

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 843**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
C12P 19/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09742596 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2295563**

54 Título: **β -amilasa, gen que la codifica y procedimiento de preparación de la misma**

30 Prioridad:

08.05.2008 JP 2008122278

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

07.04.2016

73 Titular/es:

**AMANO ENZYME INC. (100.0%)
2-7 Nishiki 1-chome Naka-ku
Nagoya-shi, Aichi 460-8630, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUNAGA, AKIKO;
AMANO, HITOSHI y
YAMAGUCHI, SHOTARO**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 565 843 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

β -amilasa, gen que la codifica y procedimiento de preparación de la misma.

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a una nueva β -amilasa. Más en particular, la presente invención se refiere a una β -amilasa derivada de un microorganismo, un gen de la misma y un procedimiento de preparación de la misma.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Convencionalmente, se conocen β -amilasas de origen vegetal, por ejemplo, β -amilasas de soja, trigo, cebada, malta, batata y patata. Entre estas, la β -amilasa extraída y purificada de semillas como soja, trigo, cebada y malta se usa ampliamente en la industria para la preparación, por ejemplo, del jarabe que contiene maltosa usado en la producción de azúcar, en panadería y en cervecía. Entre las β -amilasas de origen vegetal, la β -amilasa derivada de soja tiene alta actividad enzimática y también una excelente termoestabilidad.

15

[0003] Por cierto, en los últimos años y debido al aumento de la demanda de bioetanol, el precio del maíz ha subido. En consecuencia, se ha pasado de cultivar soja o trigo a cultivar maíz. Por lo tanto, hay escasez de soja, trigo, cebada y similares y su precio está subiendo. En estas circunstancias, las materias primas de la β -amilasa son difíciles de obtener.

20

[0004] La β -amilasa es una enzima que actúa sobre polisacáridos, como almidón y glucógeno, que tienen glucosas unidas por enlaces α -1,4 como cadena principal y los degrada dando lugar a unidades de maltosa a partir del extremo no reductor. Tradicionalmente, se ha sabido que la β -amilasa se encuentra en plantas superiores como la soja y el trigo. Desde 1972, cuando se describió la presencia de una enzima con el mismo mecanismo de acción que la β -amilasa de plantas superiores también en microorganismos, se ha encontrado que un gran número de estos son productores de β -amilasa (documento no de patente 1).

25

30

[0005] Hasta la fecha, se han descrito *Bacillus* sp., por ejemplo, *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus stearothermophilus*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp. y similares como microorganismos productores de β -amilasa. Sin embargo, la mayoría de ellos tienen baja productividad y sólo unos pocos se han usado en la práctica.

35

[0006] Por otro lado, la amilasa producida por hongos filamentosos como *Aspergillus* sp., de tipo endoactivo, degrada la amilosa y la amilopectina. Por lo tanto, cuando se usa una amilasa de este tipo se producen glucosa, maltotriosa u otros oligosacáridos, además de maltosa. Además, la amilasa de este tipo tiene baja termoestabilidad y es menos práctica para la producción de maltosa.

40

[0007] *Bacillus stearothermophilus* sintetiza una enzima productora de maltosa con una gran termoestabilidad (véanse el documento de patente 1 y el documento no de patente 2). Esta enzima, de tipo exoactivo, produce maltosa, a partir del extremo no reductor del almidón, pero la maltosa producida es del tipo α . Además, esta enzima no hidroliza estrictamente en unidades de maltosa como la β -amilasa de origen vegetal. Es decir, se describe que en el momento inicial de la reacción, además de maltotetraosa (G4), maltotriosa (G3) y maltosa (G2), también se produce una pequeña cantidad de maltopentosa (G5) y maltohexosa (G6), y que esta enzima degrada la dextrina de Schardinger a maltosa y glucosa y descompone la maltotriosa en maltosa y glucosa. Como resultado, el producto de descomposición del almidón de esta enzima contiene del 6 al 8 % de glucosa. Por consiguiente, esta enzima no es adecuada para la preparación de jarabes de maltosa de alta pureza.

45

50

Lista de referencias

[Documentos de patente]

55 **[0008]** [Documento de patente 1] Publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar n.º S60-2185

[Documentos no de patente]

[0009]

[Documento no de patente 1] "Handbook of Industrial Sugar Enzyme," Kodansha Scientific, 1999

[Documento no de patente 2] H. Outtrup y B. E. Norman, Starch, vol. 12, páginas 405 a 411

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Problemas que ha de solucionar la invención

10 **[0010]** Según se menciona anteriormente, es difícil obtener un suministro estable de β -amilasa de origen vegetal que es la más usada en la actualidad. Además, la cantidad de enzima obtenida de las plantas está determinada de forma preliminar y la producción es limitada. Por otro lado, pocas de las β -amilasas derivadas de microorganismos se han usado en la práctica porque la productividad es baja o su producción a gran escala difícil.

Modo de solucionar el problema

15 **[0011]** A la vista de los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han llevado a cabo intensas investigaciones y, como resultado, han encontrado que *Bacillus flexus* o *Bacillus subtilis* producen una β -amilasa con una termoestabilidad comparable a la de la β -amilasa derivada de soja. Además, los presentes inventores han conseguido aislar y purificar la β -amilasa y determinar sus propiedades enzimáticas. También, los
20 presentes inventores han conseguido determinar la secuencia de bases de un gen que codifica la β -amilasa. Adicionalmente, han confirmado que es posible preparar la β -amilasa mediante un transformante en el que se ha introducido un vector que contiene el gen.

25 **[0012]** La presente invención se ha llevado a cabo sobre la base de los resultados mencionados anteriormente e incluye las realizaciones según se caracterizan en las reivindicaciones. La presente invención desvela lo siguiente:

[1] Una β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*.

[2] Una β -amilasa que presenta las propiedades enzimáticas siguientes:

- 30 (1) acción: actúa sobre el enlace glucosídico α -1,4 de polisacáridos y oligosacáridos para liberar maltosa;
- (2) especificidad de sustrato: actúa bien sobre almidón, amilosa, amilopectina, glucógeno, maltotetrosa, maltopentosa, maltohexosa y maltoheptosa, pero no actúa sobre pululano, dextrano, ciclodextrina ni maltotriosa;
- 35 (3) temperatura óptima: aproximadamente 55 °C
- (4) pH óptimo: aproximadamente 8,0;
- 40 (5) termoestabilidad: estable a 55 °C o menos (pH 5,0, 10 minutos);
- (6) estabilidad al pH: estable a pH 4-9 (30 °C, tres horas); y
- (7) peso molecular: aproximadamente 60.000 (SDS-PAGE).
- 45 **[3]** Una β -amilasa con una secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7 o una secuencia aminoacídica equivalente a dicha secuencia aminoacídica.
- [4]** La β -amilasa descrita en [3], en que la secuencia aminoacídica equivalente es una secuencia con
50 aproximadamente el 90 % o más de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7.
- [5]** Una preparación enzimática que incluye la β -amilasa descrita en uno cualquiera de [1] a [4] como principio activo.
- [6]** Un gen de β -amilasa que incluye ADN seleccionado del grupo que consta de los siguientes (A) a (C):
- 55 (A) un ADN que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7;
- (B) un ADN con la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6; y

(C) un ADN con una secuencia de bases equivalente a la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 y que tiene actividad de β -amilasa.

[7] Un vector recombinante que contiene un gen de β -amilasa descrito en [6].

5

[8] Un transformante en el que se introduce un gen de β -amilasa descrito en [6].

[9] Un procedimiento de preparación de β -amilasa, en que el procedimiento incluye las siguientes etapas (1) y (2) o las etapas (i) e (ii):

10

(1) el cultivo de un *Bacillus flexus* con capacidad de producir β -amilasa;

(2) la recogida de la β -amilasa a partir de la disolución de cultivo y/o de las células después del cultivo;

15 (i) el cultivo de un transformante descrito en [8] en condiciones en las que se produzca la proteína codificada por el gen; y

(ii) la recogida de la proteína producida.

20 [10] El procedimiento de preparación descrito en [9], en que el *Bacillus flexus* es una cepa especificada por el número de acceso NITE BP-548.

[11] Una cepa de *Bacillus flexus* especificada por el número de acceso NITE BP-548.

25 [12] Un procedimiento de preparación de maltosa, en que el procedimiento incluye dejar actuar la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus* sobre polisacáridos u oligosacáridos con glucosas unidas por enlaces α -1,4 como cadena principal.

30 [13] El procedimiento de producción descrito en [12], en que la β -amilasa es una β -amilasa descrita en uno cualquiera de [2] a [4].

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013]

35

La figura 1 es un gráfico que muestra la temperatura óptima de la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*.

La figura 2 es un gráfico que muestra el pH óptimo de la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*. •: tampón de ácido cítrico a pH 2, 3 y 4; □: tampón de Britton-Robinson a pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

40

La figura 3 es un gráfico que muestra la termoestabilidad de la β -amilasa de *Bacillus flexus*.

La figura 4 es un gráfico que muestra la estabilidad al pH de la β -amilasa de *Bacillus flexus*. •: tampón de ácido cítrico a pH 2, 3 y 4; □: tampón de Britton-Robinson a pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

45

La figura 5 muestra los resultados de SDS-PAGE de la β -amilasa purificada y de muestras durante la purificación. Carril 1: fraccionamiento con sulfato de amonio; carril 2: HiPrep Butyl 16/10 FF; carril 3: HiTrap CM FF; carril 4: HiLoad 16/60 Superdex200.

50 La figura 6 muestra la estructura del plásmido de expresión pET-BAF.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES

[0014] La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

55

(Términos)

[0015] El término "ADN que codifica una proteína" en la presente invención denota un ADN a partir del cual se obtiene la proteína cuando se expresa, es decir, un ADN que tiene una secuencia de bases correspondiente a la

secuencia aminoacídica de la proteína. Por lo tanto, también se tiene en cuenta la degeneración de codones.

[0016] En la presente memoria descriptiva, los términos “aislado” y “purificado” se usan de manera intercambiable. El término “aislada”, usado con respecto a la enzima de la presente invención (β -amilasa) que se deriva de un material natural, denota un estado en el que no hay presentes sustancialmente otros componentes distintos de la enzima (en particular, no hay presente sustancialmente ninguna proteína contaminante) en el material natural. Específicamente, en la enzima aislada de la presente invención, el contenido de proteína contaminante es, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 20 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 10 %, con mayor preferencia inferior a aproximadamente el 5 % y aún con mayor preferencia inferior a aproximadamente el 1 %, con respecto a la cantidad total en peso. Por otro lado, el término “aislada”, cuando la enzima de la presente invención se prepara por técnicas de ingeniería genética, denota un estado en el que sustancialmente no hay presentes otros componentes derivados de la célula hospedadora que se usa, la disolución de cultivo y similares. Específicamente, por ejemplo, en la enzima aislada de la presente invención, el contenido de componentes contaminantes es inferior al aproximadamente el 20 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 10 %, con mayor preferencia, preferentemente inferior a aproximadamente el 5 % y aún con mayor preferencia inferior a aproximadamente el 1 %, con respecto a la cantidad total en peso. A menos que se especifique lo contrario, cuando en esta memoria descriptiva se usa meramente el término “ β -amilasa”, se indica la “ β -amilasa en estado aislado”. E igualmente en caso de usar el término “la presente enzima” en lugar de β -amilasa.

[0017] El término “aislado”, usado en relación con el ADN, indica típicamente que el ADN está separado de otros ácidos nucleicos que coexisten en la naturaleza cuando el ADN existe originalmente en la naturaleza. Sin embargo, algunos de los otros componentes del ácido nucleico, tales como una secuencia de ácido nucleico próxima en la naturaleza (por ejemplo, la secuencia de una región promotora, una secuencia de terminación o similares) pueden estar incluidos. Por ejemplo, en el estado “aislado” del ADN genómico, preferentemente el ADN aislado no incluye sustancialmente otros componentes del ADN que coexisten en la naturaleza. Por otro lado, en el estado “aislado” del ADN preparado por técnicas de ingeniería genética, por ejemplo, una molécula de ADNc y similares, preferentemente el ADN no incluye sustancialmente componentes celulares, disolución de cultivo o similares. De manera similar, en el estado “aislado”, en el caso del ADN preparado por síntesis química, el ADN no incluye ningún precursor (una materia prima) o materiales químicos usados en la síntesis, por ejemplo, dNTP. A menos que se indique lo contrario, cuando en esta memoria descriptiva se usa meramente el término “ADN”, se indica el “ADN en estado aislado”.

(β -amilasa y microorganismo productor de la misma)

[0018] Un primer aspecto de la presente invención proporciona una β -amilasa (en adelante, denominada también “la presente enzima”) y el microorganismo productor de la misma. Según se muestra en el ejemplo mencionado más adelante, los presentes inventores han llevado a cabo intensas investigaciones y, como resultado, han encontrado que *Bacillus flexus* produce una β -amilasa termoestable. Además, los presentes inventores han conseguido aislar y purificar la enzima y también han conseguido determinar sus propiedades enzimáticas.

(1) Acción

[0019] La presente enzima es una β -amilasa y actúa sobre el enlace glucosídico α -1,4 en polisacáridos y oligosacáridos para liberar maltosa. La presente enzima apenas libera glucosa.

(2) Especificidad de sustrato

[0020] La presente enzima tiene una excelente especificidad de sustrato y actúa bien sobre almidón, amilosa, amilopectina, maltotetraosa, maltopentosa, maltohexosa y maltoheptosa. Por el contrario, la presente enzima no actúa sobre pululano, dextrano, ciclodextrina ni maltotriosa.

[0021] Cuando la presente enzima tiene una actividad relativa del 50 % o más con respecto a la actividad básica (100 %), que es el valor cuando se usa como sustrato un almidón soluble, se considera que el sustrato es un “sustrato sobre el que la enzima actúa bien”. De manera similar, cuando la actividad es inferior al 10 %, se considera que el sustrato es un “sustrato sobre el que la enzima no actúa”. La enzima no actúa sustancialmente sobre maltotriosa ni ciclodextrina (α , β o γ).

[0022] Ha de señalarse aquí que la reactividad y la especificidad de sustrato de la presente enzima pueden medirse y evaluarse por el procedimiento que se muestra en los ejemplos mencionados más adelante (véase la

columna del procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa).

(3) Temperatura óptima

5 **[0023]** La temperatura óptima de la presente enzima es de aproximadamente 55 °C. La presente enzima muestra alta actividad a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. La temperatura óptima es un valor que se calcula por el procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa mencionado más adelante (disolución tampón de fosfato-HCl 0,1 M (pH 5,0)).

10 (4) pH óptimo

[0024] El pH óptimo de la presente enzima es de aproximadamente 8,0. La presente enzima muestra una alta actividad en el intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0. El pH óptimo se determina, por ejemplo, a partir de los resultados de la medición en un tampón de ácido cítrico para la zona de pH 2 a 4 y a partir de los resultados de la medición en un tampón de Britton-Robinson para la zona de pH 4 a 11.

(5) Termoestabilidad

20 **[0025]** La presente enzima muestra una excelente termoestabilidad, comparable a la de la β -amilasa derivada de soja. La presente enzima mantiene el 90 % de actividad o más en una disolución tampón de ácido acético-HCl 0,1 M (pH 5,0) que contiene acetato de calcio 10 mM a 55 °C durante 10 minutos.

(6) Estabilidad al pH

25 **[0026]** La enzima muestra una actividad estable en el amplio intervalo de pH de 4 a 9. Es decir, cuando el pH de una disolución de la enzima sometida a tratamiento está en este intervalo, la enzima muestra el 70 % de actividad o más con respecto a la máxima actividad después del tratamiento a 30 °C durante tres horas. El pH óptimo se determina, por ejemplo, a partir de los resultados de la medición en un tampón de ácido cítrico para la zona de pH 2 a 4 y a partir de los resultados de la medición en un tampón de Britton-Robinson para la zona de pH 4 a 11.

30

(7) Peso molecular

[0027] El peso molecular de la enzima es de aproximadamente 60.000 (determinado por SDS-PAGE).

35 **[0028]** Preferentemente, la presente enzima es la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*. En este documento, la " β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*" denota la β -amilasa producida por microorganismos clasificados en *Bacillus flexus* (que puede ser la cepa natural y una cepa mutante) o la β -amilasa producida usando un gen de β -amilasa de *Bacillus flexus* (que puede ser la cepa natural y una cepa mutante) obtenido mediante técnicas de ingeniería genética. Por lo tanto, la " β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*" incluye un recombinante producido usando un microorganismo hospedador en el que se ha introducido un gen de β -amilasa (o un gen obtenido por modificación de dicho gen) obtenido de *Bacillus flexus*.

45 **[0029]** *Bacillus flexus*, del que deriva la presente enzima, se representa por un microorganismo productor de la presente enzima para facilitar la descripción. Algunos ejemplos del microorganismo productor de la presente enzima pueden incluir *Bacillus flexus* DSM1316 (DSMZ, Alemania), *Bacillus flexus* DSM1320 (DSMZ, Alemania), *Bacillus flexus* DSM1667 (DSMZ, Alemania) y APC9451. La cepa APC9451 está depositada en la institución depositaria predeterminada que se menciona a continuación y está fácilmente disponible.

50 Institución depositaria: Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE), Centro Depositario de Microorganismos de Patentes (2-5-8, Kazusa Kamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón)

Fecha de depósito (fecha de aceptación): 9 de abril de 2008

Número de acceso: NITE BP-548

55

[0030] Según se menciona anteriormente, se han clarificado los detalles de las propiedades de la presente enzima obtenida con éxito. Como resultado, se ha desvelado que la presente enzima tiene una excelente termoestabilidad y una excelente especificidad de sustrato. Por lo tanto, la presente enzima es útil para el procesamiento de alimentos y la sacarificación.

[0031] Los presentes inventores han seguido investigando y, como resultado, han determinado la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 7) de la β -amilasa producida por *Bacillus flexus*. De este modo, una realización de la presente invención **se caracteriza porque** la presente enzima consta de una proteína que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7. En este documento, en general, cuando se modifica una parte de la secuencia aminoacídica de una proteína determinada, a veces la proteína modificada puede tener la misma función que la proteína antes de la modificación. Esto quiere decir que la modificación de la secuencia aminoacídica no tiene un efecto sustancial en la función de la proteína, de manera que la función de la proteína puede mantenerse antes y después de la modificación. Como otra realización, la presente invención proporciona una proteína que tiene una secuencia aminoacídica equivalente a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7 y actividad de β -amilasa (en adelante, denominada "proteína equivalente"). La "secuencia aminoacídica equivalente" en este documento denota una secuencia aminoacídica que es parcialmente diferente de la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7, pero esta diferencia no tiene un efecto sustancial en la función (en este caso, la actividad de β -amilasa) de la proteína. El término "que tiene actividad de β -amilasa" denota que tiene actividad al actuar sobre polisacáridos u oligosacáridos de glucosa como almidón y glucógeno con enlaces α -1,4 en la cadena principal, los cuales degrada dando lugar a unidades de maltosa a partir del extremo no reductor. Sin embargo, el grado de actividad no está limitado en particular, siempre que pueda mostrarse la función de β -amilasa. Sin embargo, es preferible que la actividad sea igual o superior a la de la proteína que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7.

[0032] La "parcial diferencia en la secuencia aminoacídica" indica típicamente que se produce una mutación (cambio) en la secuencia aminoacídica debida a la delección o sustitución de uno a varios de los aminoácidos que constituyen la secuencia aminoacídica o a la adición o inserción de uno a varios aminoácidos o a la combinación de estas posibilidades. En este documento, se permite una diferencia en la secuencia aminoacídica siempre que se mantenga la actividad de β -amilasa (se permite un cambio mayor o menor en la actividad). Siempre que se cumpla esta condición, la posición en la que se da una diferencia en la secuencia aminoacídica no está limitada en particular y la diferencia puede darse en una pluralidad de posiciones. En este documento, una pluralidad significa un valor numérico que corresponde a menos de aproximadamente el 30 %, preferentemente menos de aproximadamente el 20 %, con mayor preferencia menos de aproximadamente el 10 %, aún con mayor preferencia menos de aproximadamente el 5 % y con la máxima preferencia menos de aproximadamente el 1 %, con respecto al número total de aminoácidos. Es decir, la proteína equivalente tiene, por ejemplo, aproximadamente el 70 % o más, preferentemente aproximadamente el 80 % o más, con mayor preferencia aproximadamente el 90 % o más, aún con mayor preferencia aproximadamente el 95 % o más y con la máxima preferencia aproximadamente el 99 % o más de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7.

[0033] Preferentemente, se obtiene una proteína equivalente permitiendo la generación de una sustitución aminoacídica conservadora en un resto aminoacídico que no es esencial para la actividad de β -amilasa. En este documento, una "sustitución aminoacídica conservadora" denota una sustitución de un resto aminoacídico por un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral con las mismas propiedades. Los restos aminoacídicos se clasifican en varias familias de acuerdo con su cadena lateral, por ejemplo, los de cadena lateral básica (por ejemplo, lisina, arginina e histidina), los de cadena lateral ácida (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico), los de cadena lateral polar sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína), los de cadena lateral no polar (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano), los que tienen una cadena lateral β -ramificada (por ejemplo, treonina, valina e isoleucina) y los de cadena lateral aromática (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). La sustitución aminoacídica conservadora se lleva a cabo entre los restos aminoacídicos de la misma familia.

[0034] La "proteína equivalente" puede tener propiedades adicionales. Algunos ejemplos de tales propiedades incluyen una mayor estabilidad que la proteína con la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7, una función diferente solo a baja temperatura y/o alta temperatura y un pH óptimo diferente.

[0035] La identidad (%) entre dos secuencias aminoacídicas o dos ácidos nucleicos (empleando en adelante el término "dos secuencias" para incluir las dos) puede determinarse por el procedimiento siguiente. En primer lugar, las dos secuencias se alinean para la óptima comparación de las mismas (por ejemplo, puede introducirse un hueco en la primera secuencia para optimizar el alineamiento con respecto a la segunda secuencia). Cuando una molécula (resto aminoacídico o nucleótido) en una posición específica de la primera secuencia y una molécula en la posición correspondiente en la segunda secuencia son las mismas, las moléculas en las posiciones se definen como idénticas. La identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas en las dos secuencias (es decir, identidad (%) = número de posiciones idénticas / número de posiciones totales x 100).

Preferentemente, se tienen en cuenta el número y el tamaño de los huecos que se requieren para optimizar el alineamiento de las dos secuencias.

[0036] La comparación y determinación de la identidad entre dos secuencias puede llevarse a cabo mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo específico del algoritmo matemático que puede usarse para comparar las secuencias incluye un algoritmo descrito por Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68-77 y modificado por Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77. Sin embargo, el algoritmo no se limita necesariamente a este. Un algoritmo tal está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) descritos por Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Para obtener una secuencia nucleotídica equivalente a la molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, puede llevarse a cabo una búsqueda de nucleótidos BLAST con una puntuación de 100 y una longitud de palabra de 12 con el programa NBLAST. Para obtener una secuencia aminoacídica equivalente a la molécula polipeptídica de la presente invención, por ejemplo, puede llevarse a cabo una búsqueda polipeptídica BLAST con una puntuación de 50 y una longitud de palabra de 3 con el programa XBLAST. Con el fin de obtener alineamientos con huecos para comparación, puede utilizarse el programa Gapped BLAST descrito por Altschul y col. (1997) Amino Acids Research 25(17): 3389-3402. Al usar BLAST y Gapped BLAST, pueden emplearse los parámetros por defecto de los programas correspondientes (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). En detalle, véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de algoritmo matemático que puede usarse para comparar secuencias incluye un algoritmo descrito por Meyers y Miller (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17. Estos programas están incorporados en el programa ALIGN que puede usarse, por ejemplo, con el servidor de red GENESTREAM (IGH, Montpellier, Francia) o el servidor ISREC. Cuando se usa el programa ALIGN para comparación de las secuencias aminoacídicas, puede emplearse, por ejemplo, la matriz de ponderación de restos PAM120 en la que la penalización por longitud de hueco es 12 y la penalización por hueco es 4.

[0037] La identidad entre dos secuencias aminoacídicas puede determinarse mediante el programa GAP del paquete de software GCG, con una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, con una ponderación de hueco de 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de longitud de hueco de 2, 3 o 4. Además, la homología entre dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse mediante el programa GAP del paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>) con una ponderación de hueco de 50 y una ponderación de longitud de hueco de 3.

[0038] La presente enzima puede ser parte de una proteína de mayor tamaño (por ejemplo, una proteína de fusión). Algunos ejemplos de una secuencia que puede añadirse en la proteína de fusión incluyen una secuencia útil para la purificación, por ejemplo, una secuencia de múltiples restos de histidina, y una secuencia adicional para garantizar la seguridad en la producción de un recombinante y similares.

[0039] La presente enzima con la secuencia aminoacídica anteriormente mencionada puede prepararse fácilmente mediante técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, la presente enzima puede prepararse mediante la transformación de una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, *Escherichia coli*) con el ADN que codifica la presente enzima y la recogida de las proteínas expresadas en el transformante. Las proteínas recogidas se purifican apropiadamente de acuerdo con su finalidad. En caso de que la presente enzima se prepare como una proteína recombinante, pueden llevarse a cabo diversas modificaciones. Por ejemplo, el ADN que codifica la presente enzima y otro ADN apropiado se insertan en el mismo vector y el vector se usa para producir una proteína recombinante. Después, puede obtenerse la enzima, que consta de una proteína recombinante a la que se une un péptido o proteína arbitrarios. Además, puede llevarse a cabo una modificación de manera que se produzca la adición de una cadena de azúcar y/o un lípido o el procesamiento del extremo N-terminal o C-terminal. Las modificaciones mencionadas anteriormente permiten la extracción de una proteína recombinante, la simplificación de su purificación, la adición de funciones biológicas o similares.

(ADN codificante de β -amilasa)

[0040] Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un gen que codifica la presente enzima, es decir, un nuevo gen de β -amilasa. En una realización, el gen de la presente invención incluye una ADN que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7. Un ejemplo específico de esta realización es un ADN que consta de la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6.

[0041] En general, cuando se modifica una parte del ADN que codifica una proteína determinada, la proteína codificada por el ADN modificado puede tener a veces la misma función que la de la proteína codificada por el ADN antes de la modificación. Es decir, la modificación de la secuencia de ADN no tiene un efecto sustancial en la función de la proteína codificada, de manera que la función de la proteína codificada puede mantenerse antes y después de la modificación. Por lo tanto, como otra modificación, la presente invención proporciona un ADN que

codifica una proteína que tiene una secuencia de bases equivalente a la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 y actividad de β -amilasa (denominado también en adelante "ADN equivalente"). La "secuencia de bases equivalente" en este documento denota una secuencia de bases que es parcialmente diferente de la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6, pero en que la función (en este caso, actividad de β -amilasa) de la proteína
5 codificada por la secuencia no está afectada sustancialmente por la diferencia.

[0042] Un ejemplo específico de un ADN equivalente incluye un ADN que hibrida con la secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 6 en condiciones astringentes. En este caso, las "condiciones astringentes" se refieren a condiciones en las que se forma un así denominado híbrido específico pero
10 no se forma un híbrido inespecífico. Tales condiciones astringentes son conocidas por los expertos en la técnica. Tales condiciones astringentes pueden establecerse, por ejemplo, con referencia a Molecular Cloning (3.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Current protocols in molecular biology (editado por Frederick M. Ausubel y col., 1987). Un ejemplo de condiciones astringentes puede incluir el uso de una disolución de hibridación con formamida al 50 %, 10x SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,0), 5x disolución de Denhardt, SDS al
15 1 %, sulfato de dextrano al 10 %, 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y tampón de fosfato 50 mM (pH 7,5) y la incubación a una temperatura de aproximadamente 42 °C a aproximadamente 50 °C y después el lavado con 0,1x SSC y SDS al 0,1 % a una temperatura de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 70 °C. Otras condiciones astringentes preferibles pueden incluir, por ejemplo, el uso de una disolución de hibridación con formamida al 50 %, 5x SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,0), 1x disolución de Denhardt, SDS al 1 %,
20 sulfato de dextrano al 10 %, 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y tampón de fosfato 50 mM (pH 7,5).

[0043] Otro ejemplo específico de ADN equivalente puede incluir el ADN que codifica una proteína con una secuencia de bases que incluye una sustitución, delección, inserción, adición o inversión de una o una pluralidad de
25 bases, con la secuencia de SEQ ID NO: 6 como secuencia de bases de referencia y tiene actividad de β -amilasa. La sustitución, delección o similar, de las bases puede tener lugar en una pluralidad de sitios. En este documento, "pluralidad" denota, por ejemplo, de 2 a 40 bases, preferentemente de 2 a 20 bases y con mayor preferencia de 2 a 10 bases, aunque ello depende de las posiciones o los tipos de restos aminoacídicos en la estructura tridimensional de la proteína codificada por el ADN. El ADN equivalente mencionado anteriormente puede obtenerse por
30 modificación del ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO: 6 de manera que se incluya una sustitución, delección, inserción, adición y/o inversión de bases usando un tratamiento con enzimas de restricción; un tratamiento con exonucleasa, ADN-ligasa, etc.; la introducción de una mutación por mutagénesis dirigida (Molecular Cloning, 3.^a edición, capítulo 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y mutagénesis al azar (Molecular Cloning, 3.^a edición, capítulo 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y similares. Además,
35 el ADN equivalente puede obtenerse también por otros procedimientos como la irradiación con luz ultravioleta.

[0044] Otro ejemplo de ADN equivalente puede incluir un ADN con diferencias de bases como las mencionadas anteriormente debidas a polimorfismos representados por SNP (polimorfismos de un solo nucleótido).

[0045] El gen de la presente invención puede prepararse en estado aislado mediante técnicas de ingeniería genética, técnicas de biología molecular, técnicas bioquímicas y similares, con referencia a la información de secuencia desvelada en la presente memoria descriptiva o la lista de secuencias adjunta. Específicamente, el gen de la presente invención puede prepararse mediante el uso apropiado de sondas/cebadores oligonucleotídicos capaces de hibridar específicamente con el gen de la presente invención procedente de un banco apropiado de ADN
45 genómico o de ADNc de *Bacillus flexus* o de un extracto celular de *Bacillus flexus*. Una sonda/cebador oligonucleotídico puede sintetizarse fácilmente usando, por ejemplo, un sintetizador de ADN automatizado disponible comercialmente. Como procedimiento de producción de los bancos usados para la preparación del gen de la presente invención, véase, por ejemplo, (Molecular Cloning, 3.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

[0046] Por ejemplo, un gen con la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 puede aislarse mediante un procedimiento de hibridación usando toda o una parte de la secuencia de bases o su secuencia complementaria como sonda. Además, puede llevarse a cabo una amplificación y el aislamiento mediante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR) con un cebador oligonucleotídico sintético diseñado para
55 hibridar específicamente con una parte de la secuencia de bases. Además, es posible obtener un gen diana por síntesis química a partir de la información de la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7 o la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 (véase el documento de referencia: Gene, 60(1): 115-127 (1987)).

[0047] A continuación, en este documento se describe un ejemplo específico del procedimiento de obtención

- del gen de la presente invención. En primer lugar, la presente enzima (β -amilasa) se aísla y purifica de *Bacillus flexus* y se obtiene información sobre su secuencia aminoacídica parcial. Como procedimiento para determinar la secuencia aminoacídica parcial de la misma, por ejemplo, la β -amilasa purificada se somete directamente a un análisis de secuencia aminoacídica (secuenciador de proteínas 476A, Applied Biosystems) mediante la degradación de Edman (Journal of biological chemistry, 256: 7990-7997 (1981)), de acuerdo con un procedimiento habitual. Es eficaz llevar a cabo una hidrólisis limitada dejando actuar a una hidrolasa de proteínas, después el fragmento peptídico obtenido se separa y purifica y el fragmento peptídico purificado así obtenido se somete al análisis de la secuencia aminoacídica.
- 10 **[0048]** A partir de la información de la secuencia aminoacídica parcial así obtenida, se clona el gen de la β -amilasa. La clonación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un procedimiento de hibridación o un procedimiento de PCR. Si se usa el procedimiento de hibridación, puede usarse, por ejemplo, un procedimiento descrito en Molecular Cloning (3.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).
- 15 **[0049]** Cuando se usa el procedimiento de PCR, puede usarse el procedimiento siguiente. En primer lugar, se lleva a cabo la reacción de PCR con un cebador oligonucleotídico sintético diseñado a partir de la información de la secuencia aminoacídica parcial, usando el ADN genómico de un microorganismo productor de β -amilasa como molde, con lo que se obtiene un fragmento del gen diana. El procedimiento de PCR se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en PCR Technology, publicación editada por Erlich, H. A., Stocktonpress, 1989. Además, cuando se determina la secuencia de bases por un procedimiento usado normalmente para la amplificación de fragmentos de ADN, por ejemplo, el procedimiento de terminación de cadena con desoxinucleótidos, la secuencia determinada corresponde a una secuencia aminoacídica parcial de la β -amilasa distinta de la secuencia del cebador oligonucleotídico sintético, con lo que puede obtenerse una parte del gen de la β -amilasa. Cuando posteriormente se lleva a cabo un procedimiento de hibridación y similares usando el fragmento obtenido como sonda, puede clonarse un gen que codifica la β -amilasa en toda su longitud.
- 20 **[0050]** En los ejemplos mencionados a continuación, se determina la secuencia de un gen que codifica la β -amilasa de *Bacillus flexus* mediante el procedimiento de PCR. La secuencia de bases completa de un gen que codifica la β -amilasa producida por *Bacillus flexus* se muestra en SEQ ID NO: 6. Además, se ha determinado la secuencia aminoacídica codificada por la secuencia de bases (SEQ ID NO: 7). Además de la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO: 6, existe una pluralidad de secuencias de bases correspondientes a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7.
- 30 **[0051]** Todo o parte del gen de la β -amilasa (SEQ ID NO: 6) cuya secuencia de bases completa ha sido clarificada se usa como sonda de hibridación y así puede seleccionarse un ADN con alta homología con el gen de la β -amilasa de SEQ ID NO: 6 de un banco de ADN o un banco de ADNc de microorganismos que producen otra β -amilasa.
- 35 **[0052]** De manera similar, puede diseñarse un cebador para PCR. Al llevar a cabo la reacción de PCR con este cebador, puede detectarse un fragmento génico que tenga alta homología con respecto al gen de la β -amilasa mencionado anteriormente y, además, puede obtenerse un gen completo de la misma.
- 40 **[0053]** Se prepara la proteína del gen obtenido y se mide la actividad de β -amilasa. De este modo, es posible confirmar si el gen obtenido es un gen que codifica una proteína con actividad de β -amilasa o no. Además, mediante la comparación de la secuencia de bases (o la secuencia aminoacídica codificada por esta) del gen obtenido con la secuencia de bases (o la secuencia aminoacídica de esta) de gen de la β -amilasa mencionado anteriormente, puede examinarse la estructura del gen o la homología y así determinar si el gen codifica una proteína con actividad de β -amilasa o no.
- 45 **[0054]** Dado que la estructura primaria y la estructura del gen están clarificadas, puede obtenerse una β -amilasa modificada (un gen sometido al menos a una de entre delección, adición, inserción y sustitución de uno o una pluralidad de restos aminoacídicos) mediante la introducción de una mutación aleatoria o una mutación específica. Esto hace posible obtener un gen codificante de β -amilasa con actividad de β -amilasa, pero con diferente temperatura óptima, termoestabilidad, pH óptimo, estabilidad al pH, especificidad de sustrato y similares. Además, se hace posible la preparación de una β -amilasa modificada por ingeniería genética.
- 50 **[0055]** En este documento, se lleva a cabo un esquema para la introducción de mutaciones con la consideración, por ejemplo, de una secuencia característica de la secuencia del gen. La consideración de una secuencia característica puede hacerse, por ejemplo, teniendo en cuenta la predicción de la estructura

tridimensional de la proteína y la homología con proteínas existentes.

[0056] Algunos ejemplos del procedimiento para la introducción de mutaciones aleatorias incluyen: un procedimiento, como el procedimiento del tratamiento químico del ADN, que causa mutaciones de transición en que se deja actuar hidrogenosulfito de sodio para convertir una base de citosina en una base de uracilo (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 1408-1412 (1982)); un procedimiento, como un procedimiento bioquímico, que causa una sustitución de bases durante el proceso de síntesis de la cadena doble en presencia de [α -S]dNTP (Gene 64: 313-319 (1988)); un procedimiento, como un procedimiento de PCR, que lleva a cabo una reacción de PCR en un sistema de reacción al que se añade manganeso, con lo que se reduce la fidelidad en la incorporación de los nucleótidos (Anal. Biochem., 224: 347-353 (1995)), y similares.

[0057] Algunos ejemplos del procedimiento para la introducción de una mutación específica incluyen un procedimiento que usa la mutación ámbar (procedimiento de la doble cadena con huecos; Nucleic Acids Res., 12(24): 9441-9456 (1984)); un procedimiento que usa el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción (Analytical Biochemistry 200: 81-88 (1992); Gene 102: 67-70 (1991)); un procedimiento que usa la mutación de *dut* (dUTPasa) y *ung* (uracilo-ADN-glicosilasa) (procedimiento de Kunkel; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 488-492 (1985)); un procedimiento que usa la mutación ámbar con ADN-polimerasa y ADN-ligasa (procedimiento de la mutación ámbar doble dirigida por oligonucleótidos (ODA); Gene, 152: 271-275 (1995); publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar n.º H7-289262); un procedimiento que usa un hospedador que induce un sistema de reparación del ADN (publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar n.º H8-70874); un procedimiento que usa una proteína que cataliza una reacción de intercambio de cadenas de ADN (publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar n.º H8-140685); un procedimiento de PCR que usa dos tipos de cebadores para introducir el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción (documento USP 5.512.463); un procedimiento de PCR que usa un vector de ADN bicatenario con un gen de resistencia a un fármaco inactivado y dos tipos de cebadores (Gene, 103: 73-77 (1991)); un procedimiento de PCR que usa la mutación ámbar (publicación internacional WO98/02535), y similares.

[0058] La mutación específica puede introducirse fácilmente usando kits disponibles comercialmente. Algunos ejemplos de kits disponibles comercialmente incluyen Mutan-G (marca comercial registrada, Takara Shuzo Co. Ltd.) que usa el procedimiento de la cadena doble con huecos, Mutan-K (marca comercial registrada, Takara Shuzo Co. Ltd.) que usa el procedimiento de Kunkel, Mutan-ExpressKm ((marca comercial registrada, Takara Shuzo Co. Ltd.), que usa el procedimiento ODA, el kit de mutagénesis dirigida QuikChange TM (Stratagene) que usa un cebador para la introducción de la mutación y ADN-polimerasa derivada de *Pyrococcus furiosus*, y similares. Además, los kits que usan el procedimiento de PCR son, por ejemplo, el kit de mutagénesis *in vitro* por PCR TaKaRa LA (Takara Shuzo Co., Ltd.), Mutan (marga comercial registrada) - SuperExpressKm (Takara Shuzo Co. Ltd.), y similares.

[0059] Por lo tanto, la presente invención proporciona la estructura primaria y la estructura del gen de la β -amilasa. Como resultado, es posible preparar genéticamente proteínas con actividad de β -amilasa con gran pureza a bajo coste.

(Vector recombinante)

[0060] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector recombinante que contiene el gen de la presente invención. El término "vector", según se usa en esta memoria descriptiva, indica una molécula de ácido nucleico capaz de transportar un ácido nucleico insertado en dicho vector al interior de una diana, por ejemplo, células. Los tipos o formas de vectores no están limitados en particular. Por lo tanto, los ejemplos de vectores pueden estar en forma de un vector plasmídico, un vector cosmídico, un vector fágico, un vector vírico (por ejemplo, un vector de adenovirus, un vector de un virus adenoasociado, un vector de retrovirus, un vector del virus del herpes, etc.).

[0061] El vector se selecciona de acuerdo con la finalidad de uso (clonación, expresión de proteína) y teniendo en cuenta los tipos de células hospedadoras. Algunos ejemplos específicos de vector incluyen un vector que usa *Escherichia coli* como hospedador (el fago M13 o modificaciones del mismo, el fago λ o modificaciones del mismo, pBr322 o modificaciones del mismo (pBR325, pAT153, pUC8, etc.) y similares), un vector que usa levaduras como hospedador (pYepSec1, pMFa, pYES2, etc.), un vector que usa células de insectos como hospedador (pAc, pVL, etc.), un vector que usa células de mamífero como hospedador (pCDM8, pMT2PC, etc.) y similares.

[0062] El vector recombinante de la presente invención es preferentemente un vector de expresión. El término "vector de expresión" se refiere a un vector capaz de introducir el ácido nucleico insertado en el mismo en las células

diana (células hospedadoras) para su expresión en las células. Normalmente, el vector de expresión incluye una secuencia promotora necesaria para la expresión del ácido nucleico insertado y una secuencia potenciadora para impulsar la expresión, y similares. Puede usarse un vector de expresión que incluya un marcador de selección. Cuando se usa un vector de expresión tal, mediante el marcador de selección puede confirmarse la presencia o ausencia del vector de expresión introducido (y el grado de la misma).

[0063] La inserción del gen de la presente invención en un vector, la inserción del gen marcador de selección (en caso necesario) y la inserción de un promotor (en caso necesario) y similares pueden llevarse a cabo mediante tecnología de recombinación de ADN estándar (véase, por ejemplo, en Molecular Cloning, 3.^a edición, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, un procedimiento conocido con enzimas de restricción y ADN-ligasa).

(Transformante)

[0064] La presente invención se refiere además a un transformante en el que se ha introducido el gen de la presente invención. En el transformante de la presente invención, el gen de la presente invención existe como molécula exógena. Preferentemente, el transformante de la presente invención puede prepararse por transfección o transformación usando el vector de la presente invención mencionado anteriormente. La transfección y la transformación pueden llevarse a cabo, por ejemplo, por el procedimiento de coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación (Potter, H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 7161-7165 (1984)), lipofección (Felgner, P. L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7413-7417 (1984)), microinyección (Graessmann, M. y Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 366-370 (1976)), el método de Hanahan (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166: 557-580 (1983)), el procedimiento del acetato de litio (Schiestl, R. H. y col., Curr. Genet. 16: 339-346 (1989)), el procedimiento del polietilenglicol con protoplastos (Yelton, M. M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1470-1474 (1984)), y similares.

[0065] Algunos ejemplos de células hospedadoras incluyen microorganismos, células animales, células de plantas y similares. Algunos ejemplos de microorganismos incluyen células bacterianas como *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. y *Lactococcus* sp.; levaduras como *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp. y *Kluyveromyces* sp.; hongos filamentosos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. Para células animales, pueden usarse baculovirus.

[0053] (Procedimiento de preparación de la β -amilasa)

[0066] Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de la β -amilasa. En una realización del procedimiento de preparación de la presente invención se lleva a cabo una etapa de cultivo de un *Bacillus flexus* con capacidad de producir la presente enzima (β -amilasa) (etapa (1)) y una etapa de recogida de la β -amilasa de la disolución de cultivo y/o de las células después del cultivo (etapa (2)).

[0067] Algunos ejemplos de *Bacillus flexus* para usar en la etapa (1) pueden incluir los *Bacillus flexus* mencionados anteriormente DSM1316, DSM1320, DSM1667, APC9451 y similares. El medio de cultivo y las condiciones de cultivo no están limitados en particular, siempre que se produzca la enzima deseada. Es decir, con la condición de que se produzca la presente enzima, el procedimiento y las condiciones de cultivo adecuadas para cultivar los microorganismos que se van a usar pueden establecerse de manera apropiada. Como procedimiento de cultivo puede emplearse cualquier cultivo sólido o líquido, pero se prefiere el cultivo líquido. Las condiciones de cultivo se describen tomando el cultivo líquido como ejemplo.

[0068] Puede usarse cualquier medio, siempre que los microorganismos que se van a usar puedan crecer en el mismo. Por ejemplo, puede usarse un medio con una fuente de carbono como glucosa, sacarosa, genciobiosa, almidón soluble, glicerina, dextrina, jarabe y ácidos orgánicos; una fuente de nitrógeno como sulfato de amonio, carbonato de amonio, fosfato de amonio, acetato de amonio o peptona, extracto de levadura, licor de maceración de maíz, hidrolizado de caseína, salvado, extracto de carne y similares; y además, sales inorgánicas como sales de potasio, sales de magnesio, sales de sodio, sales de fosfato, sales de manganeso, sales de hierro y sales de cinc. Con el fin de estimular el crecimiento de los microorganismos que se van a usar, pueden añadirse al medio vitaminas, aminoácidos y similares. El pH del medio se ajusta, por ejemplo a aproximadamente 3 a 10 y preferentemente a aproximadamente 7 a 8. En general, la temperatura de cultivo es de 10 °C a 50 °C y preferentemente de aproximadamente 20 °C a 37 °C. El cultivo se lleva a cabo durante uno a siete días, preferentemente durante tres o cuatro días en condiciones aerobias. Como procedimiento de cultivo, puede emplearse, por ejemplo, un procedimiento de cultivo en agitación y un procedimiento de cultivo sumergido aerobio con una jarra de fermentación.

[0069] Después del cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente, se recoge la β -amilasa de la disolución de cultivo o de las células (etapa (2)). Cuando la β -amilasa se recoge de la disolución de cultivo, la presente enzima puede obtenerse por separación y purificación después de eliminar los materiales insolubles, por ejemplo, por filtración o centrifugación del sobrenadante del cultivo y después se lleva a cabo cualquier combinación de entre concentración por ultrafiltración, precipitación salina con sulfato de amonio, diálisis o diversos tipos de cromatografía como mediante resina de intercambio iónico y similares.

[0070] Por otro lado, cuando la presente enzima se recoge de las células, dicha enzima puede obtenerse por trituración de las células con un tratamiento mediante presión, ultrasonidos y similares y, a continuación, separación y purificación de dicha enzima de manera similar a la anterior. Téngase en cuenta aquí que las series de procesos mencionados anteriormente (trituración, separación y purificación de las células) pueden llevarse a cabo después de recoger las células de la disolución de cultivo por filtración, centrifugación y similares.

[0071] Ha de señalarse aquí que la confirmación de la expresión o la confirmación del producto de expresión pueden llevarse a cabo fácilmente mediante un anticuerpo dirigido contra la β -amilasa, pero la expresión puede confirmarse midiendo la actividad de β -amilasa.

[0072] De acuerdo con otra realización de la presente invención, la β -amilasa se prepara mediante el transformante mencionado anteriormente. En el procedimiento de preparación en esta realización, en primer lugar, el transformante mencionado anteriormente se cultiva en condiciones en las que se produce la proteína codificada por el gen introducido (etapa (i)). Al igual que los diversos sistemas de vector y hospedador, las condiciones de cultivo de los transformantes son bien conocidas y un experto en la técnica puede establecer fácilmente las condiciones de cultivo apropiadas. Después de la etapa de cultivo, se lleva a cabo una etapa de recogida de la proteína producida (es decir, la β -amilasa) (etapa (ii)). La recogida y la posterior purificación pueden llevarse a cabo por el mismo procedimiento que se menciona en la realización mencionada anteriormente. El grado de purificación de la presente enzima no está limitado en particular. Además, la forma final puede estar en estado líquido o estado sólido (incluido el estado de polvo).

(Preparación enzimática)

[0073] La enzima de la presente invención se proporciona, por ejemplo, en forma de preparación enzimática. La preparación enzimática puede contener, además del principio activo (la enzima de la presente invención), excipientes, agentes tamponantes, agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes, antisépticos, disolución salina fisiológica y similares. Los ejemplos de excipientes pueden incluir lactosa, sorbitol, D-manitol, sacarosa y similares. Los ejemplos de agentes tamponantes pueden incluir fosfato, citrato, acetato y similares. Los ejemplos de estabilizantes pueden incluir fenol, cloruro de benzalconio, alcohol bencílico, clorobutanol, metilparabeno y similares. Los ejemplos de antisépticos pueden incluir cloruro de benzalconio, parahidroxibenzoato, clorobutanol y similares.

(Aplicación de la β -amilasa)

[0074] Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de maltosa como aplicación de la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*. En el procedimiento de producción de acuerdo con la presente invención, se deja actuar la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus* sobre un sustrato que consta de un polisacárido u oligosacárido con glucosas unidas por enlaces α -1,4 como cadena principal. Los ejemplos de sustrato pueden incluir almidón soluble, almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, glucógeno y un maltooligosacárido. La pureza del sustrato no está limitada en particular. Por consiguiente, la β -amilasa puede dejarse actuar sobre un sustrato en un estado mezclado con otros materiales. Además, la β -amilasa puede dejarse actuar sobre dos o más sustratos simultáneamente.

[0075] El procedimiento de producción de la presente invención se caracteriza por usar la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*. Preferentemente, como β -amilasa, se usa la β -amilasa de la invención mencionada anteriormente (la presente enzima).

[0076] El procedimiento de producción de la presente invención se usa, por ejemplo, para la producción de jarabe que contiene maltosa, jarabe de almidón y maltosa y similares. El procedimiento de producción de la presente invención puede usarse para mejorar la calidad del pan o agentes antioxidantes para pastel de arroz y dulces de pastel de arroz.

EJEMPLO

<Procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa>

[0077] La actividad de la β -amilasa se midió de la manera siguiente. A 0,5 ml de una disolución tampón de fosfato-HCl 0,1 M (pH 5,0) que contenía almidón soluble al 1 % y acetato de calcio 10 mM se le añadieron 0,5 ml de la disolución de la enzima. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después, se le añadieron 2,5 ml de una disolución de DNS (DNS al 0,2 %, NaOH 80 mM, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0,2 M) para detener la reacción. Después de ello, la mezcla de reacción se hirvió durante cinco minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm. La cantidad de enzima cuando la absorbancia a la longitud de onda de 530 nm es 1 se define como una unidad.

1. Confirmación de la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus*

[0078] Se cultivaron cuatro cepas de *Bacillus flexus*, DSM1316, DSM1320, DSM1667 y APC9451, a 30 °C en agitación durante tres días en un medio líquido con la composición que se muestra en la tabla 1.

[Tabla 1]

Medio de producción de β -amilasa	
	(p/v)
Licor de maceración de maíz	2 %
Almidón soluble	4 %
Carbonato de calcio	2 %

[0079] La actividad de la β -amilasa en el sobrenadante del cultivo resultante se midió mediante el procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa mencionado anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

	Actividad
DSM1316	4,0
DSM1320	14,8
DSM1667	4,0
APC9451	5,7

2. Producción y purificación de la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus* APC9451

[0080] *Bacillus flexus* APC9451 se cultivó a 30 °C en agitación durante tres días en un medio líquido con la composición que se muestra en la tabla 1. La disolución sobrenadante del cultivo obtenida se concentró cuatro veces mediante una membrana de ultrafiltración (AIP-0013, Asahi Kasei Corporation) y después se le añadió sulfato de amonio hasta obtener una concentración de saturación del 60 %. La fracción precipitada se disolvió de nuevo en una disolución tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,5). A continuación, a la disolución de mezcla se le añadió sulfato de amonio hasta obtener una concentración de saturación del 20 %. El precipitado resultante se separó por centrifugación y después se sometió a una columna HiPrep Butyl 16/10 FF (GE Healthcare) que había sido equilibrada con una disolución de tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,5) que contenía sulfato de amonio con una concentración de saturación del 20 %. Después, la proteína β -amilasa adsorbida se eluyó mediante un gradiente de concentración lineal de sulfato de amonio desde una concentración de saturación del 20 % hasta una concentración de saturación del 0 %.

[0081] Las fracciones con actividad de β -amilasa recogidas se concentraron mediante una membrana de ultrafiltración y después se sometieron a una columna HiTrap CM FF (GE Healthcare) que había sido equilibrada con una disolución tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,5). La proteína β -amilasa adsorbida se eluyó mediante un gradiente de concentración lineal de NaCl 0 M a 0,5 M.

[0082] Además, las fracciones con actividad de β -amilasa recogidas se concentraron mediante una membrana de ultrafiltración y se sometieron a una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (GE Healthcare) que había sido equilibrada con una disolución de tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,5) que contenía NaCl 0,15 M y se eluyeron

con la misma disolución tampón. Las fracciones con actividad de β -amilasa se recogieron y se sometieron a desalado y concentración mediante una membrana de ultrafiltración y de este modo se obtuvo una preparación de la enzima purificada. La enzima purificada resultante se examinó para determinar las propiedades mencionadas a continuación. Además, la enzima se sometió al análisis de la secuencia aminoacídica N-terminal y de la secuencia aminoacídica de péptidos internos.

10 **[0083]** Ha de señalarse que los resultados de la purificación en cada etapa se muestran en la tabla 3. La actividad específica en la etapa final fue 2.270 veces mayor que la de la enzima bruta. La figura 5 muestra los resultados de SDS-PAGE (tinción con CBB) en un gel con un gradiente del 10-20 % de muestras de cada etapa del proceso de purificación. En el análisis de SDS-PAGE se muestra que la preparación de la enzima purificada (carril 4) es una proteína única.

[Tabla 3]

	Cantidad de proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Tasa de recogida (%)
Disolución concentrada	27.200	18.700	0,69	100
Fraccionamiento con sulfato de amonio	2.856	9.054	3,17	48
Butyl FF	59,9	4.120	68,8	22
CM FF	0,64	656	1.031	4
Superdex200	0,084	132	1.569	1

15

3. Diversas propiedades de la β -amilasa termoestable

(1) Temperatura de reacción óptima

20 **[0084]** De acuerdo con el procedimiento de medida de la actividad de la β -amilasa mencionado anteriormente, la reacción se llevó a cabo a las temperaturas de reacción de 25 °C, 37 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C. Los valores se muestran como la actividad relativa cuando el valor a la temperatura que corresponde a la actividad máxima se define como el 100 %. La temperatura de reacción óptima fue de aproximadamente 55 °C (figura 1).

25 (2) pH de reacción óptimo

30 **[0085]** Como sustrato, se usó almidón soluble al 1 % y la medición se llevó a cabo en cada una de las disoluciones tampón (tampón de ácido cítrico: pH 2, pH 3 y pH 4; tampón de Britton-Robinson: pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 y pH 11) a 37 °C durante 10 minutos. Los valores se muestran como la actividad relativa cuando el valor para el pH que corresponde a la actividad máxima se define como el 100 %. El pH de reacción óptimo fue de aproximadamente 8,0 (figura 2).

(3) Termoestabilidad

35 **[0086]** La disolución de la enzima (20 U/ml) se sometió a un tratamiento térmico en una disolución tampón de ácido acético-HCl 0,1 M (pH 5,0) que contenía acetato de calcio 10 mM a cada una de las temperaturas de 37 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C durante 10 minutos y después se midió la actividad restante por el procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa descrito anteriormente. Los valores se muestran como la actividad restante cuando la actividad restante sin tratamiento térmico se define como el 100 %. El tratamiento térmico a 55 °C durante 40 10 minutos correspondió a una actividad restante del 90 % o más. Se observó termoestabilidad hasta 55 °C (figura 3).

(4) Estabilidad al pH

45 **[0087]** La β -amilasa se trató en cada una de las disoluciones tampón (tampón de ácido cítrico: pH 2, pH 3 y pH 4; tampón de Britton-Robinson: pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 y pH 11) a 30 °C durante tres horas después se midió la actividad por el procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa descrito anteriormente. Los valores se muestran como la actividad relativa cuando el valor para el pH que corresponde a la actividad máxima se define como el 100 %. El pH de reacción óptimo fue de aproximadamente 4 a 9 (figura 4).

(5) Medida del peso molecular mediante SDS-PAGE

[0088] Se llevó a cabo un análisis de SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli y col. Ha de señalarse que el marcador de peso molecular usado fue el kit de calibración de bajos pesos moleculares para electroforesis (GE Healthcare) que contenía fosforilasa b (97.000 Da), albúmina (66.000 Da), ovoalbúmina (45.000 Da), anhidrasa carbónica (30.000 Da), inhibidor de tripsina (20.100 Da) y α -lactoalbúmina (14.000 Da) como proteínas de referencia. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA/gel durante 80 minutos usando un gel en gradiente (Wako) con una concentración del 10-20 % para obtener el peso molecular. Como resultado, el peso molecular fue de aproximadamente 60 kDa (figura 5).

(6) Punto isoelectrico

[0089] El punto isoelectrico de la presente enzima se midió por precipitación por punto isoelectrico con Ampholine (tensión de 60 V, a 4 °C durante 48 horas) y resultó ser de 9,7.

(7) Efecto de metales iónicos e inhibidores

[0090] A la β -amilasa en una disolución tampón de ácido acético-HCl 0,1 M (pH 5,0) que contenía acetato de calcio 10 mM se le añadieron diversos iones metálicos o inhibidores a una concentración de 1 mM, respectivamente, se trató a 30 °C durante 30 minutos y después se midió la actividad por el procedimiento de medición de la actividad de la β -amilasa mencionado anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 4. Los valores se muestran como la actividad relativa cuando la actividad sin la adición de ningún ión metálico o inhibidor se define como el 100 %. La actividad resultó inhibida por el ión Cu, ácido yodoacético, PCMB y SDS.

[Tabla 4]

	Actividad relativa
Na ⁺	88
K ⁺	96
Ca ²⁺	130
Mn ²⁺	222
Mg ²⁺	103
Zn ²⁺	96
Cu ²⁺	46
Fe ²⁺	105
Fe ³⁺	113
EDTA	97
N-etilmaleimida	93
PCMB	25
ácido monoyodoacético	14
SDS	37
Sin aditivos	100

(8) Especificidad de sustrato

[0091] Se examinó la actividad de la β -amilasa con respecto a cada sustrato. Los valores se muestran como la actividad relativa cuando la actividad con respecto al almidón soluble se define como el 100 %. Con respecto a los oligosacáridos, se examinó la cantidad de maltosa producida por el procedimiento de cuantificación de la cantidad de maltosa mencionado a continuación. Después de hacer reaccionar 0,1 U/ml de la enzima con el 0,5 % de cada maltooligosacárido a 37 °C durante 30 minutos, la cuantificación de maltosa se llevó a cabo por HPLC (Aminex HPX-42A para carbohidratos, BIO-RAD). La cantidad de maltosa producida cuando el sustrato es almidón soluble se define como el 100 % y la actividad relativa con respecto a cada maltooligosacárido se calculó a partir de la cantidad de maltosa producida.

[0092] Los resultados se muestran en la tabla 5. Los valores se muestran como la actividad relativa cuando la cantidad producida de maltosa con respecto a almidón soluble se define como el 100 %. Ciclodextrina, pululano y dextrano se degradaron solo ligeramente. La enzima no actuó sobre maltotriosa, pero sí sobre los otros

oligosacáridos.

[Tabla 5]

Sustrato	Actividad relativa (%)
Maltotriosa	0
Maltotetrosa	75
Maltopentosa	102
Maltohexosa	131
Maltoheptosa	111
α -ciclodextrina	0
β -ciclodextrina	1,4
γ -ciclodextrina	0,6
amilosa	98
amilopectina	83
pululano	3,4
dextrano	1,9
glucógeno	51
almidón de patata	78
almidón de maíz	85
almidón de maíz céreo	106
almidón soluble	100

5

4. Obtención de un fragmento génico que codifica la β -amilasa de *Bacillus flexus*

(a) Aislamiento de ADN cromosómico

10 **[0093]** El ADN genómico de las células de *Bacillus flexus* obtenidas en "1" se preparó por el método de Saito-Miura (Biochim. Biophys. Acta, 72: 619-629, 1963).

(b) Determinación de la secuencia aminoacídica parcial

15 **[0094]** La preparación de β -amilasa purificada obtenida en "1" se sometió a un análisis de la secuencia aminoacídica para determinar la secuencia aminoacídica N-terminal (SEQ ID NO: 1) y secuencias aminoacídicas de péptidos internos (SEQ ID NO: 2 y 3) de 10 restos.

(c) Preparación de una sonda de ADN por PCR

20

[0095] Se sintetizaron dos tipos de oligonucleótidos mixtos a partir de la secuencia aminoacídica N-terminal y de las secuencias aminoacídicas internas para obtener cebadores de PCR (SEQ ID N: 4 y 5). Usando estos cebadores y el ADN cromosómico de *Bacillus flexus* como molde, se llevó a cabo una reacción de PCR en las condiciones siguientes.

25

<Disolución para la reacción de PCR>

[0096]

30 10x disolución tampón para PCR (TaRaKa): 5,0 μ l

disolución mezcla de dNTP (2,5 mM respectivamente, TaKaRa): 4,0 μ l

MgCl₂ 25 mM: 5 μ l

35

Cebador directo 100 μ M: 3,0 μ l

Cebador inverso 100 μ M: 3,0 μ l

40 Agua destilada: 28,5 μ l

Disolución de ADN cromosómico (140 µg/ml): 1 µl

ADN-polimerasa LA Taq (TaKaRa): 0,5 µl

5

<Condiciones de la reacción de PCR>

[0097]

10 Etapa 1: desnaturalización (94 °C, 5 minutos), 1 ciclo

Etapa 2: desnaturalización (94 °C, 30 segundos), 30 ciclos

Hibridación (48 °C, 30 segundos)

15

Elongación (72 °C, 1 minuto)

[0098] Un fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 0,86 kb se clonó en el vector pGEM-Teasy (Promega) y a continuación se confirmó su secuencia de bases. La secuencia de bases codificante de la secuencia aminoacídica parcial anteriormente mencionada se encontró inmediatamente detrás del cebador directo e inmediatamente delante del cebador inverso. Este fragmento de ADN se definió como sonda de ADN para la clonación del gen en toda su longitud.

(d) Producción de un banco de genes

25

[0099] Como resultado del análisis de hibridación de Southern del ADN cromosómico de *Bacillus flexus* se confirmó un banda única de aproximadamente 5,0 kb que hibridaba con la sonda de ADN en un producto de descomposición con *KpnI*. Para clonar este fragmento *KpnI* de ADN de aproximadamente 5,0 kb se generó un banco de genes de la manera siguiente. El ADN cromosómico preparado según se menciona anteriormente en (a) se sometió a tratamiento con *KpnI*. Se mezclaron 28 µg de ADN genómico de *Bacillus flexus*, 3 µl de la disolución tampón 10x L, 26 µl de agua destilada y 1 µl de *KpnI* y la mezcla se incubó a 37 °C durante 15 horas. El producto de descomposición obtenido se ligó al vector pUC19 (TaKaRa), que había sometido a tratamiento con *KpnI*, para obtener un banco de genes.

35 (e) Cribado del banco de genes

[0100] El fragmento de ADN (0,86 kb) obtenido según se menciona en (c) se marcó con DIG-High Prime (Roche) y se usó como sonda de ADN para el cribado por hibridación de colonias del banco de genes obtenido en (d). De la colonia positiva resultante se obtuvo el plásmido pUC19-BAF.

40

(f) Determinación de la secuencia de bases

[0101] La secuencia de bases del plásmido pUC19-BAF se determinó de acuerdo con un procedimiento habitual. La secuencia de bases (1.638 pb) que codifica la β -amilasa se muestra en SEQ ID NO: 6. Además, la secuencia aminoacídica (545 aminoácidos) codificada por SEQ ID NO: 6 se muestra en SEQ ID NO: 7. En esta secuencia aminoacídica se encontraron la secuencia aminoacídica de la región N-terminal (SEQ ID NO: 1) y las secuencias aminoacídicas internas (SEQ ID NO: 2 y 3), determinadas en (b).

5. Expresión de la β -amilasa derivada de *Bacillus flexus* en *Escherichia coli*

50

(a) Estructura del plásmido de expresión de la β -amilasa en *Escherichia coli*

[0102] Se sintetizaron dos tipos de oligonucleótidos (SEQ ID NO: 8 y 9) a partir de la secuencia de ADN que codifica las secuencias aminoacídicas de las regiones N-terminal y C-terminal para obtener cebadores para PCR. Al cebador directo, se le añadió el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NdeI* y al cebador inverso se le añadió el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XhoI*. La reacción de PCR se llevó a cabo en las condiciones siguientes usando estos cebadores y el plásmido pUC19-BAF que contiene el gen de la β -amilasa como molde.

55

<Disolución para la reacción de PCR>

[0103]

- 5 10x disolución tampón para PCR (TOYOBO): 5,0 µl
disolución mezcla de dNTP (2,5 mM respectivamente, TOYOBO): 5,0 µl
Cebador directo 10 µM: 1,5 µl
10 Cebador inverso 10 µM: 1,5 µl
MgSO₄ 25 mM: 2 µl
15 Agua destilada: 33 µl

Disolución del plásmido pUC19-BAF (83 µg/ml): 1,0 µl

ADN-polimerasa KOD-Plus (TOYOBO): 1,0 µl

- 20 <Condiciones de la reacción de PCR>

[0104]

- 25 Etapa 1: desnaturalización (94 °C, 2 minutos), 1 ciclo
Etapa 2: desnaturalización (94 °C, 15 segundos), 30 ciclos
Hibridación (60 °C, 30 segundos)
30 Elongación (68 °C, 2 minutos)

- [0105]** El producto de PCR obtenido se confirmó por electroforesis. Después, se purificó con el kit GENE CLEAN III (34 µl) y se le añadieron 4 µl de la disolución tampón 10x H y 1 µl de *Nde*I y 1 µl de *Xho*I. La mezcla se trató con las enzimas a 37 °C durante 15 horas. La disolución del tratamiento con las enzimas de restricción se confirmó por electroforesis y se purificó. A continuación, la mezcla se ligó con el vector pET20(b) (TAKARA BIO Inc) que había sido tratado previamente con *Nde*I y *Xho*I, con lo que se obtuvo el plásmido de expresión pET-BAF (figura 6). Además, se confirmó si la secuencia de bases codificante de la β-amilasa en pET-BAF era correcta o no.

- 40 (b) Expresión de la β-amilasa en *Escherichia coli*

- [0106]** El plásmido de expresión pET-BAF se introdujo en *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen). De los transformantes obtenidos como cepas resistentes a ampicilina, se seleccionó una cepa que contenía pET-BAF en el que se había introducido el gen diana de la β-amilasa por PCR de colonias. Además, se obtuvo como control un transformante de *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión pET20(b). Estos transformantes se cultivaron en 4 ml del medio LB con 50 µg/ml de ampicilina a 18 °C y 160 rpm durante 47 horas y las células se recogieron. Las células se suspendieron en 0,5 ml de una disolución tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,5) a la que se añadieron 0,25 g de perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro y se rompieron con un aparato Multi beads shocker (Yasui Kikai). Como condiciones de rotura se repitieron 3,5 ciclos de 30 segundos con el aparato encendido y 30 segundos apagado. El extracto acelular obtenido se centrifugó para obtener los componentes solubles.

- [0107]** Las actividades de las muestras obtenidas se midieron de acuerdo con el procedimiento de medición de la actividad de la β-amilasa mencionado anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 6.

[Tabla 6]

	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
pET-BAF	43,5	7,9	5,5
pET20(b)	0,4	8,0	0,05

5 **Aplicabilidad industrial**

[0108] La β -amilasa de la presente invención tiene una termoestabilidad comparable a la de la β -amilasa derivada de soja y es adecuada para aplicaciones que requieren que la reacción se lleve a cabo a altas temperaturas. El uso de la β -amilasa de la presente invención hace posible llevar a cabo la reacción enzimática a altas temperaturas, lo que disminuye la propensión a la contaminación por diversas bacterias. Por lo tanto, la β -amilasa de la presente invención es especialmente útil en aplicaciones tales como el procesamiento de alimentos y la sacarificación.

LISTA DE SECUENCIAS

15

[0109]

<110> AMANO ENZYME INC.; MATSUNAGA, Akiko; AMANO, Hitoshi; YAMAGUCHI, Shotaro

20 <120> β -AMILASA, GEN QUE LA CODIFICA Y PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LA MISMA

<130> P08047P

<150> JP P2008-122278

25 <151> 08-05-2008

<160> 9

<170> PatentIn, versión 3.5

30

<210> 1

<211> 10

<212> Proteína

<213> *Bacillus flexus*

35

<400> 1

Ala Val Asn Gly Gln Ser Phe Asn Ser Asn
1 5 10

40 <210> 2

<211> 7

<212> Proteína

<213> *Bacillus flexus*

45 <400> 2

Leu Ala His Gln Ala Phe Asp
1 5

<210> 3

50 <211> 9

<212> Proteína

<213> *Bacillus flexus*

<400> 3

Leu Ser Tyr Asn Ser Thr Tyr Gly Asp
 1 5

5

<210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador directo

<220>

15 <221> Base modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> l

<220>

20 <221> Elemento mixto
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

<220>

25 <221> Elemento mixto
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

<220>

30 <221> Elemento mixto
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

<220>

35 <221> Elemento mixto
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 4

40

gcngtnaayg gncarwsntt yaa 23

<210> 5

<211> 21

45

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso

50

<220>

<221> Elemento mixto
 <222> (7)..(7)
 <223> n es a, c, g o t

55

<220>

<221> Elemento mixto
 <222> (16)..(16)

ES 2 565 843 T3

<223> n e s a , c , g o t

<220>

<221> Elemento mixto

5 <222> (19)..(19)

<223> n e s a , c , g o t

<400> 5

10 rtcaarngcy tgrtgngcna r 21

<210> 6

<211> 1.638

<212> ADN

15 <213> *Bacillus flexus*

<400> 6

atgtacaagc	caattaataaa	gtttgcatca	cttattgrrt	tgrraaagrrt	rgtrrgccgct	60
rrcatarrag	ggccaacca	tagccaagca	grrgrraaatg	gacagrrcgrt	taactcgaat	120
tacaagacct	arrrraatggc	accactaaaag	aaagrraacgg	agrrrractac	rgrrrrgaagct	180
rrrrgaaaatg	accrrrcggaa	ggcaaagcaa	aatgggrrrrt	acgrrrgrrgac	agrragarrrrt	240
rggrrrggggag	aratggagaa	aaacgrrrgac	cagcagrrrrc	actrrrrcrra	rgcaccagcga	300
rrcgcaccagg	cagrrrcgaaa	rgcgggrraata	aaaarrgrrrgc	cgarrratrrc	gaccgarrca	360

20

ES 2 565 843 T3

tgtggtggaa atgtaggaga tgactgtaac acgcctcttc cttcatggat ttggaatact	420
aaaacagatg atagcctata ttttaaataca gaaacaggta cagtaaaca agaaacagta	480
aaccattag cgacagacgt aattacaaaa cagtacgggg agctatacac agcatttgcg	540
caagcgttag caccgtataa agacgttatt ccaaaggttt atttatcagg gggaccagct	600
ggtgagcttc gctatccttc atatacagct gctgatggga caggctaccc ttctagaggg	660
aaatttcaag catacacaga ctttgcaaaa tctaaattcc aaatgtgggc cgtaacaag	720
tatggctcgt tagcgggtgt aaaccaagca tggggactaa gtttaacatc aacatcacia	780
atthaccac cttcagatgg gaatcagttt ttaaaggatg gatataacac aaactatgga	840
aaagactttc tagaatggta tcaaggagtt ctgcaagacc atgcaaagcg tattggagca	900
ttagctcatc aagcctttga tccgggtgtt aatgtgcctg taggagctaa aatagcaggg	960
atacactggc aatataataa tccaacaatg cctcatgctg ctgaaaagcc agcgggttat	1020
aataactaca gtacgttatt agactcattt aaaacagcca agctagattt gacgtttacg	1080
tgcttagaaa tggttgatag cgggacatat cctgagtatt caatgccaaa aacgtagta	1140
aaagaagttg caagcctagc aaacgcaaaa gggattgtat taaatgggtga aaatgcttta	1200
agtatcggaa gtgaagagca gtataaacgc gcagctgaaa tgacatttaa ctataacttt	1260
gcgggcttta cgcttttaag attctatgat gttattaata actcaacgcg tatgagccag	1320
tttaatcagc acttaaatat aaaaccggtt gcacagacaa tggttgtaa aaatgcacct	1380
acatcgtctg gagagagtgt ttacatcgtc ggagatcgtc ctgaacttgg acagtgggac	1440
acaatcgctt atccaattaa actctcttac aactcaacgt acggagattg gagaggaacc	1500
gtaatttcc cagccgatcg aagcgttcag ttcaaagcga ttatcaagcg ctcggatggc	1560
tcattaaaat catggcaacc aaccagcag tattggaatg ttccaggaac gcctacaacg	1620
tatacgaata attggtaa	1638

<210> 7

<211> 545

5 <212> Proteína

<213> *Bacillus flexus*

<400> 7

ES 2 565 843 T3

Met Tyr Lys Pro Ile Lys Lys Phe Ala Ser Leu Ile Val Leu Leu Ser
1 5 10 15
Phe Val Ala Ala Phe Ile Leu Gly Pro Thr Asn Ser Gln Ala Ala Val
20 25 30
Asn Gly Gln Ser Phe Asn Ser Asn Tyr Lys Thr Tyr Leu Met Ala Pro
35 40 45
Leu Lys Lys Val Thr Glu Phe Thr Thr Trp Glu Ala Phe Glu Asn Asp
50 55 60

ES 2 565 843 T3

Leu Arg Lys Ala Lys Gln Asn Gly Phe Tyr Ala Val Thr Val Asp Phe
 65 70 75 80
 Trp Trp Gly Asp Met Glu Lys Asn Gly Asp Gln Gln Phe Asp Phe Ser
 85 90 95
 Tyr Ala Gln Arg Phe Ala Gln Ala Ala Arg Asn Ala Gly Ile Lys Met
 100 105 110
 Val Pro Ile Ile Ser Thr His Gln Cys Gly Gly Asn Val Gly Asp Asp
 115 120 125
 Cys Asn Thr Pro Leu Pro Ser Trp Ile Trp Asn Thr Lys Thr Asp Asp
 130 135 140
 Ser Leu Tyr Phe Lys Ser Glu Thr Gly Thr Val Asn Lys Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Asn Pro Leu Ala Thr Asp Val Ile Thr Lys Gln Tyr Gly Glu Leu Tyr
 165 170 175
 Thr Ala Phe Ala Gln Ala Leu Ala Pro Tyr Lys Asp Val Ile Pro Lys
 180 185 190
 Val Tyr Leu Ser Gly Gly Pro Ala Gly Glu Leu Arg Tyr Pro Ser Tyr
 195 200 205
 Thr Ala Ala Asp Gly Thr Gly Tyr Pro Ser Arg Gly Lys Phe Gln Ala
 210 215 220
 Tyr Thr Asp Phe Ala Lys Ser Lys Phe Gln Met Trp Ala Val Asn Lys
 225 230 235 240
 Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Val Asn Gln Ala Trp Gly Leu Ser Leu Thr
 245 250 255
 Ser Thr Ser Gln Ile Leu Pro Pro Ser Asp Gly Asn Gln Phe Leu Lys
 260 265 270
 Asp Gly Tyr Asn Thr Asn Tyr Gly Lys Asp Phe Leu Glu Trp Tyr Gln
 275 280 285
 Gly Val Leu Gln Asp His Ala Lys Arg Ile Gly Ala Leu Ala His Gln
 290 295 300
 Ala Phe Asp Pro Val Phe Asn Val Pro Val Gly Ala Lys Ile Ala Gly
 305 310 315 320
 Ile His Trp Gln Tyr Asn Asn Pro Thr Met Pro His Ala Ala Glu Lys
 325 330 335

ES 2 565 843 T3

Pro Ala Gly Tyr Asn Asn Tyr Ser Thr Leu Leu Asp Ser Phe Lys Thr
 340 345 350
 Ala Lys Leu Asp Leu Thr Phe Thr Cys Leu Glu Met Val Asp Ser Gly
 355 360 365
 Thr Tyr Pro Glu Tyr Ser Met Pro Lys Thr Leu Val Lys Glu Val Ala
 370 375 380
 Ser Leu Ala Asn Ala Lys Gly Ile Val Leu Asn Gly Glu Asn Ala Leu
 385 390 395 400
 Ser Ile Gly Ser Glu Glu Gln Tyr Lys Arg Ala Ala Glu Met Thr Phe
 405 410 415
 Asn Tyr Asn Phe Ala Gly Phe Thr Leu Leu Arg Phe Tyr Asp Val Ile
 420 425 430
 Asn Asn Ser Thr Arg Met Ser Gln Phe Asn Gln His Leu Asn Ile Lys
 435 440 445
 Pro Val Ala Gln Thr Met Val Val Lys Asn Ala Pro Thr Ser Ser Gly
 450 455 460
 Glu Ser Val Tyr Ile Val Gly Asp Arg Pro Glu Leu Gly Gln Trp Asp
 465 470 475 480
 Thr Ile Ala Tyr Pro Ile Lys Leu Ser Tyr Asn Ser Thr Tyr Gly Asp
 485 490 495
 Trp Arg Gly Thr Val Asn Phe Pro Ala Asp Arg Ser Val Gln Phe Lys
 500 505 510
 Ala Ile Ile Lys Arg Ser Asp Gly Ser Leu Lys Ser Trp Gln Pro Thr
 515 520 525
 Gln Gln Tyr Trp Asn Val Pro Gly Thr Pro Thr Thr Tyr Thr Asn Asn
 530 535 540
 Trp
 545

<210> 8
 <211> 29
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo

ES 2 565 843 T3

<400> 8

gtactcatat ggcggtaaatt ggacagtcg 29

5

<210> 9

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador inverso

<400> 9

15

cgactctcga gttaccaatt atcgtata 29

REIVINDICACIONES

1. Una β -amilasa con la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7 o una secuencia aminoacídica con una identidad de aproximadamente el 90 % o más con respecto a la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7.
2. La β -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1 que presenta las propiedades enzimáticas siguientes:
 - (1) acción: actúa sobre el enlace glucosídico α -1,4 de polisacáridos y oligosacáridos para liberar maltosa;
 - (2) especificidad de sustrato: actúa bien sobre almidón, amilosa, amilopectina, glucógeno, maltotetraosa, maltopentosa, maltohexosa y maltoheptosa, pero no actúa sobre pululano, dextrano, ciclodextrina ni maltotriosa;
 - (3) temperatura óptima: aproximadamente 55 °C
 - (4) pH óptimo: aproximadamente 8,0;
 - (5) termoestabilidad: estable a 55 °C o menos (pH 5,0, 10 minutos);
 - (6) estabilidad al pH: estable a pH 4-9 (30 °C, tres horas); y
 - (7) peso molecular: aproximadamente 60.000 (SDS-PAGE).
3. Una preparación enzimática que comprende la β -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 como principio activo.
4. Un gen de β -amilasa que comprende ADN seleccionado del grupo que consta de los siguientes (A) a (D):
 - (A) un ADN que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEQ ID NO: 7;
 - (B) un ADN con la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6;
 - (C) un ADN con una secuencia de bases que hibrida con la secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 en las condiciones astringentes siguientes: formamida al 50 %, 10x SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,0), 5x disolución de Denhardt, SDS al 1 %, sulfato de dextrano al 10 %, 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y tampón de fosfato 50 mM (pH 7,5) a una temperatura de 42 °C a 50 °C y lavado con 0,1x SSC y SDS al 0,1 % a una temperatura de 65 °C a 70 °C, y que codifica una proteína con actividad de β -amilasa; y
 - (D) un ADN que codifica la β -amilasa de las reivindicaciones 1 o 2.
5. Un vector recombinante que contiene un gen de β -amilasa de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un procedimiento de preparación de β -amilasa, que comprende las etapas siguientes:
 - (1) el cultivo de un *Bacillus flexus* con capacidad de producir una β -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2;
 - (2) la recogida de la β -amilasa a partir de la disolución de cultivo y/o de las células después del cultivo; o
 - (i) el cultivo de una célula hospedadora descrita en la reivindicación 6 en condiciones en las que se produzca la proteína codificada por el gen en el vector; y
 - (ii) la recogida de la proteína producida.
8. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 7, en que el *Bacillus flexus* es una

cepa especificada por el número de acceso NITE BP-548.

9. Una cepa de *Bacillus flexus* especificada por el número de acceso NITE BP-548.
- 5 10. Un procedimiento de producción de maltosa, en que el procedimiento comprende dejar actuar la β -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 sobre un polisacárido u oligosacárido con glucosas unidas por enlaces α -1,4 como cadena principal.
11. Uso de la β -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o el procedimiento de producción de la
10 reivindicación 10 para el procesamiento de alimentos.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en que el alimento es un jarabe que contiene maltosa o jarabe de almidón y maltosa.
- 15 13. Uso del procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 10 para mejorar la calidad del pan o agentes antioxidantes para pastel de arroz o dulces de pastel de arroz.

FIG.1

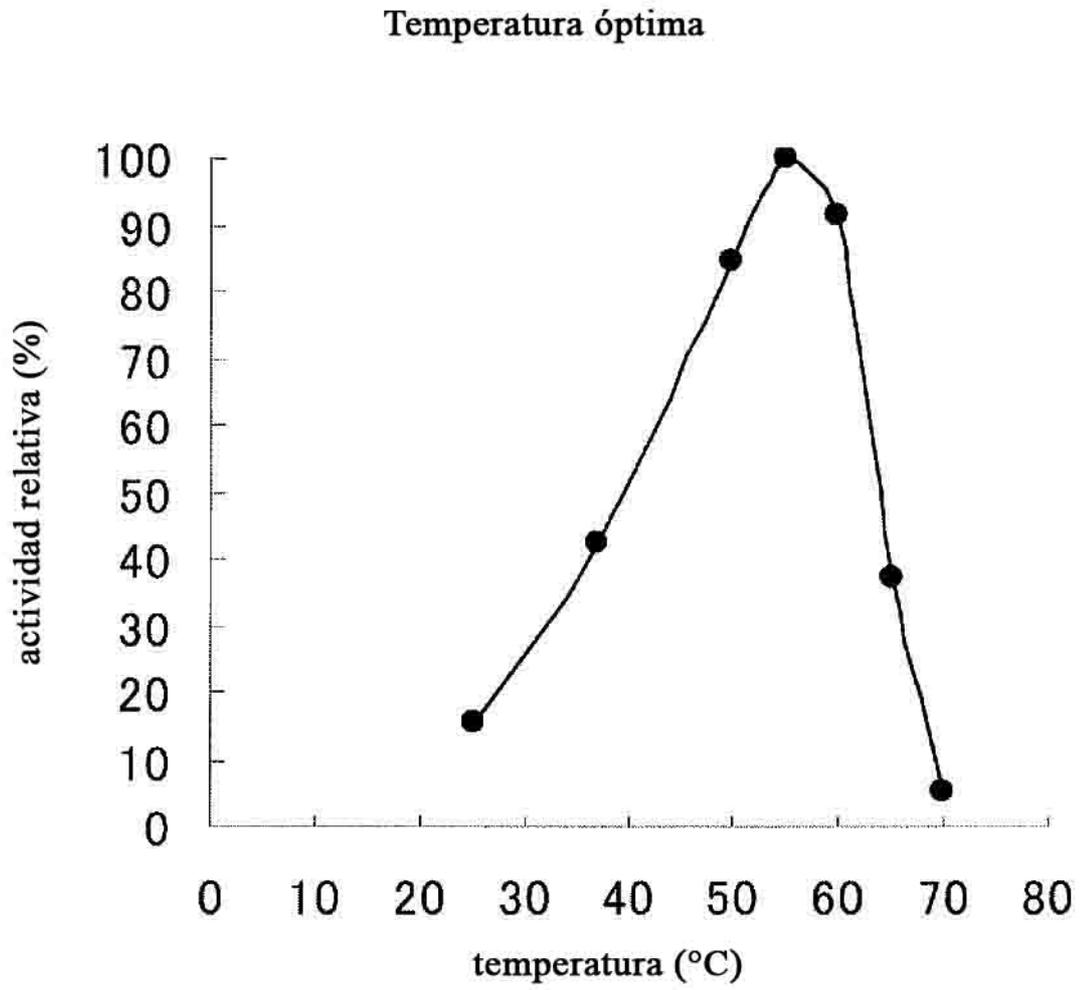


FIG.2

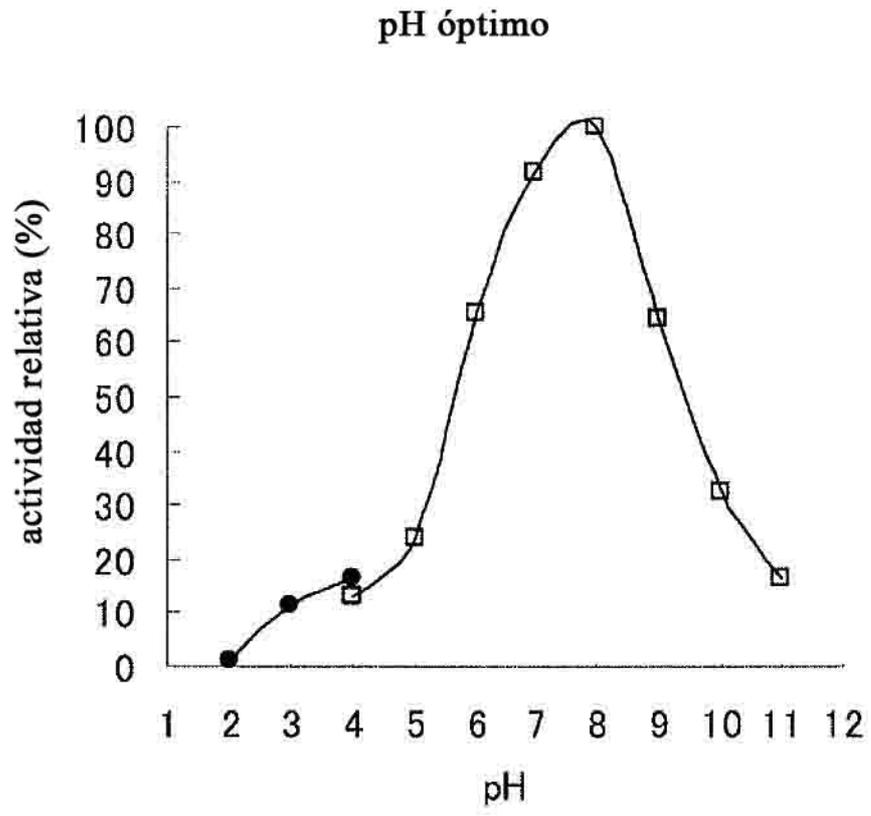


FIG.3

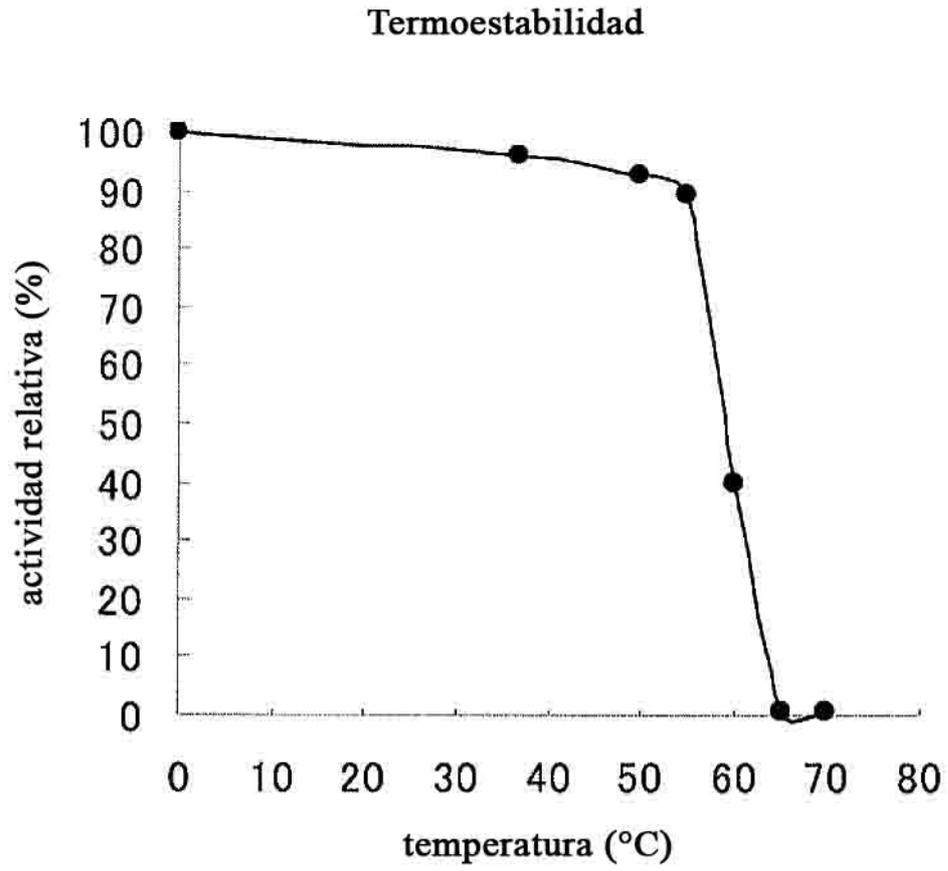


FIG.4

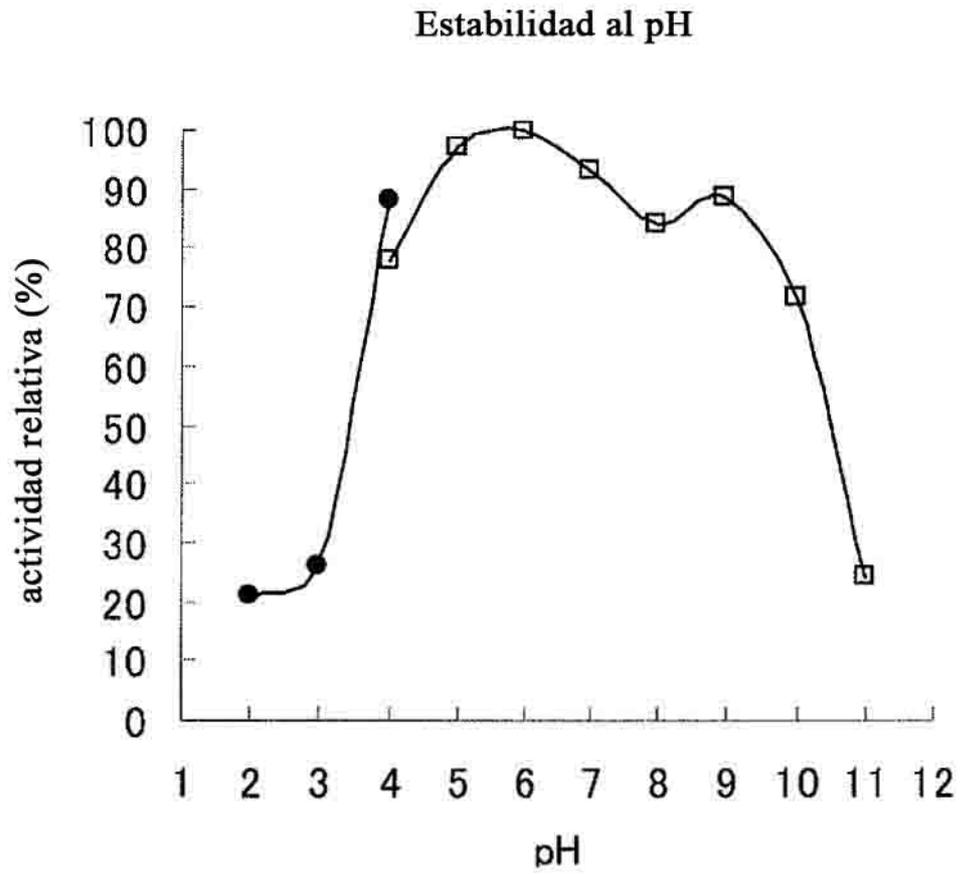


FIG.5

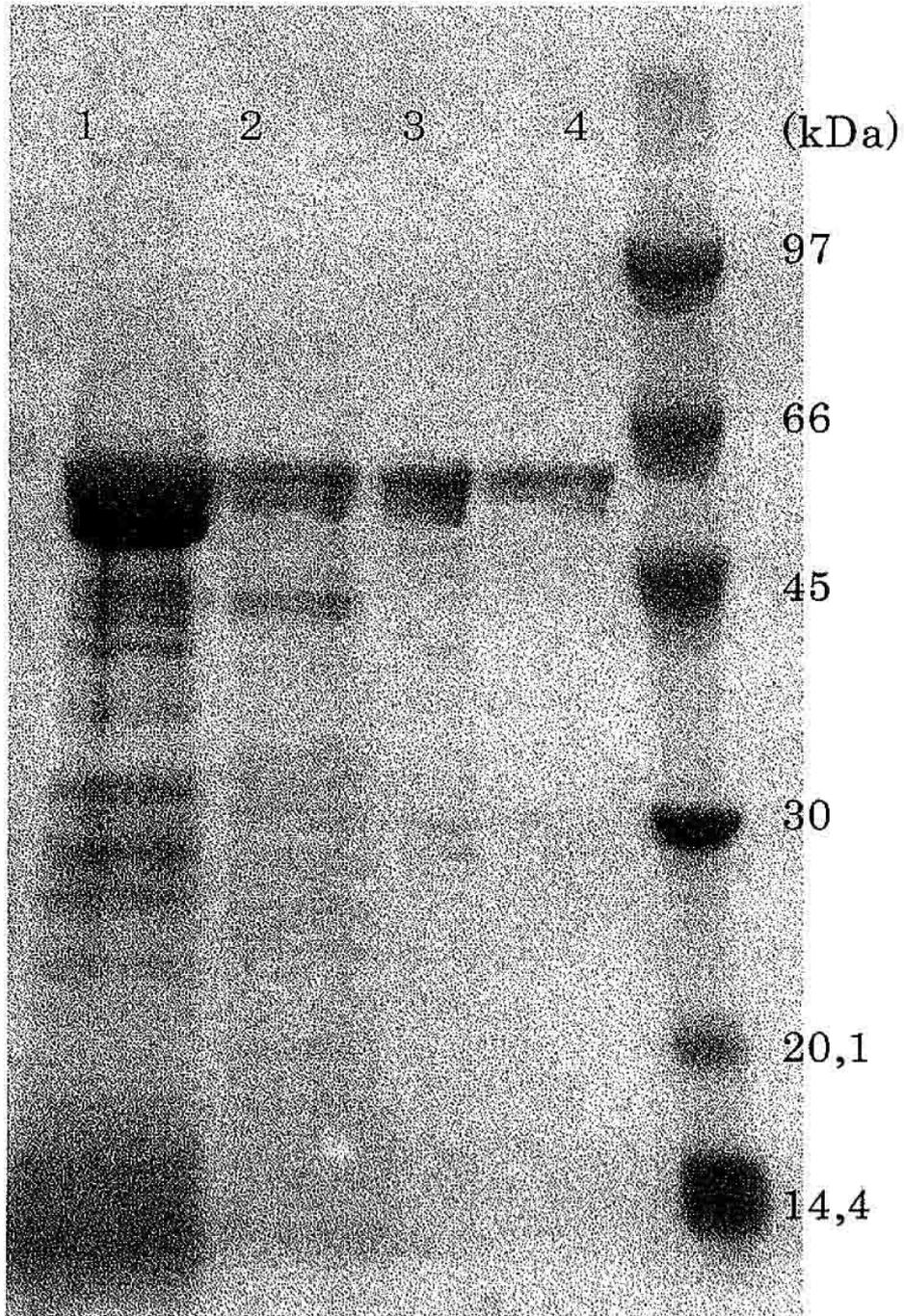


FIG.6

