor es además alta. Como la posición de la mutación no se conoce, normalmente no es posible, además, saber si se crea una proteína cambiada. Además, una mutación en otro gen puede suprimir, por ejemplo, el efecto de la mutación original. También se han hecho intentos de desactivar el gen *sigG* haciendo inserciones, por ejemplo. Illing *et al.* (1990), por ejemplo, clonaron un fragmento HindIII-PstI de 320 pares de bases de *sigG* a un plásmido de integración y obtuvieron como resultado de la integración una cepa *B. subtilis* no esporulante N15 (*trpC2 spoIIIG::pSGMU422*). El

plásmido de integración, sin embargo, se separó del cromosoma sin una presión de selección con cloranfenicol, y posteriormente, este tipo de cepa no es adecuada como un huésped de producción.

Karmazyn-Campelli *et al.* (1989) han descrito la desactivación del gen *sigG* insertando un casete de resistencia al cloranfenicol de 1,5 kb (cat) entre los codones 166 y 167 (*spoIIIIG::cat*). Esta inserción se hizo, sin embargo, de tal manera que el gen *sigG* aún permaneció, incluso aunque se cortó, en el cromosoma. Así, hay un riesgo de mutación inversa. Incluso aunque una cepa inactiva por inserción cat no pueda recombinarse, la supresión puede devolver la actividad del gen *sigG* y la esporulación de la cepa de vuelta a normal.

Karmazyn-Campelli *et al.* (1989) ha eliminado además un fragmento del gen *sigG*, 70 pares de bases, entre los codones 18 y 42. El efecto de esta supresión (*spoIIIIGΔ1*) en la esporulación permanece, sin embargo, confuso, porque durante la supresión, un fragmento extra *HaeIII* de 18 pares de bases apareció inesperadamente entre dichos codones a partir del pUC8 usado como el vector de clonación. Este fragmento extra tenía un codón de parada justo al principio, así que no hay certeza de que la supresión de 70 pares de bases sea suficiente para finalizar la esporulación. Sin el fragmento extra, al menos un factor sigma que funciona parcialmente podría crearse incluso después de la supresión, especialmente ya que la supresión no incluye regiones que se cree que son significativas en la unión a los promotores diana. En otras palabras, no quedó claro si la desactivación del gen *sigG* se provocó por la supresión o meramente por el codón de parada extra.

Kim J.-H. *et al.* 2001 han descrito un mutante *B. subtilis* con una supresión en el gen *spoIIIIG*. La supresión en cuestión fue solo de un nucleótido de largo y que se encontraba fuera de las regiones funcionales del gen (nucleótido 397 del gen *sigG*, timidina (T) eliminada). Un bloque de resistencia a la kanamicina (kana<sup>r</sup>) se insertó después del sitio de supresión. Esto produjo mutantes con una reducida capacidad de esporulación. No hay información de la estabilidad de la cepa. La frecuencia de inversión de un nucleótido es, sin embargo, significativa, y esta clase de cepa, por lo tanto, no se recomienda como el huésped de producción de una proteína extraña.

Los estudios publicados anteriormente han examinado normalmente las diferentes etapas de esporulación y se han escogido mutantes, sin grandes exigencias puestas en su estabilidad. Por consiguiente, ninguno de los mutantes *sigG* presentados de la bacteria *B. subtilis* son adecuados como una cepa de producción, de la que una permanente, es decir no reversible, esporulación se necesita. La presente invención proporciona actualmente una cepa *B. subtilis* estable, totalmente no esporulante, adecuada como una cepa de producción. Además, la esporulación se elimina de tal manera que no tiene efectos desfavorables en la producción del producto deseado o sus propiedades.

### Compendio de la invención

La invención se refiere a una cepa de *B. subtilis* no esporulante caracterizada por que comprende una supresión de al menos 300 nucleótidos en su gen *sigG*, por el que la supresión comprende al menos parte de ambas regiones funcionales del gen *sigG* que codifican los aminoácidos 67 a 80 o 229 a 248, respectivamente, de la proteína *sigG*, y que dicha cepa tiene la capacidad de producir un polipéptido recombinante. La supresión presentada en esta memoria muestra sin lugar a dudas el efecto de la supresión *sigG* en la prevención de la esporulación. Además, en la supresión génica, es difícil predecir como la supresión afecta a las demás funciones del organismo o su capacidad de sobrevivir como un todo. La presente invención muestra, sin embargo, que la supresión del gen *sigG* no afectó a otras funciones esenciales de la bacteria eliminada, tal como su capacidad para producir polipéptido recombinante.

La presente invención proporciona además un método para la preparación de una cepa *B. subtilis* no esporulante, caracterizado por que al menos 300 nucleótidos se eliminan del gen *sigG* de una cepa de *Bacillus subtilis*, por lo que la supresión comprende al menos parte de ambas regiones funcionales del gen *sigG* que codifican los aminoácidos 67 a 80 o 229 a 248, respectivamente, de la proteína *sigG*, y se inserta ADN que codifica un polipéptido recombinante, por lo que dicha cepa tiene la capacidad de producir un polipéptido recombinante. Además, la invención se refiere al uso de la cepa *B. subtilis* no esporulante presentada como un organismo de producción. La invención incluye además un método para la preparación de un polipéptido recombinante preparado biológicamente, caracterizándose el método por que el producto se prepara usando la cepa *B. subtilis* no esporulante de la invención.

Se describen realizaciones preferidas de la invención en las reivindicaciones dependientes.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una vista esquemática de la supresión del gen *sigG*,

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos de la región de supresión de la cepa *B. subtilis* no esporulante RS303,

La Figura 3 muestra el crecimiento (-----) de una cepa *B. subtilis* esporulante (RS201) y no esporulante (RS310) y la producción (-----) de β-lactamasa (BLP) en un cultivo con agitación de 100 ml.

## Descripción detallada de la invención

La *B. subtilis* de la invención se hace no esporulante eliminando un fragmento significativo del gen *sigG*, que en este contexto significa al menos 300 nucleótidos. El gen *sigG* tiene al menos dos regiones funcionales, es decir, regiones significativas para la actividad de la proteína, de las que una codifica un dominio que presumiblemente se une a sí mismo al fragmento central de la ARN polimerasa y comienza desde el aminoácido núm. 67 y termina en el aminoácido núm. 80. Este dominio se define comparando la secuencia de aminoácidos del factor sigma-G de la bacteria *B. subtilis* con otras secuencias de factor sigma conocidas. Otra región funcional importante es el motivo H-T-H (hélice-giro-hélice) que está presente en proteínas que se unen a sí mismas al ADN, también definida en base a la similitud y cubre los aminoácidos 229 a 248 de la proteína *sigG*. La región a suprimir se encuentra preferiblemente en la región entre los nucleótidos que codifican los aminoácidos núm. 67 y 248 de la proteína *sigG*. La supresión se encuentra de modo que comprende al menos una parte de ambas de las dos regiones funcionales del gen *sigG*, cuyas regiones codifican los aminoácidos 67 a 80 o correspondientemente 229 a 248 de la proteína *sigG*. Según una realización, al menos 600 y especialmente al menos 670 nucleótidos se eliminan del gen *sigG*. Es apropiado eliminar los nucleótidos 39 a 715, por ejemplo. También es posible eliminar el gen *sigG* entero y la región promotora del gen.

El gen *sigG* puede eliminarse de muchas formas diferentes. Preferiblemente, una inserción se prepara primero por la técnica SOE (empalme génico por extensión de solapamiento), que significa que los fragmentos de nucleótidos necesarios para la inserción se amplifican primero por una reacción PCR, cuyos cebadores se diseñan de tal manera que los fragmentos amplificados en la reacción PCR pueden ligarse a través de una segunda reacción PCR usando una secuencia complementaria, es decir, región de solapamiento. Una inserción apropiada contiene las regiones flanqueadoras del gen a eliminar y al menos un gen marcador de selección. La región flanqueadora se refiere en esta memoria a regiones adyacentes corriente arriba y abajo de la región génica a eliminar que no se eliminan. El gen marcador de selección es un gen que codifica cualquier propiedad seleccionable, tal como enzima, que se refiere a la formación de un metabolito específico o resistencia a antibióticos.

La inserción que se prepara puede ser o bien un plásmido o preferiblemente un ADN lineal, en cuyo caso el gen marcador de selección se encuentra entre las regiones flanqueadoras. *B. subtilis* se transforma entonces con esta inserción, es decir, "casete de intercambio", cuyos extremos son homólogos con las regiones flanqueadoras del gen que se elimina. Como resultado de dos entrecruzamientos simultáneos entre regiones homólogas, la inserción se integra en el cromosoma de la bacteria en el lugar del gen *sigG* eliminado. Una supresión realizada usando dicha recombinación doble de homólogos se describe en la patente de EE.UU. 4.963.487, por ejemplo. El gen marcador de selección reemplaza así la región génica *sigG* eliminada. Los transformantes deseados, a partir de los que se elimina el gen *sigG*, pueden entonces cribarse sometiendo a las bacterias a la presión de selección determinada por el gen marcador de selección. Las bacterias no esporulantes de la invención son estables y no pueden recuperar su capacidad de esporulación incluso si el gen marcador de selección insertado se eliminó del cromosoma.

La supresión del gen *sigG* descrita anteriormente se presenta en más detalle en la Figura 1 que se explicará ahora en mayor detalle. Tres productos de ADN, AB, CD y EF se preparan por una reacción PCR usando cebadores A y B, C y D y E y F, respectivamente. Los productos AB y EF se preparan a partir del ADN cromosómico de la bacteria *B. subtilis* y el producto CD a partir de un plásmido adecuado, por ejemplo. AB comprende la región flanqueadora (final de *spoIIGA* y *sigE*) corriente arriba del gen *sigG* y EF comprende la región flanqueadora (principio de *ylmA*) corriente abajo del gen *sigG*. El producto CD comprende el gen marcador de selección que en este caso es un gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) obtenible, por ejemplo, a partir del plásmido pHV14 (Ehrlich, 1978) o pC194 (Horinouchi y Weisblum, 1982). Los cebadores usados en PCR son tales que los productos PCR obtenidos AB, CD y EF pueden ligarse por medio de secuencias complementarias parcialmente solapadas. Los cebadores B y C y los cebadores D y E, respectivamente, son así parcialmente complementarios. Tres productos PCR pueden ligarse en dos etapas. Según la Figura 1, primero AB+CD y CD+EF se ligan, después de lo cual los productos PCR obtenidos AD y CF se ligan utilizando las regiones homólogas que tienen la longitud de producto CD para obtener la inserción AF deseada, que contiene así (en orden 5' → 3') la región flanqueadora del gen *sigG* (*sigE*, por ejemplo), el gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) y la segunda región flanqueadora (principio de *ylmA*) del gen *sigG*. Una inserción correspondiente puede construirse de forma alternativa preparando primero AD, por ejemplo, y ligándolo con el producto EF, o preparando primero CF y ligándolo con el producto AB. Las bacterias *B. subtilis* se transforman entonces con la inserción AF obtenida y los transformantes deseados se criban en presencia de cloranfenicol.

Los cebadores descritos anteriormente pueden diseñarse además de manera que la región de solapamiento corriente arriba del gen marcador de selección es homóloga con la región de solapamiento corriente abajo del gen marcador de selección. Esto permite la supresión del gen *cat* insertado después de la región de supresión. La supresión del gen *cat* puede tener lugar de tal manera que los productos AB y EF se ligan a través de una reacción PCR usando la región de solapamiento para producir producto ABEF que se usa entonces para transformar el transformante  $\text{SigG}^-$ ,  $\text{Cat}^+$  anterior para eliminar el gen *cat* del transformante. Dichas regiones de solapamiento homólogas permiten también la supresión del gen *cat* con recombinación homóloga por medio de una región de solapamiento de repetición en la secuencia.

En el diseño de los cebadores usados en la técnica SOE, se siguen reglas generales, de las que Sambrook y Russell (2001), por ejemplo, han hecho un compendio. Debe notarse especialmente que para unir fragmentos de ADN, las regiones de solapamiento serían al menos de 20 a 25 nucleótidos de largo para permitir el uso de

temperaturas de hibridación suficientemente altas en PCR para asegurar la especificidad (McPherson y Møller, 2000). Regiones de solapamiento más cortas de aproximadamente 15 nucleótidos, pueden usarse si un ADN menos complejo, tal como un plásmido, se usa como el iniciador en vez de un ADN cromosómico. Cuando se usan cebadores sintéticos, su longitud máxima podría ser aproximadamente 100 nucleótidos según la presente técnica.

5 Los fragmentos de ADN que se han desnaturalizado para ser de cadena sencilla y se han hecho con PCR o se han empalmado con enzimas de restricción o mecánicamente a partir de un ADN macromolecular, pueden usarse también como cebadores, en cuyo caso la longitud máxima de los cebadores no puede definirse exactamente, aunque pueden ser incluso de varias decenas de miles de nucleótidos. El éxito de la unión de los fragmentos de ADN usados en la supresión también depende de la pureza de los productos PCR. Cuando un gen o una parte de él

10 se va a eliminar, es importante que la reacción PCR del producto SOE final no tenga más el iniciador usado en el principio, en el que el gen completo está intacto.

En *B. subtilis*, la recombinación entre el cromosoma y la región de ADN homóloga en el plásmido es eficiente. Se ha sugerido que 150 pares de bases de ADN homólogo en un plásmido que no replica en *B. subtilis* es suficiente para la integración (Ferrari y Hoch, 1989). Khasanov *et al.* (1992) usó un plásmido con un replicón sensible al calor y

15 mostró que 70 nucleótidos fueron suficientes para una integración que se da usando recombinación de homólogos. Los plásmidos mencionados anteriormente se integraron con el cromosoma a través de un contrario de entrecruzamiento a un ADN lineal, cuya integración necesita que la recombinación de homólogos se dé simultáneamente en dos sitios. Cuando se transforma con ADN producido por una técnica SOE lineal, las regiones homólogas no serían mayores que 70 a 150 nucleótidos de manera que es posible detectar la integración del

20 fragmento SOE al cromosoma con los métodos de transformación de la técnica anterior. Una región homóloga con las regiones flanqueadoras del gen a eliminar de la inserción de ADN lineal comprende al menos varios cientos de pares de bases o incluso al menos un millar de pares de bases.

La longitud máxima de la región homóloga se determina principalmente en base a las propiedades de la ADN polimerasa usada en PCR. Las enzimas de PCR presentes son capaces de amplificar fragmentos de ADN de varias

25 decenas de pares de kilobases, aunque al mismo tiempo la probabilidad de mutaciones en los fragmentos de ADN creados aumenta. Una longitud máxima práctica de la región homóloga es, sin embargo, presumiblemente aproximadamente 5 kilobases (kb). Se recomienda especialmente que la región flanqueadora corriente arriba de la región eliminada de la inserción de ADN, el gen marcador de selección y la región flanqueadora corriente abajo de la región eliminada tengan todas esencialmente la misma longitud. Lo más preferiblemente, la longitud de la región

30 homóloga es aproximadamente 1 kb y la longitud de la inserción lineal entera es aproximadamente 3 kb.

La supresión del gen puede hacerse además usando una recombinación de homólogos de dos etapas. El método se describe con *Lactococcus lactis* (Biswas *et al.*, 1993), y el gen *spoliAC* de *B. licheniformis* se elimina con el mismo método (documento WO97/03185). Ambos casos utilizan un plásmido, cuya replicación es sensible al calor y que

35 tiene un marcador de resistencia al antibiótico. Las regiones flanqueadoras a eliminar se insertan primero secuencialmente y en la misma dirección en un plásmido, tal como pE194, adecuado para la bacteria *B. subtilis*. El plásmido se transforma a la bacteria competente a una temperatura de 32°C que permite la replicación, y los transformantes obtenidos se desarrollan a 45°C, por lo que solo las bacterias en que la integración a un cromosoma ha tenido lugar pueden crecer en un medio de cloranfenicol. Como resultado de la integración, dos pares de regiones homólogas se forman en el cromosoma, entre las que una segunda recombinación puede tener lugar

40 cuando los transformantes se desarrollan sin cloranfenicol a 32°C. Una recombinación entre uno de los pares homólogos lleva tanto a la separación del plásmido como a la supresión de la región entre las regiones homólogas en el plásmido en el cromosoma. La longitud de las regiones homólogas usadas puede ser 70 a 2.500 pares de bases. En la manera descrita, es posible realizar varias supresiones sucesivas de la misma cepa, porque nada extra, tal como un marcador de selección de antibiótico, permanece en el cromosoma.

Además, la supresión deseada puede realizarse usando las dos regiones homólogas en el plásmido. La estructura de supresión, que comprende las regiones flanqueadoras en ambos lados de la supresión y el marcador de selección entre ellas, puede insertarse entonces en un plásmido que no replica en la bacteria *B. subtilis* (por

45 ejemplo, pJH101) o cuya replicación depende de la temperatura (pE194). El plásmido obtenido se transforma a la bacteria competente y se criban los transformantes resistentes. Estos métodos normalmente necesitan el uso de dos marcadores de selección para distinguir los transformantes en que ha tenido lugar la recombinación a través de solo una región homóloga y no de ambas.

50

La bacteria *B. subtilis* no esporulante, a partir de la que el gen *sigG* se ha eliminado esencialmente, es adecuada para una cepa de producción de varios productos preparados biológicamente. Un producto preparado biológicamente se refiere a un compuesto que un organismo puede producir. Normalmente, es un compuesto biológicamente activo. Preferiblemente, este producto se secreta de forma extracelular por la célula. El producto

55 puede ser o bien un producto natural de una bacteria o un producto formado como resultado de ingeniería genética.

Los productos preparados pueden ser polipéptidos, por ejemplo, que se prevén para uso médico, tal como  $\beta$ -lactamasas basadas en bacteria, sustancias transmisoras mamarias, tales como hormonas peptídicas e interferonas. Una bacteria no esporulante también es adecuada como el huésped de producción de enzimas significativas

60 industrialmente, tales como proteasas, amilasas, pululanases, xilanasas,  $\beta$ -lactamasas, xilosa isomerasas y betaglucanasas.

Según una realización, el ADN que codifica un polipéptido deseado, tal como  $\beta$ -lactamasa, se inserta en la cepa *B. subtilis* no esporulante, el ADN se expresa en la célula y el polipéptido recombinante obtenido se recupera de la célula o el medio de cultivo. La introducción del ADN necesario para la expresión del polipéptido o metabolito deseado puede realizarse con una técnica que es, por ejemplo, la transformación usando competencia natural o electroporación, o con cualquier técnica adecuada para la bacteria *B. subtilis*.

### Ejemplo

#### Cepas bacterianas y plásmidos

Las propiedades de las cepas bacterianas y plásmidos usados en el ejemplo se enumeran en la Tabla 1. La secuencia del gen *sigG* de *B. subtilis* 168 del organismo huésped y sus regiones flanqueadoras se obtuvo a partir de un banco de datos (base de datos Micado, <http://locus/jouy.inra.fr>). La región que codifica el gen *cat* se origina a partir del plásmido pSJ2739E y es la misma que la del plásmido pC194 de la bacteria *Staphylococcus aureus* (número de acceso GenBank VO1277). El vector de producción pRSH10 es un plásmido que codifica la  $\beta$ -lactamasa pen P de *Bacillus licheniformis*. En dicho plásmido, pen P se inserta en los sitios de clonación *HindIII* del vector de secreción pKTH141 (Lundström, 1985). El promotor  $\alpha$ -amilasa del vector y el fragmento que codifica la secuencia de señalización se deriva de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos

| CEPA                                             | REGIÓN DE SUPRESIÓN | PROPIEDADES                                         | MARCADOR DE SELECCIÓN | PLÁSMIDO | SELECCIÓN |
|--------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|----------|-----------|
| 168                                              |                     | cepa salvaje de <i>B. subtilis</i> 168 <sup>a</sup> |                       |          |           |
| RS303                                            | <i>SigG</i>         | no esporulante                                      | <i>cat</i>            |          | Cm        |
| RS310                                            | <i>SigG</i>         | no esporulante                                      | <i>cat</i>            | pRSH10   | Cm, Km    |
| RS201                                            |                     | cepa salvaje de <i>B. subtilis</i> 168 <sup>a</sup> |                       | pRSH10   | Km        |
| <sup>a</sup> Ref. Kunst, F. <i>et al.</i> , 1997 |                     |                                                     |                       |          |           |

#### Condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas se desarrollaron en medio Luria Broth (LB) (Harwood y Cutting, 1991), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 10 g/l de triptona (Oxoid) y 10g/l de NaCl (Merck), en un cultivo con agitación, +37°C, 250 rpm. Cuando se monitorizó la producción de proteína, las células se desarrollaron en un medio LB concentrado (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de triptona y 10 g/l de NaCl). Se usaron cloranfenicol (Cm) 5  $\mu$ g/ml y kanamicina (Km) 10  $\mu$ g/ml para la selección en el cultivo bacteriano.

#### Técnicas de ADN

Las técnicas de ADN se usaron con métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN cromosómico se aisló según las instrucciones de Marmur (1961). El plásmido de ADN se aisló de las células bacterianas en una columna de intercambio iónico (equipo QIAGEN Plasmid Midi) según las instrucciones del fabricante (Qiagen Plasmid Purification Handbook Julio/1999). Partiendo de las instrucciones, se añadió un tratamiento de lisozima al protocolo para degradar la capa de peptidoglucano, y en el tratamiento se añadió 1 mg/ml de lisozima a tampón P1 y las células se incubaron en el tampón a +37°C durante 30 minutos. El plásmido purificado se disolvió en 30 a 100  $\mu$ l de agua esterilizada. El contenido de ADN de los preparados de plásmido fue de 50 a 500 ng/ $\mu$ l.

#### Ensayos de esporulación

El efecto de la supresión de *sigG* en la esporulación se ensayó desarrollando células bacterianas en un medio de esporulación y tratando térmicamente (+85°C, 10 min) las células (Harwood y Cutting, 1991). El tratamiento usado mata las células vegetativas, pero no es suficiente para matar las esporas. El número de colonias desarrollándose después del tratamiento indica la cantidad de esporas.

Las células bacterianas de la etapa logarítmica se inocularon 1:100 a un medio de esporulación (medio de esporulación de Schaeffer, SS: 8 g de caldo de cultivo, 1 g de KCl, 0,12 g de MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,5 ml de NaOH 1M, 1 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 1 ml de MnCl<sub>2</sub> 0,01 M·4 H<sub>2</sub>O, 1 ml de FeSO<sub>4</sub> 0,0001 M·7 H<sub>2</sub>O) y se desarrolló durante 24 horas (+37°C, 250 rpm). Para calcular la densidad celular en el cultivo bacteriano, se hicieron diluciones en serie (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup>) en un tampón de dilución (5 ml de tampón K-fosfato 0,1 M, pH 7,4, 2,5 ml de disolución de KCl 1M, 5 ml de disolución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, 37,5 ml de agua esterilizada), y las diluciones 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-9</sup> se pusieron en placas sobre placas LB (100  $\mu$ l/placa). Las placas se incubaron toda la noche a +37°C en una cabina de temperatura, se calculó el número de colonias y se dieron por milímetro.

Para determinar la cantidad de esporas, las células se trataron térmicamente. Las células se calentaron durante 10 minutos a +85°C en un baño de temperatura controlada. Después del tratamiento térmico, las células se pusieron en

placas sobre placas LB. Las placas se incubaron durante 17 horas a +37°C. Se calculó el número de colonias desarrolladas en las placas (por ml). En los ensayos de esporulación, la cepa salvaje 168 se usó como la cepa de control y se trató de la misma manera que las cepas ensayadas.

#### Preparación de la supresión del gen *sigG*

- 5 La supresión del gen *sigG* se realizó transformando la cepa salvaje *B. subtilis* 168 con un fragmento de ADN recombinante lineal construido usando PCR y la técnica SOE (Horton *et al.*, 1989, y documento US 5.023.171). Un diagrama de flujo de la supresión realizada se muestra en la Figura 1. Los cebadores de las reacciones PCR se diseñaron de tal manera que los productos PCR podrían unirse mediante una segunda reacción PCR usando una secuencia complementaria. La Tabla 2 enumera los cebadores usados en las reacciones PCR. En la tabla, las regiones mutuamente complementarias en los cebadores se marcan en negrita y se subrayan. La región complementaria usada en los cebadores es una región de 20 nucleótidos que comienza en el nucleótido 19 del gen *sigG*. El cebador B codifica esta región desde el codón de comienzo del gen *sigG*. Los cebadores B y D y C y E, respectivamente, son parcialmente homólogos.

Tabla 2. Cebadores usados en las reacciones SOE

- A 5'CCGGAATTCGCTGTCGGCAGATGGAGAG3' (Sec. ID núm. 1)  
 B 5'**GTATCCACCCCGCAGATTT**CGACTTTATTTCTCGACAC3' (Sec. ID núm. 2)  
 C 5'**GAAATCTGCGGGGTGGATACCC**GGCAATAGTTACCCTT3' (Sec. ID núm. 3)  
 D 5'**GTATCCACCCCGCAGATTT**CCCTTCTTCAACTAACGGG3' (Sec. ID núm. 4)  
 E 5'**GAAATCTGCGGGGTGGATACCT**CAAGCGCAGGTGTCCA3' (Sec. ID núm. 5)  
 F 5'CCGGAATTCGCACCCCTAGGATGAATCT3' (Sec. ID núm. 6)

- 15 En la mezcla de reacción PCR (100 µl), se usaron 20 a 50 ng de ADN como el iniciador, 30 pmoles de cada cebador, 0,2 mM de dNTP (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania), 0,5 µl de enzima Expand (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) y 10 µl de 10xtampón Expand. Se pipetearon 50 µl de aceite mineral en la mezcla de reacción y las reacciones se hicieron usando el Controlador Térmico Programable PTC-100 (MJ Research, Inc.). Las reacciones PCR se hicieron con el siguiente programa básico que consistía en una etapa de desnaturalización (94°C, 4 min) y dos ciclos posteriores (94°C, 1 min; 50°C, 45 s; 72°C, 4 min) y 25 ciclos (94°C, 1 min; 70°C, 45 s; 72°C, 4 min), seguido por una incubación de 10 minutos a 72°C. Las temperaturas de hibridación de los cebadores se optimizaron para ajustarse a cada reacción. Los productos finales de las reacciones PCR se purificaron a partir de la mezcla de reacción (equipo de purificación por PCR Qiagen Qiaquick, Qiagen GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante (QIAquick Spin Handbook/Abril 2000) y se eluyeron en agua (50 µl). La concentración final de ADN del producto purificado fue 30 a 50 ng/µl. Los productos finales de la reacción PCR se analizaron con electroforesis en gel de agarosa al 1%.

- 20 En la preparación de la supresión del gen *sigG*, la primera etapa fue preparar los productos PCR AB (1047 nucleótidos, nt) y EF (1069 nt) que codifican las regiones flanqueadoras de *sigG* con cebadores A y B y E y F, respectivamente. Se usaron 20 ng de ADN cromosómico purificado de la cepa salvaje 168 como un iniciador en las reacciones PCR. La región CD de 1054 nucleótidos de larga que codifica el gen *cat* se amplificó usando cebadores C y D. Se usaron 50 ng del plásmido purificado pSJ2739E a la que se insertó el gen *cat* a partir de pHV14 como un iniciador en la reacción PCR. El producto PCR amplificado a partir de pSJ2793E usado en esta invención contiene la misma región del gen *cat* y sus alrededores como se describe en la secuencia V01277 (GenBank), empezando desde el nucleótido 973 y terminando en el nucleótido 1985. Los productos AB y CD se amplificaron con el programa básico. En el caso de reacción EF, la temperatura de hibridación del programa básico se disminuyó a 45°C.

- 35 En las siguientes etapas, los productos PCR de 2,1 kilobases de largo AD (2081 nt) y CF (2103 nt) se prepararon con dos reacciones diferentes. Los productos PCR purificados a partir de la mezcla de reacción sirvieron como un iniciador en las reacciones SOE. Los productos PCR AB y CD se ligaron usando una región complementaria de 20 nt de largo. La mezcla de reacción contenía aproximadamente 30 ng de ambos productos finales y la reacción PCR se realizó con cebadores A y D según el programa básico. En la segunda reacción SOE, CD y EF se ligaron usando una región complementaria al producto CF. En esta mezcla de reacción, aproximadamente 30 ng de ambos productos CD y EF se usaron como iniciadores y la concentración de cebadores C y F fueron 30 pmoles cada uno. En esta reacción, se realizaron 25 ciclos del programa básico en diferentes condiciones (94°C, 1 min; 76°C, 45 s; 72°C, 4 min).

- 40 El ADN recombinante AF (3130 nt) se preparó a partir de productos finales AD y CF que se unieron utilizando la región que codifica el gen *cat* y que tiene la misma longitud que el producto CD. La región de 1 kilobase de longitud es complementaria en los productos AD y CF. Para la reacción PCR, se preparó una mezcla de reacción que contenía aproximadamente 100 ng de productos finales AD y CF purificados a partir de la mezcla de reacción de las reacciones PCR descritas anteriormente, y 30 pmoles de cebadores A y F. El producto AF se amplificó con el programa básico.

La supresión del gen *sigG* se preparó transformando las células competentes de la cepa salvaje usando el ADN recombinante lineal AF. La preparación de las células competentes (Gryzan *et al.*, 1978) se comenzó suspendiendo células *B. subtilis* 168 de un placa en 600 µl de medio GMI (medio mínimo modificado: 0,5 ml de glucosa al 20%, 0,1 ml de ácidos casamino al 10%, 0,12 ml de extracto de levadura al 10%, 2,0 ml de 500 µg/ml de triptona, 0,03 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M, 17,25 ml de SMS (Sales Mínimas de Spizizen)), que se usó para inocular 10 ml de medio GMI de tal manera que la densidad óptica (fotómetro Klett-Summerson) fue aproximadamente 30. Las células se incubaron en un cultivo con agitación a una fase estacionaria temprana (37°C, 250 rpm). El cultivo se transfirió a 100 ml de medio mínimo GMII (medio mínimo modificado: 0,5 ml de glucosa al 20%, 0,1 ml de ácidos casamino al 10%, 0,12 ml de extracto de levadura al 10%, 1,875 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 200 mM, 143,1 ml de SMS) y se desarrolló en las mismas condiciones durante 90 minutos. Las células se centrifugaron (7000xg, 5 min) y se suspendieron en 7 ml de sobrenadante.

Las células competentes de la cepa salvaje *B. subtilis* se transformaron usando el producto PCR lineal AF. Se usaron 10 µl (ADN >2 µg) del producto de la reacción PCR en la transformación. En la transformación, se añadieron 10 µl de ADN recombinante AF y 0,05 µg/ml de cloranfenicol para inducir el gen *cat* a 500 µl de disolución de transformación (Gryczan *et al.*, 1978). Las células se incubaron a +37°C, 30 min (180 rpm) y las células se colocaron en placas en placas LB que comprenden 5 µg/ml de cloranfenicol para la selección. La transformación produjo tres colonias de transformación. La cepa no esporulante con *sigG* eliminada se ha llamado RS303.

Chequeo de la construcción de supresión del gen *SigG* por secuenciación

La estabilidad de la región de supresión se aseguró por secuenciación de ADN cromosómico de la bacteria en la región de supresión y sus regiones flanqueadoras. Los productos PCR se prepararon a partir del ADN cromosómico y se secuenciaron. Los cebadores secos por congelación (Amersham Pharmacia Biotech) se disolvieron en 100 µl de agua, y una disolución 3 µM (3 pmoles/µl) se preparó a partir de los cebadores para las reacciones PCR. Se preparó una disolución 5 µM (5 pmoles/µl) a partir de los cebadores para la secuenciación.

Asegurar la estabilidad de las regiones de supresión de cepas no esporulantes RS303 y RS310

Los cebadores usados para los productos PCR necesarios para la secuenciación de la región de supresión a partir del ADN cromosómico de las cepas RS303 y RS310 se muestran posteriormente. La posición de los cebadores en la secuencia se muestra en la Figura 2.

SQ1-F 5'TGCGTTAAACCGGATCACGT3'

SQ2-R 5'TGCACTGCACTCAGACCGA3'

SQ3-F 5' GTAGCGGATATGATGGGGA3'

SQ4-R 5'CCTGCTGTAATAATGGGTAGA3'

SQ5-F 5'CATGGACTTCATTTACTGGG3

SQ6-F 5' GGTATCCTAGTTCGTACAAAG3'

SQ7-R 5'GGAGTCCGATGTACTCCGC3'

La estabilidad de la región de supresión *sigG* de las cepas no esporulantes RS303 y RS310 se aseguró secuenciando tres productos PCR amplificados usando cebadores SQ1-F a SQ7-R: SRS12, SRS34 y SRS567. La siguiente tabla muestra el tamaño de los productos PCR y los cebadores usados para secuenciar las reacciones PCR.

| Producto secuenciado | Tamaño (pb) | Cebadores   | Secuenciado con cebador |
|----------------------|-------------|-------------|-------------------------|
| SRS12                | 1024        | SQ1-F/SQ2-R | SQ1-F/SQ2-R             |
| SRS34                | 1070        | SQ3-F/SQ4-R | SQ3-F/SQ4-R             |
| SRS567               | 1450        | SQ5-F/SQ7-R | SQ5-F/SQ6-F/SQ7-R       |

Los productos PCR se analizaron con electroforesis en gel de agarosa (1% en gel). El producto SRS 12 se purificó a partir de la mezcla de reacción (equipo de purificación de PCR Qiagen Qiaquick, Qiagen GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante (QIAquick Spin Handbook/Abril 2000) y se eluyó en agua (50 µl). Los productos SRS34 y SRS567 se aislaron del gel de agarosa debido a las impurezas en el producto. La purificación a partir del gel se realizó con una columna comercial (equipo de extracción en gel Qiagen) según las instrucciones del fabricante (QIAquick Spin Handbook/Abril 2000) y los productos se eluyeron en agua (50 µl). La concentración final de ADN del producto purificado fue 30 a 50 ng/µl.



La secuencia de nucleótidos de la región de supresión de las cepas no esporulantes RS303 y RS310 es Sec. ID Núm. 9. La Figura 2 muestra además la secuencia de la cepa *B. subtilis* no esporulante en la región del gen *sigG*. La región eliminada del cromosoma corresponde a la región 1605063-1605739 (base de datos Micado, <http://locus/jouy.inra.fr>) en la secuencia de la cepa salvaje 168. De los 780 nucleótidos de la región que codifica el gen *sigG*, 677 nucleótidos se han eliminado por supresión. La región que contiene el gen *cat* (resaltada en gris) insertada en el sitio de supresión corresponde a los nucleótidos 973 a 1985 en la secuencia del plásmido pC194 (núm. acc. de Genbank V01277). El fragmento SOE hecho para realizar la supresión contenía una secuencia de repetición de 21 pares de bases de larga (en negrita) en las regiones flanqueadoras de la región *cat*. La región secuenciada comienza a partir del nucleótido 1603961 (↓) y el último nucleótido secuenciado es 1606851 (↑). Los cebadores SQ1 a SQ7 se usaron para secuenciar la cepa RS303. Estos cebadores se usaron para preparar los productos PCR que se secuenciaron con los mismos cebadores. La secuencia que corresponde a (cebadores F) o complementaria con (cebadores R) los cebadores usados en la amplificación de productos PCR se subraya. Los cebadores A a F usados en las reacciones SOE se marcan con una línea discontinua por encima de la línea. Los codones de comienzo de los genes *sigG* y *cat* se escriben en cursiva, el codón final del gen *sigG* se indica con (\*FIN) y el codón final del gen *cat* con (\*). Los nucleótidos individuales que difieren de las secuencias del banco génico están doblemente subrayados. Después de la supresión, los 38 primeros nucleótidos y los 65 últimos nucleótidos permanecen en el gen *sigG*. Después del gen *cat* insertado, una región de solapamiento de 21 nucleótidos de larga se repite de manera que tiene la misma secuencia que en el principio del gen *sigG*.

Las diferencias con la secuencia publicada de *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) se encontraron en la secuenciación. Se obtuvieron las mismas diferencias de secuencia, cuando las regiones flanqueadoras del gen *sigG* del cromosoma de la cepa salvaje 168 se secuenciaron. Las diferencias en la secuencia se marcan en la secuencia en la región de supresión en la Figura 2. Las regiones homólogas usadas en la integración fueron, sin embargo, idénticas con la secuencia que resulta de la cepa salvaje *B. subtilis* 168.

#### Efecto de la supresión del gen *sigG* en la esporulación

El efecto de la supresión de *sigG* en la esporulación se ensayó desarrollando la cepa *B. subtilis* con *sigG* eliminada RS303 en un medio de esporulación y tratando térmicamente las células vegetativas a +85°C. La estabilidad de la supresión se monitorizó desarrollando RS303 bajo presión de selección (cloranfenicol 5 µg/ml de cultivo SS) y sin selección. Después del tratamiento térmico, las células se pusieron en placas en placas LB. La cepa salvaje 168 se usó como la cepa de control y se trató de una manera correspondiente. El cultivo de cepa salvaje 168 tuvo 2,1x10<sup>8</sup> esporas por mililitro. RS303 no produjo ninguna espora (Tabla 3). No se produjeron esporas cuando se desarrollaron células RS303 sin selección en cultivo SS. Se puede concluir a partir de esto que la supresión del gen *sigG* evita la esporulación de la bacteria y que la supresión de *sigG* es estable.

Tabla 3. Efecto del gen *sigG* en la esporulación

|                  | <i>B. subtilis</i> 168 | RS303             | RS303             |
|------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| Medio de cultivo | SS                     | SS + Cm           | SS                |
| Células/ml       | 3,9x10 <sup>8</sup>    | 1x10 <sup>8</sup> | 8x10 <sup>7</sup> |
| Esporas/ml       | 2,1x10 <sup>8</sup>    | 0                 | 0                 |

#### Construcción del plásmido de producción, pRSH10, de β-lactamasa

La secreción de una proteína extraña al medio de cultivo se ensayó insertando el gen de β-lactamasa de la bacteria *B. licheniformis* 749/C en el vector de secreción pKTH141 (Lundström, 1985). En el vector, la secreción de la proteína extraña se controla por el promotor α-amilasa y la secuencia de señalización de *B. amyloliquefaciens*. Un fragmento deseado de una región que codifica la proteína extraña puede insertarse en el sitio de clonación *HindIII* en el marco de lectura correcto con la secuencia de señalización, por lo cual la proteína se secreta en el medio de cultivo. La inserción se hizo como se describe brevemente en lo siguiente: se aisló ADN cromosómico (Marmur, 1961) de la bacteria *Bacillus licheniformis* 749/C y se usó como un iniciador en una reacción PCR. Un producto PCR de 817 pares de bases de largo se amplificó a partir del iniciador con cebadores PEL-141 F (Sec. ID núm. 7) y PEN-141R (Sec. ID núm. 8), conteniendo el producto una región que codifica la denominada exopenicilinas pequeña que corresponde a los nucleótidos 129 a 921 de la secuencia GenBank V00093 (y aminoácidos 43 a 307 de la secuencia de Prot suiza P00808). La mezcla de reacción PCR de 100 µl que contenía 10 ng de iniciador de ADN, cebador 0,3 µM, dNTP 0,2 mM, 10 µl de tampón de enzima del fabricante, 1,5 µl de enzima Expand (3,5 U/µl, Boehringer Mannheim). El programa PCR comprendió un calentamiento inicial de 4 min a 94°C, después 28 veces de 40 s a 94°C, 20 s a 50°C, 1 min a 72°C, y finalmente 5 min a 72°C. El producto PCR obtenido se purificó e insertó por medio de los sitios de restricción *HindIII* añadidos a los cebadores en pKTH141 para obtener así el plásmido de producción pRSH10. La región que codifica la β-lactamasa del plásmido pRSH10 se secuenció y la secuencia no difirió de la secuencia del banco génico. *B. subtilis* 168 y RS303 se transformaron (Gryczan *et al.*, 1978) con pRSH10 para obtener cepas bacterianas RS201 y RS310, respectivamente.

Efecto de la supresión del gen *sigG* en la no esporulación y estabilidad de la supresión en la cepa de sobreproducción de  $\beta$ -lactamasa

Transformar la cepa competente, no esporulante, RS303 con el vector de producción pRSH10 produjo la cepa de producción RS310. La supresión del gen *sigG* no afectó a la competencia de la bacteria. La esporulación de la nueva cepa de producción y la estabilidad del gen *sigG* se monitorizaron por desarrollo de la cepa RS310 en un medio de esporulación sin selección de cloranfenicol. El desarrollo de la esporulación se monitorizó adicionalmente durante varios ciclos de crecimiento inoculando de nuevo un cultivo de 24 h en el medio SS. Un ciclo de crecimiento se refiere en esta memoria a un cultivo de 24 h que se inoculó 1:100 a un nuevo medio de esporulación. La esporulación se monitorizó durante tres ciclos de crecimiento. Las células se tomaron de los cultivos I y III para tratamiento térmico. Después del tratamiento térmico, las células se pusieron en placas en placas LB o placas LB cloranfenicol.

En los cultivos, la cepa salvaje 168 produjo  $2,8 \times 10^8$  esporas de promedio. La cepa de supresión RS310 no produjo ninguna espóra (Tabla 4). El hecho de que la no esporulación permaneciese en la cepa RS310 cuando las células se desarrollaron en medio SS sin selección de cloranfenicol se consideró un indicador de estabilidad. El número de células vegetativas en las placas LB selectivas (cloranfenicol 5  $\mu\text{g/ml}$ ) permaneció además igual que el de las células en las placas LB. El ensayo mostró que la construcción de la supresión y la inserción del gen *cat* son estables.

Tabla 4. Efecto de la supresión del gen *sigG* en la esporulación y estabilidad de la supresión en la cepa de producción RS310

| RS310                  |                   |                   | B. subtilis 168 |                   |                   |
|------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Células vegetativas/ml |                   |                   | Esporas/ml      | Células/ml        | Esporas/ml        |
| Cultivo                | LB                | LB+Cm             | LB              | LB                | LB                |
| I                      | $1,4 \times 10^8$ | $1,1 \times 10^8$ | 0               | $6 \times 10^8$   | $3,3 \times 10^8$ |
| II                     | $2,7 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^8$ | 0               | $5,9 \times 10^8$ | $4,5 \times 10^8$ |
| III                    | $2,0 \times 10^8$ | $6,0 \times 10^7$ | 0               | $2,3 \times 10^8$ | $7,1 \times 10^7$ |

La Tabla 5 muestra el número de células vegetativas y células esporulantes en un segundo cultivo, en que la esporulación de la cepa RS310 se monitorizó. Esta vez, el número de células vegetativas se determinó en cultivos RS310 en placas que tenían un menor contenido de cloranfenicol. Reduciendo la cantidad de cloranfenicol en el medio, la presión de selección se redujo, ya que con mayor concentración de cloranfenicol en las placas, el crecimiento de la bacteria fue muy lento. Las colonias permanecieron pequeñas y todas las células vegetativas posiblemente no se revelaron. De esta manera para obtener un resultado más comparable, la selección se redujo en las placas a 1  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol. El número de células vegetativas en las placas de cloranfenicol permaneció ahora igual que en las placas LB. La cepa salvaje 168 usada como la cepa de control produjo  $3,5 \times 10^8$  esporas/ml de promedio. RS310 no esporuló en los cultivos. Así, estos resultados muestran bien, también, el efecto de la supresión del gen *sigG*. La cepa de producción es completamente no esporulante y muy estable.

Tabla 5. Efecto de la supresión del gen *sigG* en la esporulación y estabilidad de la supresión en la cepa de producción RS310

| RS310                  |                   |                   | B. subtilis 168 |                   |                   |
|------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Células vegetativas/ml |                   |                   | Esporas/ml      | Células/ml        | Esporas/ml        |
| Cultivo                | LB                | LB+Cl             | LB              | LB                | LB                |
| I                      | $1,3 \times 10^8$ | $1,3 \times 10^8$ | 0               | $4 \times 10^8$   | $3,6 \times 10^8$ |
| II                     | $1,6 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^8$ | 0               | $4,7 \times 10^8$ | $4,5 \times 10^8$ |
| III                    | $3,8 \times 10^8$ | $5,6 \times 10^8$ | 0               | $4,5 \times 10^8$ | $2,4 \times 10^8$ |

#### Producción de $\beta$ -lactamasa de cepa no esporulante

La producción de  $\beta$ -lactamasa (BLP) de la nueva cepa bacteriana no esporulante, RS310, se comparó con el nivel de producción de  $\beta$ -lactamasa en la cepa salvaje 168 que se transformó con el plásmido de producción pRSH10, es decir, en la cepa RS201. La producción de  $\beta$ -lactamasa se monitorizó en un cultivo con agitación de 100 ml. La actividad  $\beta$ -lactamasa de la disolución de cultivo se midió por espectrometría según el método desarrollado por O'Callaghan *et al.* (1972) usando un sustrato cromogénico, nitrocefina. El cambio en la absorbancia a 486 nm se convirtió en la unidad de actividad BU: 1  $\mu\text{mol}$  degradado de bencilpenicilina por hora, 30°C, usando un coeficiente determinado experimentalmente 26,3. Las unidades de actividad, a su vez, se convirtieron en unidades de  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -lactamasa/ml usando la actividad específica de  $\beta$ -lactamasa de 340 BU/ $\mu\text{g}$  de proteína (Simons *et al.*, 1978). Un medio LB concentrado con kanamicina 10  $\mu\text{g/ml}$  como la selección se usó como el medio de cultivo. Se inocularon

0,1 ml de células en etapa logarítmica en 100 ml de disolución de cultivo y las células se desarrollaron en una botella con agitación de 2 l (+37°, 250 rpm). El crecimiento se monitorizó durante 25 horas midiendo la opacidad (OD<sub>600nm</sub>). Los resultados se muestran en la Figura 3. Las cepas bacterianas RS310 y RS201 tenían una tasa de crecimiento similar a la etapa de crecimiento logarítmico y el mayor valor OD<sub>600nm</sub> se alcanzó a las 11 horas. Las disoluciones de cultivo para ambas cepas tuvieron entonces aproximadamente 250 µg/ml de β-lactamasa. Después de 11 horas, la densidad bacteriana empezó a disminuir y al final del cultivo el valor OD<sub>600nm</sub> de la cepa RS310 fue 7,6 y el de la cepa RS201 8,1. Sin embargo, la cantidad de β-lactamasa en la disolución de cultivo aumentó y fue al final del cultivo de 430 µg/ml para la nueva cepa de producción no esporulante RS310 y para la cepa RS201 380 µg/ml. Además, el efecto de la supresión del gen *sigG* en el perfil de las proteínas secretadas en el caldo de cultivo se examinó por medio de una marcha en gel SDS-PAGE, y no se detectó diferencia en los geles coloreados de azul Coomassie (15% de acrilamida) entre la cepa no esporulante y la cepa salvaje. En base a los resultados obtenidos, la supresión del gen *sigG* no parece molestar al crecimiento bacteriano o la producción de proteínas secretadas.

## Referencias

Biswas, I., A. Gruss, S.D. Ehrlich y E. Maguin. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175:3628-3635.

Ehrlich, S.D. 1978. DNA cloning in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1433-6.

Ferrari, E. y J.A. Hoch. 1989. Genetics. In: *Bacillus*, Biotechnology handbooks; v. 2. C. Harwood (ed.). Plenum Press, Nueva York. Una división de Plenum Publishing corporation. Nueva York.) pp. 57-72.

Fougler, D. y J. Errington (1989) The role of the sporulation gene *spoIIIE* in the regulation of prespore-specific gene expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 3:1247 - 1255.

Gryczan, T.J., S. Contente, D. Dubnau. 1978. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* 134:318-329.

Haldenwang, W. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59:1-30.

Harwood, C. R. y S. M. Cutting (edit.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. 1991. Wiley-Interscience Publications.

Horinouchi S. y B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150:815-825.

Horton, Robert M., Henry D. Hunt, Steffan N. Ho, Jeffrey K. Pullen y Larry R. Pease. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77:61-68.

Illing N., Young M. y Errington J., 1990. Use of Integrational Plasmid Excision to Identify Cellular Localization of Gene Expression during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172:6937-6941.

Ishii, T., K. Yoshida, G. Terai, Y. Fujita y K. Nakai. 2001 DBTBS: a database of *Bacillus subtilis* promoters and transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 29: 278 - 280.

Izui, K., J.B.K. Nielsen, M.P. Gaulfield y J.O. Lampen. 1980. Large exopenicillinase, initial extracellular form detected in growths of *Bacillus licheniformis*. *Biochemistry* 19:1882-1886.

Karmazyn-Campbell, C., Bonamy, C., Savelli, B. y Stragier, P. 1989. Tandem genes encoding σ-factors for consecutive steps of development in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 3:150-157.

Khasanov, F.K., D.J. Zvingila, A.A. Zainullin y A.A. Prozorov. 1992. Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology. *Mol. Gen. Genet.* 234:494-497.

Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 20 Nov. de 1997; 390 249-256

Lundström, K. 1985. Expression of viral membrane protein genes in *Bacillus subtilis*. Ph.D. Thesis, Universidad de Helsinki, 1985.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3:208-218.

McPherson, M.J. y S.G. Møller. 2000. PCR: the Basics. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

O'Callaghan C.H, A. Morris, S.M. Kirby y A.H. Shingler. 1972. Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1:283-288.

- Pedraza-Reyes M., Gutierrez-Corona F. y Nicholoso W L. 1994. Temporal regulation and forespore-specific expression of the spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA polymerase during *Bacillus subtilis* sporulation. *J. Bacteriol.* 176:3983-9193.
- 5 Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Simons K., M. Sarvas, H. Garoff y A. Helenius. 1978. Membrane-bound and secreted forms of penicillinase from *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Biol.* 126: 673-690.
- 10 Stragier, P. y Losick, R. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 30: 297-341.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

|    |                                                                     |    |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
|    | <110> Terapias Ipsat oy                                             |    |
| 5  | <120> Bacillus subtilis no esporulante, preparación y uso del mismo |    |
|    | <130> 2011121FI                                                     |    |
|    | <160> 9                                                             |    |
| 10 | <170> PatentIn versión 3.1                                          |    |
|    | <210> 1                                                             |    |
|    | <211> 28                                                            |    |
| 15 | <212> ADN                                                           |    |
|    | <213> Bacillus subtilis                                             |    |
|    | <400> 1                                                             |    |
| 20 | ccggaattcg ctgtcggcag atggagag                                      | 28 |
|    | <210> 2                                                             |    |
|    | <211> 38                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 25 | <213> Bacillus subtilis                                             |    |
|    | <400> 2                                                             |    |
| 30 | gtatccaccc cgcagatttc gactttattt ctgcacac                           | 38 |
|    | <210> 3                                                             |    |
|    | <211> 38                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 35 | <213> Bacillus subtilis                                             |    |
|    | <400> 3                                                             |    |
| 40 | gaaatctgog ggggtggatac cggcaatag ttacocct                           | 38 |
|    | <210> 4                                                             |    |
|    | <211> 38                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                          |    |
| 45 | <220>                                                               |    |
|    | <223> combinación de fragmentos de B. subtilis                      |    |
|    | <400> 4                                                             |    |
| 50 | gtatccaccc cgcagatttc ccttctcaa ctaacggg                            | 38 |
|    | <210> 5                                                             |    |
|    | <211> 38                                                            |    |
|    | <212> ADN                                                           |    |
| 55 | <213> Secuencia artificial                                          |    |
|    | <220>                                                               |    |
|    | <223> combinación de fragmentos de B. subtilis                      |    |
| 60 | <400> 5                                                             |    |
|    | gaaatctgog ggggtggatac ctcaagcgca ggtgtcca                          | 38 |
|    | <210> 6                                                             |    |
| 65 | <211> 28                                                            |    |

<212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
  
 <400> 6  
 5      cgggaattcg caccocctagg atgaatct 28  
  
 <210> 7  
 <211> 32  
 10     <212> ADN  
       <213> Bacillus licheniformis  
  
       <400> 7  
  
 15     gcgcaagctt ocaagacgga gatgaaagat ga      32  
  
       <210> 8  
       <211> 33  
       <212> ADN  
 20     <213> Bacillus licheniformis  
  
       <400> 8  
  
       gcggaagctt tattggcgt tcatgtttaa ggc      33  
 25  
       <210> 9  
       <211> 3248  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 30  
       <220>  
       <223> Región de supresión de B. subtilis RS303 que comprende la secuencia cat  
  
       <400> 9  
 35

|             |            |            |            |             |             |      |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| cgattatgac  | aaaagaagaa | atgatttctg | cagataaatg | tttaatcggg  | atcagcacia  | 60   |
| caaagctgtc  | ggcagatgga | gagtttgacg | cgattattca | tccgaaaatg  | ctttcgggca  | 120  |
| aggctgtcaa  | acacgtttca | taatgttcgc | aatgtccgt  | tacttatcat  | actcaaacgg  | 180  |
| cgtgacattt  | agaagggaga | ggaagatgaa | aaaactgaaa | ttacggttga  | cgcacctctg  | 240  |
| gtataagctg  | ctgatgaaac | ttgggctgaa | aagtgatgaa | gtctattaca  | taggcgggag  | 300  |
| tgaagccctg  | ccgcctccat | tatctaaaga | tgaggagcag | gttttgtaa   | tgaagctccc  | 360  |
| aaacggcgat  | caggcggcgc | gcgccattct | aattgaacgc | aatttgcgtc  | tggtcgtata  | 420  |
| tatcgcccgt  | aaatttgaaa | atacgggaat | taatatagag | gatttaataca | gcatcggtag  | 480  |
| catcgggtcta | atcaaagctg | ttaatacatt | taatccagaa | aagaaaatca  | agcttgctac  | 540  |
| ctatgcctcc  | cggtgtatag | aaaatgaaat | cctgatgtat | ttaagaagaa  | ataacaaaat  | 600  |
| ccgttcagag  | gtttcctttg | atgaaccgct | taatattgat | tgggacggca  | atgagctttt  | 660  |
| gctttctgat  | gtgctcggca | ctgacgatga | catcatcact | aaagacatag  | aagctaactg  | 720  |
| cgataaaaag  | cttttgaaaa | aagcgcttga | acagcttaat | gagagagaaa  | agcaaatcat  | 780  |
| ggagctgcgg  | tttgggcttg | tcggtgaaga | agaaaaaac  | caaaaggatg  | tagcggatat  | 840  |
| gatggggatt  | tctcagtcct | atatttcgcg | gcttgagaaa | agaattataa  | aaaggttgag  | 900  |
| aaaagagttc  | aacaaaatgg | tgtaaaaaat | tttatggtta | gaacccttg   | attttacagg  | 960  |
| gatttcctga  | tttcgacagt | ttttcgggtc | gagtgagtg  | catatttttc  | ccaccaagg   | 1020 |
| agatacttaa  | cgttgtacag | cagctcctgt | agggagggaa | aaaagtgtcg  | agaaataaag  | 1080 |
| tcgaaatctg  | cggggtggat | acccggcaat | agttaccctt | attatcaaga  | taagaaagaa  | 1140 |
| aaggattttt  | cgctacgctc | aaatccttta | aaaaaacaca | aaagaccaca  | ttttttaatg  | 1200 |
| tggtctttta  | ttcttcaact | aaagcaccca | ttagttcaac | aaacgaaaat  | tggtataaagt | 1260 |
| gggatatttt  | taaaatatat | atttatgtta | cagtaatat  | gacttttaaa  | aaaggattga  | 1320 |
| ttctaatagaa | gaaagcagac | aagtaagcct | cctaaattca | ctttagataa  | aaatttagga  | 1380 |

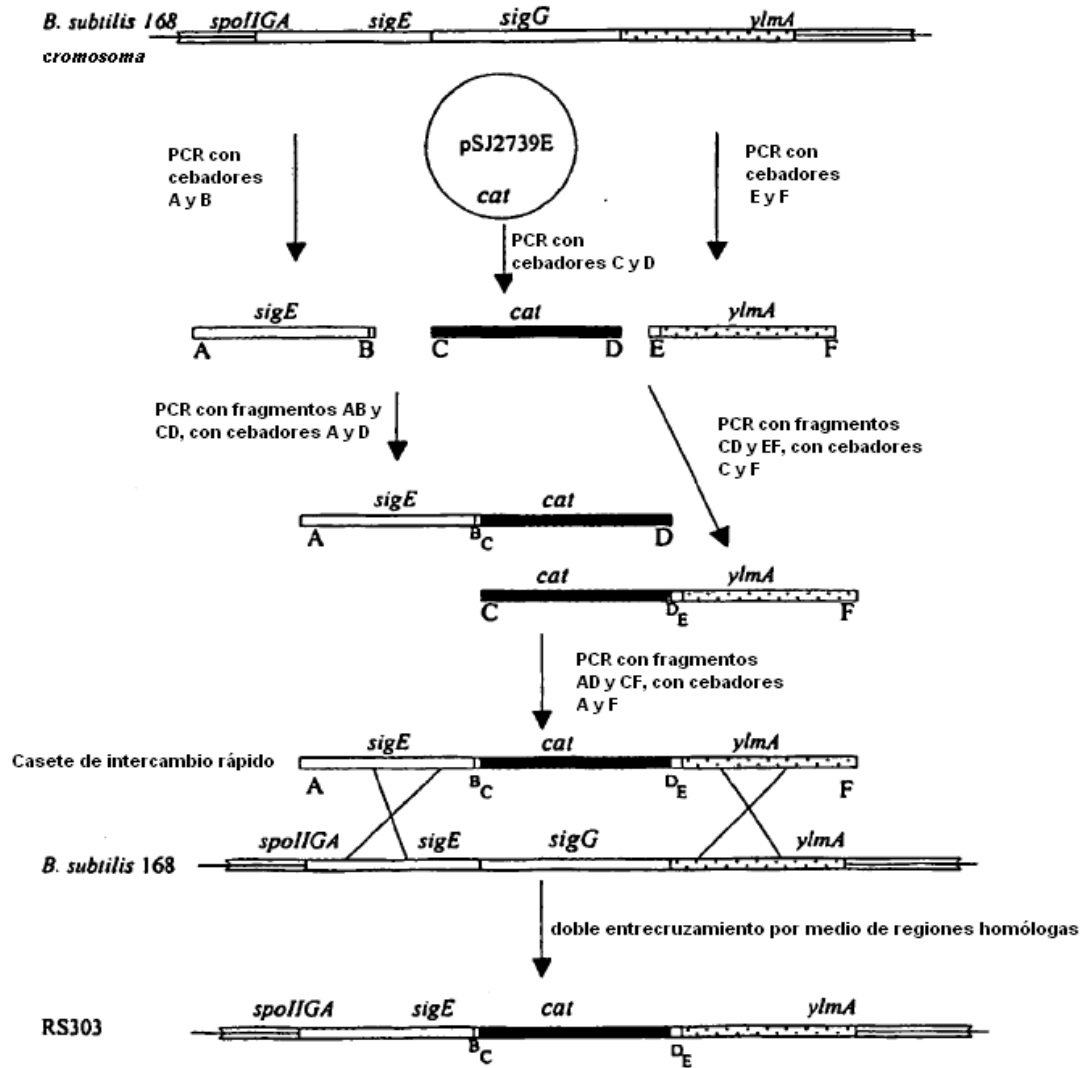
|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ggcatatcaa atgaacttta ataaaattga tttagacaat tggaagagaa aagagatatt   | 1440 |
| taatcattat ttgaaccaac aaacgacttt tagtataacc acagaaattg atattagtgt   | 1500 |
| tttataccga aacataaaac aagaaggata taaattttac cctgcattta ttttcttagt   | 1560 |
| gacaaggggtg ataaactcaa atacagcttt tagaactggt tacaatagcg acggagagtt  | 1620 |
| aggttatttg gataagttag agccacttta tacaattttt gatggtgtat ctaaaacatt   | 1680 |
| ctctgggtatt tggactcctg taaagaatga cttcaaagag ttttatgatt tatacctttc  | 1740 |
| tgatgtagag aaatataatg gttcggggaa attgtttccc aaaacaccta tacctgaaaa   | 1800 |
| tgctttttct ctttctatta ttccatggac ttcattttact gggtttaact taaatatcaa  | 1860 |
| taataatagt aattaccttc taccattat tacagcagga aaattcatta ataaaggtaa    | 1920 |
| ttcaatatat ttaccgctat ctttacaggt acatcattct gtttgtgatg gttatcatgc   | 1980 |
| aggattgttt atgaactcta ttcaggagtt gtcagatagg cctaatagact ggcttttata  | 2040 |
| atatgagata atgccgactg tactttttac agtcggcttt ctaatgtcac taacctgccc   | 2100 |
| cgttagtgtga agaagggaaa tctgcggggt ggatacctca agcgcagggtg tccagacttg | 2160 |
| aaaaagcggc tatcaaaca atgaataaaa atattcatca ataataaaaa gccttttaaaa   | 2220 |
| cgatgttgtt ttaaaggctt ttctattgat tatggatggt ttacgttttg gaaaaagtaa   | 2280 |
| ggatccttag ttcgtacaaa gttttatgaa aattaaaaca attataaaaag gcaataaaga  | 2340 |
| ggaggaccac gatgattttg cagcttgaca atgtctcact aaaacggaat gggaaatgga   | 2400 |
| tactgaaaga tattcattgg aagggtgaag aaaaggaaaa ttgggtgctt tacggcctaa   | 2460 |
| atggcgccgg gaagacagcg ctgttaaata tgctttgctc atattatttt ccaacatcag   | 2520 |
| gcgagatgca ggtgctcggc catgaatttg gcaaaacaga gcttggggaa aagctcagac   | 2580 |
| gtaaaatttg cctcgtctca gcagctcttc agcaaaaatt gtatccggca gattcagctt   | 2640 |
| ttgaaattgc tttgagcgga gcttacgctt cgattgggtt atatgaaacg ccaagtaagg   | 2700 |
| aaaccagggg aaaagcgata ggtttgtag aggacttggg agcaattgaa tatgccgatc    | 2760 |
| gccgctatga aaccctttct caaggggaaa aacaaagagc attgattgct agagcactaa   | 2820 |
| tggccgatcc ggagctgctg atactggatg aaccagtcac aggactggat tttattgccc   | 2880 |
| gggaaaagct gttagatacg attacataca ttgcaaaca agaaaatgca ccatctatcc    | 2940 |
| tttatgtgac tcatcatgct gaagaaattt tgctgtctt tgataaagcc cttttattaa    | 3000 |
| aacagggaga ggtttttgga tccggagaaa taaaggaaat gcttactgat caaatacttt   | 3060 |
| ccgctttttt tgatacgcca atccatgtat tatggaatca ggatcggccg tttttaacaa   | 3120 |
| gagctgagcc gataacgaat gcctgacaaa tatatataga ttcattcctag ggggtgcttg  | 3180 |
| cgaagctgag agagactttg tctcaaccct tttgacctga tctggatcat gccagcggag   | 3240 |
| ggaagcgg                                                            | 3248 |



## REIVINDICACIONES

1. Una cepa no esporulante de *Bacillus subtilis*, caracterizada por que comprende:  
una supresión de al menos 300 nucleótidos en su gen *sigG*, por lo cual la supresión comprende al menos parte de  
5 ambas regiones funcionales del gen *sigG* que codifican los aminoácidos 67 a 80 o 229 a 248, respectivamente, de la  
proteína *sigG*, y que dicha cepa tiene la capacidad de producir un polipéptido recombinante.
2. La cepa *B. subtilis* según la reivindicación 1, en donde el polipéptido recombinante es beta-lactamasa.
3. La cepa *B. subtilis* según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la supresión comprende al menos 600  
nucleótidos del gen *sigG*.
- 10 4. La cepa *B. subtilis* según la reivindicación 3, caracterizada por que la supresión comprende al menos 670  
nucleótidos del gen *sigG*.
5. La cepa *B. subtilis* según la reivindicación 4, caracterizada por que la supresión comprende el gen *sigG* entero.
6. Un método para la preparación de una cepa de *Bacillus subtilis* no esporulante, caracterizado por que al menos  
300 nucleótidos se eliminan del gen *sigG* de una cepa de *Bacillus subtilis*, por lo que la supresión comprende al  
15 menos parte de ambas regiones funcionales del gen *sigG* que codifican los aminoácidos 67 a 80 o 229 a 248,  
respectivamente, de la proteína *sigG*, y se inserta ADN que codifica un polipéptido recombinante, por lo que dicha  
cepa tiene la capacidad de producir un polipéptido recombinante.
7. El método según la reivindicación 6, en donde el polipéptido recombinante es beta-lactamasa.
8. El método según la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que al menos 600 nucleótidos se eliminan del gen *sigG*.
9. El método según la reivindicación 8, caracterizado por que al menos 670 nucleótidos se eliminan del gen *sigG*.
- 20 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 - 9, caracterizado por preparar por medio de técnica SOE  
una inserción que contiene las regiones flanqueadoras de la región génica a suprimir y un gen marcador de  
selección, transformar la cepa *B. subtilis* a eliminar con la inserción, y después seleccionar los transformantes, en  
donde la inserción se ha integrado en el cromosoma de la bacteria de tal manera que la región génica deseada se  
ha eliminado.
- 25 11. El método según la reivindicación 10, caracterizado por preparar por medio de técnica SOE una inserción de  
ADN lineal que contiene el gen marcador de selección entre las regiones flanqueadoras de la región génica a  
eliminar, transformar la cepa *B. subtilis* a eliminar con la inserción, y después cribar los transformantes, en donde la  
inserción se ha integrado como resultado de una recombinación doble de homólogos, por lo que la región génica  
deseada se ha eliminado.
- 30 12. El método según la reivindicación 11, caracterizado por que la técnica SOE usa cebadores que tienen regiones  
de solapamiento de al menos aproximadamente 20 nucleótidos de largo.
13. El método según la reivindicación 12, caracterizado por que usa una inserción de ADN lineal que tiene antes del  
gen marcador de selección una región de solapamiento de al menos 20 nucleótidos de largo que se repite después  
del gen marcador de selección.
- 35 14. El método según la reivindicación 12 o 13, caracterizado por que usa una inserción de ADN lineal en que la  
región flanqueadora corriente arriba de la región a eliminar, el gen marcador de selección, y la región flanqueadora  
corriente abajo de la región a eliminar son todas de esencialmente la misma longitud.
15. El método según la reivindicación 14, caracterizado por que usa una inserción de ADN lineal que tiene una  
longitud de aproximadamente 3 kb.
- 40 16. El uso de la cepa no esporulante de *Bacillus subtilis* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como un  
organismo de producción para producir polipéptido recombinante.
17. El uso según la reivindicación 16, caracterizado por que la cepa no esporulante de *Bacillus subtilis* se usa para  
producir beta-lactamasa.
- 45 18. Un método para la preparación de un polipéptido recombinante, caracterizado por que el polipéptido se prepara  
usando la cepa no esporulante de *Bacillus subtilis* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y se recupera el  
polipéptido recombinante formado.
19. El método según la reivindicación 18, caracterizado por que se prepara beta-lactamasa.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

SQ1-F->

1603939 -TGCCTTAAACCGGATCAGCTAA

↓

CGATTATGACAAAAGAAGAAATGATTTCTGCAGATAAATGTTTAAATCGGTATCAGCACAA  
 A----->

CAAAGCTGTTCGGCAGATGGAGAGTTTGACGCGATTATTCATCCGAAAATGCTTTCGGGCA  
 AGGCTGTCAAACACGTTTCATAATGTTGCAAAATGTCGGTTACTTATCATACTCAAACGG  
 CGTGACATTTAGAAGGAGAGGAAGATGAAAAAAGTGAAGTCTATTACATAGGCGGAG  
 GTATAAGCTGCTGATGAACTTGGGCTGAAAAGTGAAGTCTATTACATAGGCGGAG  
 TGAAGCCCTGCCGCTCCATTATCTAAGATGAGGAGCAGGTTTGTAAAGAAAGCTCCC  
 AAACGGCGATCAGGCGGCGCGCCATTCTAATTGAACGCAATTTCGCTCTGGTCTGTATA  
 TATCGCCCGTAAATTTGAAAAATACGGGAATTAATATAGAGGATTTAATCAGCATCGGTAC  
 CATCGGTCTAATCAAAGCTGTTAATACATTAAATCCAGAAAAGAAAAACAAGCTTGCTAC  
 CTATGCTCCCGGTGTATAGAAAATGAAATCCTGATGTATTTAAGAAAGAAATACAAAAT  
 CCGTTTCAAGAGTTTCCTTTGATGAACCGCTTAATATTGATTGGGACGGCAATGAGCTTTT  
 GCTTTCTGATGTGCTCGGCCTGACGATGACATCATCAATAAGACATAGAAGCTAACGT  
 CGATAAAAAGCTTTTGA AAAAAGCGCTTGAACAGCTTAATGAGAGAGAAAAGCAAATCAT

SQ3-F->

GGAGCTGCGGTTTTCGGCTTGTGCGTGAAGAAGAAAAACCCAAAAGGATGTAGCGGATAT  
 GATGGGATTTCTCAGTCTTATTTTCGGCGCTTGAGAAAAGAAATTA AAAAGGTTGAG  
 AAAAGAGTTCAACAAAATGGTGTAAAAAATTTATGGTTAGAACCCTTGATTTTACAGG  
 GATTTCTGATTTTCGACAGTTTTCGGTCTGAGTGCAGTGCATATTTTCCACCCAAGG

-<-SQ2-R 1605025

sigG

AGATACTTAACTGTACAGCAGCTCCTGTAGGAGGAAAAAGTGTGCGAGAAATAAAG  
 C-----> <-----

TCGAAATCTGCGGGTGGATACCGGCAATAGTTACCTTATTATCAAGATAAGAAAGAA  
 -----B

AAGGATTTTTCGCTACGCTCAAACTCCTTAAAAAACACAAAAGACCACATTTTAAATG  
 TGGTCTTTTATTCTTCAACTAAAGCACCATTAGTTCAACAAACGAAAATGGATAAAGT  
 GGGATTTTAAAAATATATTTATGTTACAGTAATATTGACTTTTAAAAAAGGATTGA  
 TTCTAATGAAGAAGCAGACAAGTAAGCCTCCTAAATTCATTTAGATAAAAATTTAGGA  
 cat

GGCATATCAAATGAATTTAATAAAATGATTTAGACAATTGGAAGAGAAAAAGATATT  
 TAATCATTATTTGAACCAACAAACGACTTTTAGTATAACCAACAGAAATTGATATTAGTGT  
 TTTATACCGAAACATAAAACAAAGGATATAAATTTTACCCTGCATTTATTTCTTAGT  
 GACAAGGGTGATAAACTCAAATACAGCTTTTAGAACTGGTTACAATAGCGAGGAGATT  
 AGGTTATTGGGATAAGTTAGAGCCACTTTATACAAATTTTGGATGGTGTATCTAAACATT  
 CTCTGGTATTTGGACTCCTGTAAAGAATGACTTCAAAGAGTTTATGATTATACCTTTTC  
 TGATGTAGAGAAATATAATGGTTTCGGGAAATTTGTTCCCAAAACACCTATACCTGAAAA

SQ5-F->

TGCTTTTCTCTTTCTATTATTCTCATGGACTTCATTTACTGGGTTTAACTTAAATATCAA

TAATAATAGTAATTACCTTCTACCCAATTATTACAGCAGGAAAAATTCATTATAAAGGTAA

-<- SQ4-R

TTCAATATATTTACCGCTATCTTTACAGGTACATCATCTGTTTGTGATGGTTATCATGC  
 AGGATGTGTTTATGAACCTCTATTTCAGGAGTTGTGATAGGCCTAATGACTGGCTTTTATA

ATATGAGATAATGCCGACTGTACTTTTACAGTCCGCTTTCTAATGTCACTAACCTGCC  
 E-----> <-----

CGTTAGTTGAAGAAGGAAATCTGCGGGTGGATACCTCAAGCGCAGGTGCCAGACTTG  
 -----D

AAAAAGCGGCTATCAACAAATGAATAAAAAATTTTCATCAATATGAAAAGCCTTTAAAA

\* FIN

CGATGTTGTTTTAAAGGCTTTTCTATTGATTATGGATGGTTTACGTTTGGAAAAAGTAA

SQ6-F->

GGTATCCTAGTTTCGTACAAAGTTTATGAAAATTA AAAACAAATTA AAAAGGCAATAAAGA  
 GGAGGACCAAGATGATTTTGCAGCTTGACAATGTCTCACTAAAACGGAATGGGAAATGGA  
 TACTGAAAGATATTCAATGGAAGGTGGAAGAAAGGAAAATGGGTGCTTTACGGCTTAA  
 ATGCGCGCGGGAAGACAGCGCTGTTAAATATGCTTTGCTCATATTATTTCCAACATCAG  
 GCGAGATCGAGGTGCTCGGCCATGAATTTGGCAAAACAGAGCTTGGGAAAAAGCTCAGAC  
 GTAAAATTTGGCCTCGTCTCAGCAGCTCTTCAGCAAAAATTTGATCCGGCAGATTGAGCTT  
 TTGAAATGCTTTGAGCGGAGCTTACGCTTCGATTGGGTTATATGAAACGCCAAGTAAGG  
 AAACCAGGGA AAAAGCGATAGGTTTGTAGAGGACTTGGGAGCAATTGAATATGCCGATC  
 GCCGCTATGAAACCTTTCTCAAGGGGAAAAACAAAGAGCATTGATTGCTAGAGCACTAA  
 TGGCCGATCCGGAGCTGCTGATACCTGGATGAACCAAGTCAAGGACTGGATTTTATTGCC  
 GGGAAAAGCTGTAGATACGATTACATACATTGCAACAAAGAAAAATGCACCATCTATCC  
 TTTATGTGACTCATATGCTGAAGAAATTTGCTGTCTTTGATAAAGCCCTTTTATTAA  
 AACAGGGAGAGGTTTGGATCCGGAGAAATAAAGGAAATGCTTACTGATCAAAATACCTT  
 CCGCTTTTGTATACGCCAATCCATGTATTATGGAATCAGGATCGGCCGTTTAAACAA  
 GAGCTGAGCCGATAACGAATGCTGACAAATATATAGATTCTCTAGGGGTCTTTG

-<-SQ7-R

↑

CGAAGCTGAGAGAGACTTTGTCTCAACCTTTTGACCTGATCTGGATCATGCCAGCGGAG  
 GGAAGCGGTGAAAAGCGGAGTACATCGGACTCC

**Fig. 3**