

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 603 984**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/32** (2006.01)  
**C12P 13/14** (2006.01)  
**C12R 1/10** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C12P 13/04** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2005 E 10175016 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2264051**

---

(54) Título: **Nuevos productos génicos de Bacillus licheniformis que forman o que degradan poliaminoácidos y procedimientos de producción biotecnológicos mejorados basados en los mismos**

(30) Prioridad:

**26.06.2004 DE 102004030938**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.03.2017**

(73) Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
Carl-Bosch-Strasse 38  
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

(72) Inventor/es:

**FEESCHE, JÖRG;  
BESSLER, CORNELIUS;  
EVERS, STEFAN;  
MAURER, KARL-HEINZ;  
EHRENREICH, ARMIN;  
VEITH, BIRGIT;  
LIESEGANG, HEIKO;  
SINGER, ANKE;  
HERZBERG, CHRISTINA y  
GOTTSCHALK, GERHARD**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

### Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 603 984 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

Nuevos productos génicos de *Bacillus licheniformis* que forman o que degradan poliaminoácidos y procedimientos de producción biotecnológicos mejorados basados en los mismos

5 La presente invención se refiere a procedimientos de producción biotecnológicos mejorados mediante microorganismos que se caracterizan por una inactivación de un nuevo gen y su producto génico de *Bacillus licheniformis* y genes y proteínas suficientemente similares, que están implicados *in vivo* en la formación, la modificación y/o la degradación de poliaminoácidos y pueden utilizarse para ello, así como microorganismos, en los que el gen *ywtB* que codifica para un producto génico implicado en la formación de poli-gamma-glutamato está funcionalmente inactivado.

10 La presente invención se basa en el campo de la biotecnología, en particular la producción de materiales reciclables mediante fermentación de microorganismos que pueden formar materiales reciclables interesantes. A esta pertenece por ejemplo la producción de compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo de complementos alimentarios o compuestos farmacéuticamente relevantes, o de proteínas, para las que, debido a su diversidad existe a su vez un gran campo de aplicación técnica. En el primer caso, se aprovechan y/o modifican las propiedades metabólicas de 15 los microorganismos en cuestión para la producción de los materiales reciclables; en el segundo caso se emplean células que expresan los genes de las proteínas de interés. Es decir, en ambos casos, se trata en la mayoría de los casos de organismos genéticamente modificados (OGM).

20 Para la fermentación de microorganismos existe un amplio estado de la técnica, en particular también a escala industrial; este va desde la optimización de las cepas en cuestión en cuanto a la tasa de formación y el aprovechamiento de nutrientes a través de la configuración técnica de los fermentadores hasta la obtención de los materiales reciclables a partir de las células en cuestión en sí y/o el medio de fermentación. Para ello surten efecto planteamientos tanto genéticos y microbiológicos como planteamientos técnicos de procedimiento y bioquímicos. El objetivo de la presente invención es mejorar este proceso en cuanto a una propiedad frecuente, que perjudica la verdadera etapa de fermentación, de los microorganismos empleados, en concreto al nivel de las propiedades 25 genéticas de las cepas empleadas.

30 Para la producción biotecnológica, a gran escala, se cultivan los microorganismos en cuestión en fermentadores que están diseñados de manera correspondiente a sus propiedades metabólicas. Durante el cultivo metabolizan el sustrato ofrecido y forman, además del verdadero producto, habitualmente una pluralidad de otras sustancias sobre las que no existe interés alguno por regla general y/o que, como se explica a continuación, pueden llevar a 35 dificultades durante la fermentación o el procesamiento.

35 Las fermentaciones son habitualmente procesos altamente complejos en los que debe ajustarse y supervisarse una pluralidad de parámetros distintos. De este modo, se trata por ejemplo con gran frecuencia, de procesos aeróbicos, es decir, debe suministrarse oxígeno suficiente a los microorganismos empleados durante toda la duración de la fermentación (control de la tasa de gasificación). Ejemplos adicionales de tales parámetros son la geometría del reactor, la composición continuamente cambiante del medio nutritivo, el valor de pH o la tasa de formación de CO<sub>2</sub>. Un parámetro especialmente importante, tanto en cuanto a la rentabilidad, como con respecto al control de proceso, es en sí el aporte de energía necesario por ejemplo a través de sistemas agitadores, que proporcionan un entremezclado lo más completo posible del contenido del reactor. Además, junto a la distribución de sustrato se garantiza también un suministro de oxígeno suficiente a los organismos.

40 Tras finalizar la fermentación deben efectuarse habitualmente, junto a la separación de los organismos de producción, una purificación y/o concentración del material recicitable de interés a partir de la denominada pasta del fermentador. El proceso de procesamiento puede presentar por ejemplo distintas etapas de cromatografía y/o filtración. Por lo tanto, junto al contenido en materiales reciclables también son decisivas las propiedades biofísicas de la pasta del fermentador, en particular su viscosidad inmediatamente tras finalizar la fermentación, para el éxito 45 del proceso de procesamiento global.

50 Sus propiedades se ven afectadas también por las actividades metabólicas de los microorganismos seleccionados, pudiendo aparecer también efectos indeseados. A estos pertenecen, por ejemplo, una viscosidad del medio nutritivo con frecuencia creciente durante la fermentación. Esto perjudica el entremezclado y con ello el transporte de sustancias y el suministro de oxígeno dentro del reactor. En la mayoría de los casos resultan dificultades adicionales durante el procesamiento posterior, porque viscosidades elevadas perjudican considerablemente por ejemplo la eficiencia de los procesos de filtración.

55 En particular, de especies del género *Bacillus* se conoce que forman moco, que se compone esencialmente de poli-gamma-glutamato (PGA) y/o -aspartato, es decir, aquellos poliaminoácidos que están enlazados a través de los enlaces peptídicos gamma en cuestión. En trabajos científicos en *Bacillus subtilis* se unen principalmente los tres genes *ywsC*, *ywtA* y *ywtB* o los productos génicos derivados de los mismos con la formación de poli-gamma-glutamato; el producto génico de *ywtD* está implicado en la degradación. La denominación de gen general "ywt" es a este respecto sinónimo de las abreviaturas "cap" y "pgs", que son habituales para las mismas funciones. Esto se representa a continuación.

La publicación "Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*" (2001) de M. Ashiuchi, et al., en Eur. J. Biochem., volumen, páginas 5321 - 5328, describe el complejo enzimático PgsBCA (poli-gamma-glutamato sintetasa-complejo BCA) de *B. subtilis* compuesto por las tres subunidades PgsB, PgsC y PgsA. Por consiguiente, en el caso de este complejo se trata de una amida-ligasa atípica, que hace reaccionar tanto el enantiómero D como el enantiómero L de glutamato para dar el polímero correspondiente. Un experimento de disruptión génica descrito en esa publicación ha de considerarse según esta publicación como una prueba de que este complejo es el único que, en el caso de *B. subtilis*, cataliza esta reacción.

Y. Urushibata et al., en la publicación "Characterization of the *Bacillus subtilis* ywsC gene, involved in gamma-polyglutamic acid production" (2002), en J. Bacteriol., volumen 184, páginas 337-343, tratan, entre otras cosas, a través de las mutaciones por delección en los tres genes *ywsC*, *ywtA* y *ywtB*, que los tres productos génicos responsables en *B. subtilis* de la formación de PGA se codifican por estos tres genes. Estos forman, en este orden y junto con el siguiente gen *ywtC*, en este microorganismo un operón continuo.

T. Suzuki e Y. Tahara en la publicación "Characterization of the *Bacillus subtilis* ywtD gene, whose product is involved in gamma-poliglutamic acid degradation" (2003), J. Bacteriol., volumen 185, páginas 2379 – 2382 muestran que en el genoma de *B. subtilis* en sentido 3' de *ywtC* en un operón propio, existe un gel adicional, relevante para el metabolismo de PGA. Este gen codifica para una DL-endopeptidasa, que puede hidrolizar PGA y por lo tanto puede denominarse gamma-DL-glutamilo-hidrolasa.

Una vista general actual sobre estas enzimas la proporciona adicionalmente el artículo "Biochemistry and molecular genetics of poly-gamma-glutamate synthesis" de M. Ashiuchi y H. Misono en Appl. Microbiol. Biotechnol., volumen 59, páginas 9 - 14 de 2002. En este los genes homólogos a *pgsB*, *pgsC* y *pgsA*, que codifican para el complejo PGA-sintasa en *B. anthracis* se denominan *capB*, *capC* y *capA*. El gen situado en sentido 3' aguas abajo se denomina de acuerdo con este artículo en *B. anthracis* como *dep* (para "D-PGA-despolimerasa") y en *B. subtilis* como *pgdS* (para "PGA-despolimerasa").

En el estado de la técnica actual, estas actividades enzimáticas se emplean ya positivamente, principalmente para la producción de poli-gamma-glutamato como materia prima, por ejemplo para el uso en cosmética, pero sin que hasta el momento, en particular de *B. licheniformis*, se haya conocido su secuencia de ADN o secuencia de aminoácidos exacta. De este modo, por ejemplo la solicitud JP 08308590 A divulga la producción de PGA mediante fermentación de las cepas productoras de PGA en sí, en concreto de especies de *Bacillus* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*; además en ella se describe la obtención de esta materia prima a partir del medio de cultivo. *B. subtilis* var. chunkookjang representa, según la solicitud WO 02/055671 A1, un microorganismo especialmente adecuado para ello.

Por lo tanto, en algunas fermentaciones existe un interés en GLA, como el material reciclablable a producir mediante la fermentación.

En todas las otras fermentaciones existe el interés en la producción de otros materiales reciclables; a este respecto, la formación de poliaminoácidos por los motivos expuestos anteriormente, significa un efecto secundario negativo. Un modo de proceder típico de dominar la viscosidad elevada atribuible a su formación del medio de fermentación, es el aumento de la velocidad de giro de agitador. Esto repercute sin embargo en el aporte de energía. Además los microorganismos fermentados se exponen de esta manera a fuerzas de cizalladura crecientes, lo que representa un factor de estrés considerable para ellos. Viscosidades muy altas, por último, tampoco pueden superarse, de modo que puede ser necesaria una interrupción prematura de la fermentación aunque, en caso contrario, la producción podría aún continuarse.

La formación de moco, como efecto secundario negativo de numerosos procesos de fermentación, puede repercutir por lo tanto por diversos motivos sobre el resultado global de la fermentación. Seguir con éxito fermentaciones que siguen métodos convencionales a pesar de una viscosidad creciente del medio nutriente, pueden denominarse solo insuficientes, en particular porque no representan ningún control de causalidad.

Por lo tanto se planteó el objetivo urgente de impedir en la mayor medida posible una formación de moco indeseada, en particular de un moco atribuible a poli-gamma-aminoácidos tales como poli-gamma-glutamato durante la fermentación de microorganismos. En particular deberá hallarse una solución que represente un control de causalidad. Un aspecto adicional representa la provisión de los genes en cuestión para un uso positivo de los productos génicos que sintetizan GLA.

Una solución de este objetivo es un procedimiento para reducir moco atribuible a poli-gamma-glutamato, caracterizado por impedir la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* con una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como subunidad de una enzima de este tipo.

En una forma de realización el procedimiento se caracteriza porque la función de la proteína YwtB está impedida durante la fermentación del microorganismo.

En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza por una reducción del moco atribuible a poliaminoácidos hasta el 50%.

En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza porque el microorganismo es una bacteria, y/o una bacteria Gram negativa o es una bacteria Gram positiva.

- 5 En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza porque el microorganismo está seleccionado de uno de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium*.

En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza por las siguientes etapas para impedir la función de la proteína YwtB codificada por el gen *ywtB*:

- 10 a) seleccionar dos regiones de la secuencia SEQ ID NO. 7,  
 b) clonar las regiones en un vector, de modo que flanquean una parte que codifica para una proteína no activa, o de modo que se suceden directamente omitiendo la región entremedias,  
 c) delecionar el gen *ywtB* con el vector producido en la etapa b), y  
 d) detectar la delección del gen.

- 15 En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza porque la función de la proteína YwtB (CapA, PsgA) codificada por el gen *ywtB* está impedida mediante el uso de un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción, que comprende preferentemente las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para la proteína.

- 20 Una solución adicional es un procedimiento para la producción de un material recicitable mediante fermentación de un microorganismo, caracterizado porque durante la fermentación está reducida la formación de poli-gamma-glutamato por el microorganismo impidiendo la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* con una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como subunidad de una enzima de este tipo.

- 25 En una forma de realización el procedimiento se caracteriza porque la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* está impedida por un procedimiento con las siguientes etapas:

- 30 a) seleccionar dos regiones de la secuencia SEQ ID NO. 7,  
 b) clonar las regiones en un vector, de modo que flanquean una parte que codifica para una proteína no activa, o de modo que se suceden directamente omitiendo la región entremedias,  
 c) delecionar el gen *ywtB* con el vector producido en la etapa b), y  
 d) detectar la delección del gen.

- 35 En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza porque la función de la proteína YwtB (CapA, PsgA) codificada por el gen *ywtB* está impedida mediante el uso de un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción, que comprende preferentemente las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para la proteína.

En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza porque el material recicitable es un material natural, un complemento alimentario o un compuesto farmacéuticamente relevante o una enzima.

En una forma de realización adicional el procedimiento se caracteriza porque la enzima está seleccionada del grupo de las α-amilasas, proteasas, celulasas, lipasas, oxidorreductasas, peroxidases, lacasas, oxidases y hemicelulasas.

- 40 Una solución adicional es el uso de un ácido nucleico que codifica para una proteína YwtB (CapA, PgsA) implicada en la formación de poli-gamma-glutamato con una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, o en cada caso partes de la misma para impedir la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como subunidad de una enzima de este tipo.

- 45 Una solución adicional es el uso de un ácido nucleico que codifica para una proteína YwtB (CapA, PgsA) implicada en la formación de poli-gamma-glutamato con una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, o en cada caso partes de la misma para reducir el moco atribuible a poli-gamma-glutamato hasta el 50% durante la fermentación de un microorganismo.

En una forma de realización el uso se caracteriza porque el ácido nucleico tiene la secuencia SEQ ID NO. 7.

- 50 Una solución adicional es el uso de un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción que comprende las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para una proteína YwtB (CapA, PsgA) con la secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8 para la reducción del moco atribuible a poli-gamma-glutamato durante la fermentación de un microorganismo.

Una solución adicional es un microorganismo, en el que el gen *ywtB* que codifica para un producto génico implicado en la formación de poli-gamma-glutamato está funcionalmente inactivado, en el que la secuencia de nucleótido codificante *ywtB* tiene una secuencia de nucleótido, que presenta una identidad de al menos el 94% con la secuencia de nucleótido indicada en la SEQ ID NO. 7.

- 5 En una forma de realización el microorganismo es *Bacillus licheniformis*.

Además, se divultan el ácido nucleico *ywtB* correspondiente y el uso basado en el mismo de los ácidos nucleicos correspondientes para reducir la formación de moco atribuible a poliaminoácidos durante la fermentación del microorganismo así como procedimientos de fermentación correspondientes de microorganismos. En el caso de la reducción de acuerdo con la invención de la formación de moco a nivel genético, el gen *ywtB* está funcionalmente inactivado. A esto se suma el uso positivo de este gen o de los productos génicos derivados para la producción de poli-gamma-glutamato.

10 Esta invención aplicable en principio a todos los microorganismos fermentables, en particular a aquellos del género *Bacillus* lleva a que se impida a los microorganismos empleados para la producción fermentativa de otros materiales reciclables como poliaminoácidos, en particular de compuestos de bajo peso molecular farmacéuticamente relevantes o de proteínas, a nivel genético, formar poliaminoácidos, en particular GLA. Esto repercute por un lado ventajosamente en la viscosidad del medio de cultivo y además en la capacidad de mezclado, la entrada de oxígeno y la energía que va a emplearse; por otro lado, se facilita considerablemente el procesamiento del producto de interés. Además, una gran parte de las materias primas empleadas, por ejemplo la fuente de N, no se convierte en un producto no de interés, de modo que, en total, cabe esperar un mayor rendimiento de fermentación.

- 15 20 El gen mencionado puede usarse para un uso positivo del producto génico que sintetiza GLA, en concreto formándose mediante biotecnología la proteína derivada YwtB e introduciéndose en las células que lo producen o independientemente de ello como catalizador en preparaciones de reacción correspondientes.

25 Se divulga una proteína YwtB (CapA, PgsA) implicada en la formación de poliaminoácidos que se codifica por una secuencia de nucleótido *ywtB*, que presenta una identidad de al menos el 72% con la secuencia de nucleótido indicada en la SEQ ID NO. 7.

Esta enzima especial se obtuvo mediante un análisis del genoma de *B. licheniformis* DSM 13 (véase el Ejemplo 1). A través de la secuencia de nucleótido y secuencia de aminoácidos indicada en la presente solicitud en la SEQ ID NO. 7 y 8 se pone a disposición esta proteína de manera reproducible (véase el Ejemplo 1).

30 35 En este sentido, acorde con las citas bibliográficas mencionadas en la introducción, se trata de la tercera subunidad del complejo de poli-gamma-glutamato-sintetasa. Como la proteína más similar para ello, conocida en el estado de la técnica se determinó el homólogo YwsA de *B. subtilis*, que está anotado en el banco de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.) con el número de acceso AB046355.1 y a nivel de ácido nucleico tiene una homología del 67,1% de identidad; a nivel de aminoácidos la coincidencia se encuentra en el 65,8% de identidad (véase el Ejemplo 2). Estas coincidencias significativas no solo pueden indicar la misma función bioquímica, sino también que dentro de la región reivindicada está presente una pluralidad de proteínas relacionadas con la misma función.

A esta proteína YwtB pueden asignarse las siguientes variantes:

- Cada proteína correspondiente YwtB, que se codifica por una secuencia de nucleótido, que presenta una identidad cada vez más preferentemente de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98%, 99% y de manera especialmente preferente del 100% con la secuencia de nucleótido indicada en la SEQ ID NO. 7.
- Cada proteína YwtB (CapA, PgsA) implicada en la formación de poliaminoácidos con una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, cada vez más preferentemente una identidad de al menos el 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y de manera especialmente preferente del 100%.

- 45 45 Se prefieren sumamente en cada caso la proteína concreta obtenida a partir de *B. licheniformis* DSM13, porque esa se describe en concreto con la presente solicitud y se pone a disposición de manera reproducible al 100%.

50 En cada caso, entre estas se prefiere en cada caso una proteína del tipo descrito anteriormente, implicada en la formación o la degradación de poliaminoácidos, que se forma naturalmente por un microorganismo, preferentemente por una bacteria, de manera especialmente preferente por una bacteria Gram positiva, entre estas preferentemente por una del género *Bacillus*, entre estas de manera especialmente preferente por una de la especie *B. licheniformis* y entre estas de manera muy especialmente preferente por *B. licheniformis* DSM13.

55 Puesto que de manera correspondiente al objetivo existía un interés en mejorar la fermentación de microorganismos, para lo que se usan con frecuencia bacterias y entre estas especialmente Gram positivas, en particular aquellas que, tal como *Bacillus* pueden secretar materiales reciclables formados y proteínas. Además, existe para ello una amplia experiencia técnica. Además, pudieron detectarse, tal como se menciona, las proteínas indicadas en el protocolo de secuencias para *B. licheniformis*, en concreto *B. licheniformis* DSM13. Cabe esperar que un grado de parentesco

creciente de los organismos en cuestión vaya acompañado de una cantidad creciente de coincidencia de las secuencias de nucleótido y secuencias de aminoácidos y por lo tanto su intercambiabilidad.

Además, la divulgación se refiere a ácidos nucleicos:

- 5 ácido nucleico *ywtB* (*capA*, *pgsA*) que codifica para un producto génico implicado en la formación de poliaminoácidos con una secuencia de nucleótido, que presenta una identidad de al menos el 72% con la secuencia de nucleótido indicada en la SEQ ID NO. 7;
- un ácido nucleico *ywtB* correspondiente con una secuencia de nucleótido, que presenta una identidad cada vez más preferentemente de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98%, 99% y de manera especialmente preferente del 100% con la secuencia de nucleótido indicada en la SEQ ID NO. 7.

10 Los ácidos nucleicos puestos a disposición con ello pueden emplearse de acuerdo con métodos de biología molecular en sí conocidos para la inactivación o intensificación de la actividad de las proteínas correspondientes. De este modo son posibles inactivaciones por ejemplo a través de vectores de delección correspondientes (véase más adelante); la intensificación de la actividad tiene lugar ventajosamente a través de una sobreexpresión, que puede conseguirse con ayuda de un vector de expresión (véase más adelante).

15 Los genes correspondientes que aparecen en las regiones de homología indicadas en cada caso pueden obtenerse a partir de los organismos de interés por ejemplo con ayuda de sondas, que pueden producirse por medio de la secuencia 7. Estos genes completos pueden servir también como modelo para la generación de cebadores de PCR, a través de los que pueden deducirse, a partir de preparaciones de ADN total correspondientes, los genes en cuestión; estos proporcionan a su vez las proteínas descritas anteriormente. En este sentido, cuanto mayor es por regla general la tasa de éxito, más estrechamente relacionada está la cepa en cuestión con la relacionada que ha servido para la construcción de la sonda o de los cebadores de PCR, es decir, en el presente caso, para *B. licheniformis*.

20 En cada caso entre estos se prefiere en cada caso un ácido nucleico de este tipo que esté contenido naturalmente en un microorganismo, preferentemente una bacteria, de manera especialmente preferente una bacteria Gram positiva, entre estas preferentemente una del género *Bacillus*, entre estas de manera especialmente preferente una de la especie *B. licheniformis* y entre estas de manera muy especialmente preferente *B. licheniformis* DSM13.

25 Entonces, tal como se ha expuesto anteriormente, existe un interés particular en aprovechar estos genes para fermentaciones de microorganismos de este tipo. Por otro lado, con la presente divulgación está relacionada también la posibilidad de retrasar al menos en partes, a través de los genes y/o proteínas descritos en el presente documento, el metabolismo de los poliaminoácidos, en particular ácido gamma-glutámico, cuando estos deben sintetizarse, modificarse y/o degradarse. Para ello aumenta, en particular en células huésped transgénicas correspondientes en general la tasa de éxito, cuanto más coinciden los genes en cuestión con los de las células naturales.

30 Además pueden aislarse fácilmente, en principio a partir de todos los organismos naturales, alternativas de los genes y de las proteínas.

35 Además se divultan ácidos nucleicos que codifican para una proteína descrita anteriormente.

40 De este modo, existen diferencias especialmente entre especies relacionadas de lejos en cuanto al uso de codones sinónimos, que codifican para los aminoácidos respectivos, a lo que está adaptado también el aparato de biosíntesis de proteínas, por ejemplo a través del número disponible de los ARNt cargados apropiados. La transferencia de uno de los genes mencionados a una especie menos relacionada puede usarse entonces de manera especialmente satisfactoria por ejemplo para la mutación por delección o para la síntesis de la proteína en cuestión, cuando está correspondientemente optimizada en cuanto a los codones. Para ello pueden introducirse diferencias porcentualmente crecientes a nivel de ADN, que sin embargo no tienen consecuencias a nivel de aminoácidos.

45 Además, se divultan vectores que contienen una región de ácido nucleico descrita anteriormente.

50 Entonces, para manejar los ácidos nucleicos, y por lo tanto en particular preparar la producción de proteínas, se ligan de manera adecuada en vectores. Los vectores de este tipo así como los métodos de trabajo correspondientes están descritos detalladamente en el estado de la técnica. Los vectores pueden obtenerse comercialmente en un gran número y amplitud de variación, tanto para la clonación como para la expresión. A estos pertenecen por ejemplo vectores, que se derivan de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos o de virus, o vectores principalmente sintéticos. Así mismo, se diferencian según la clase de tipos de células en los que pueden establecerse, por ejemplo según vectores para bacterias Gram negativas, para bacterias Gram positivas, para levaduras o para eucariotas superiores. Estos forman puntos de partida adecuados por ejemplo para ensayos bioquímicos y de biología molecular así como para la expresión del gen en cuestión o de la proteína correspondiente. En particular para la producción de constructos para la delección o la intensificación de la expresión son, tal como se desprende del estado de la técnica correspondiente para ello, prácticamente imprescindibles.

55 Los vectores pueden ser vectores de clonación.

Entonces los vectores de clonación son adecuados además de para el almacenamiento, la amplificación biológica o la selección del gen de interés para su caracterización por biología molecular. Al mismo tiempo, representan las formas transportables y almacenables de los ácidos nucleicos reivindicados y son también puntos de partida para técnicas de biología molecular, que no están unidos a células, tales como por ejemplo la PCR o los procedimientos de mutagénesis *in vitro*.

5 Preferentemente, en el caso de los vectores se trata de vectores de expresión.

Entonces, los vectores de expresión de este tipo son la base para realizar los ácidos nucleicos correspondientes en sistemas de producción biológicos y con ello producir las proteínas correspondientes. Se prefieren Vectores de expresión que portan los elementos genéticos necesarios para la expresión, por ejemplo el promotor natural, localizado originalmente antes de este gen o un promotor de otro organismo. Estos elementos pueden estar dispuestos por ejemplo en forma de un denominado casete de expresión. Como alternativa pueden proporcionarse elementos de regulación individuales o todos los elementos de regulación también por la célula huésped respectiva. De manera especialmente preferente los vectores de expresión están adaptados en cuanto a propiedades adicionales, tales como por ejemplo el número de copias óptimo, en el sistema de expresión seleccionado, en particular la célula huésped (véase más adelante).

10 Además se divultan células que tras una modificación por ingeniería genética contienen uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

Entonces estas células contienen la información genética para la síntesis de una proteína. Entre estas quieren 20 decirse en particular aquellas células que de acuerdo con procedimientos en sí conocidos se han dotado de los ácidos nucleicos, o que se derivan de células de este tipo. Para ello se seleccionan de manera adecuada aquellas células huésped que pueden cultivarse de manera relativamente sencilla y/o proporcionan altos rendimientos de producto.

25 En principio, para países, en los que no pueden ponerse bajo protección de patente las células madre embrionarias humanas, se exceptúan del alcance de protección aquellas células madre embrionarias humanas de acuerdo con la invención.

30 Las células permiten, por ejemplo, la amplificación de los genes correspondientes, pero también su mutagénesis o transcripción y traducción y, por último, la producción biotecnológica de las proteínas en cuestión. Esta información genética puede encontrarse o bien de manera extracromosómica como elemento genético propio, es decir, en el caso de bacterias en una localización plasmídica o estar integrada en un cromosoma. La elección de un sistema adecuado depende de cuestiones tales como por ejemplo el tipo y la duración del almacenamiento del gen, o del organismo o el tipo de mutagénesis o selección.

35 Entre estas figuran en particular aquellas células que contienen el gen *ywtB* a través de un vector en *trans* y por lo tanto pueden usarse para delecciones correspondientes (véase más adelante).

40 Preferentemente, en una célula de este tipo, el ácido nucleico mencionado es parte de un vector, en particular de un vector descrito anteriormente.

45 Preferentemente entre estas se prefieren células huésped en cuyo caso se trata de bacterias.

50 Entonces las bacterias se caracterizan por cortos tiempos de generación y bajos requisitos en cuanto a las condiciones de cultivo. De esta manera pueden establecerse procedimientos económicos. Además, en el caso de las bacterias en la técnica de fermentación, se dispone de una amplia experiencia. Para una producción especial pueden ser adecuadas bacterias Gram negativas o Gram positivas por los más diversos motivos, que deben determinarse experimentalmente en el caso individual, tales como fuentes de nutrientes, tasa de formación de producto, tiempo necesario, etc.

55 Preferentemente se trata de una bacteria Gram negativa, en particular de una de los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas*, en particular de cepas de *E. coli* K12, *E. coli* B o *Klebsiella planticola*, y muy especialmente de derivados de las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3), *E. coli* RV308, *E. coli* DH5α, *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 o *Klebsiella planticola* (Rf).

60 Entonces en el caso de las bacterias Gram negativas, tales como por ejemplo *E. coli*, se secreta una pluralidad de proteínas en el espacio periplasmático. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. En la solicitud WO 01/81597 A1 se divulga un procedimiento, según el cual se consigue que también bacterias Gram negativas expulsen las proteínas expresadas. Las bacterias Gram negativas mencionadas como preferentes se encuentran por regla general fácilmente accesibles, es decir comercialmente disponibles o accesibles a través de colecciones de cultivos públicos y pueden optimizarse en cuanto a las condiciones de producción específicas junto con el resto de componente que se encuentran disponibles en gran número tales como, por ejemplo, vectores.

65 No de forma menos preferente, se trata de una bacteria Gram positiva, en particular una de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium*, muy especialmente de las especies *Bacillus lenthus*, *B. licheniformis*, *B.*

amiloliquefaciens, *B. subtilis*, *B. globigii* o *B. alcalophilus*, *Staphylococcus camosus* o *Corynebacterium glutamicum*, y entre estas a su vez de manera muy especialmente preferente se trata de un derivado de *B. licheniformis* DSM 13.

Entonces, las bacterias Gram positivas tienen frente a las Gram negativas la diferencia fundamental de desprendir proteínas secretadas de inmediato en el medio nutriente que rodea las células, a partir del que, cuando se desea, pueden purificarse las proteínas expresadas directamente a partir del medio nutriente. Además están relacionadas con la mayoría de los organismos de origen para enzimas técnicamente importantes o son idénticas y forman en la mayoría de los casos enzimas en sí comparables, de modo que disponen de una utilización de codón similar y su aparato de síntesis de proteína está adaptado de manera correspondiente según su naturaleza. Se prefieren muy especialmente preferente derivados de *B. licheniformis* DSM 13, porque están ampliamente extendidos, por un lado así mismo en el estado de la técnica como cepas de producción biotecnológicas y porque, por otro lado, con la presente solicitud se ponen a disposición exactamente los genes y las proteínas de *B. licheniformis* DSM 13, de modo que la realización de la presente invención será satisfactoria de la forma más probable en cepas de este tipo.

Además se divulan procedimientos para la producción de un producto génico *ywtB* descrito anteriormente.

A estos pertenecen cualquier procedimiento para la producción de una proteína descrita anteriormente, por ejemplo procedimientos de síntesis química. En cambio se prefieren sin embargo todos procedimientos de producción de biología molecular, de microbiología o biotecnológicos establecidos en el estado de la técnica, mencionados ya anteriormente en aspectos individuales. Su objetivo consiste en primer lugar en obtener las proteínas para ponerlas a disposición de aplicaciones correspondientes, por ejemplo para la síntesis de poli-gamma-glutamato.

Preferentemente, a este respecto se trata de procedimientos que tienen lugar con el uso de uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente, preferentemente con el uso de un vector descrito anteriormente y de manera especialmente preferente con el uso de una célula descrita anteriormente.

Entonces, mediante los ácidos nucleicos mencionados, en particular el ácido nucleico indicado en el protocolo de secuencias bajo la SEQ ID NO. 7 se pone a disposición la información genética preferida de manera correspondiente en forma microbiológicamente aprovechable, es decir para procedimientos de producción de ingeniería genética. Cada vez más preferentemente es la provisión en un vector aprovechable de manera especialmente satisfactoria por la célula huésped o de tales células en sí. Los procedimientos de producción en cuestión son en sí conocidos por el experto.

La base de las secuencias de ácido nucleico correspondientes pueden ser también sistemas de expresión sin células, en los que la biosíntesis de proteínas se comprende *in vitro*. Todos los elementos expuestos ya anteriormente pueden combinarse también para dar nuevos procedimientos, para producir proteínas. A este respecto, para cada proteína es concebible una pluralidad de posibilidades de combinación de etapas de procedimiento, de modo que deben determinarse experimentalmente los procedimientos óptimos para cada caso individual concreto.

Además se prefieren aquellos procedimientos de este tipo en los que la secuencia de nucleótido se ha adaptado en uno o preferentemente varios codones a la utilización de codón de la cepa huésped.

Entonces, conforme a lo dicho anteriormente, la transferencia de uno de los genes mencionados a una especie menos relacionada puede usarse entonces especialmente de manera satisfactoria para la síntesis de la proteína en cuestión, cuando esta está optimizada de manera correspondiente en cuanto al uso de los codones.

Además, se divulga el uso de un ácido nucleico *ywtB* descrito anteriormente o de un ácido nucleico correspondiente, que codifica para una de las proteínas descritas anteriormente o en cada caso partes de la misma, para la inactivación funcional del gen *ywtB* correspondiente en cada caso en un microorganismo.

Por la inactivación funcional se entiende en el sentido de la presente solicitud cualquier tipo de modificación o mutación, según la cual se impide la función de la proteína en cuestión como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como subunidad de una enzima de este tipo. A esta pertenece la forma de realización, que se forma una proteína prácticamente completa, pero inactiva, que partes inactivas de una proteína de este tipo están presentes en la célula, hasta las posibilidades de que el gen correspondiente ya no se traduzca o incluso esté completamente delecionado. Por lo tanto un "uso" especial de estos factores o genes de acuerdo con esta forma de realización consiste en que estos en la célula en cuestión justo ya no surten efecto en su forma natural. Esto, según este objeto de la invención se consigue a nivel genético porque el gen en cuestión se desconecta.

En formas de realización preferidas, en el caso de ambos usos se trata de aquellos en los que tiene lugar la inactivación funcional o el aumento de actividad durante la fermentación del microorganismo, preferentemente con una reducción del moco atribuible a poliaminoácidos hasta el 50%, de manera especialmente preferente hasta menos del 20%, de manera muy especialmente preferente hasta menos del 5%, entendiéndose a su vez todos los valores de porcentaje enteros o fraccionarios entremedias en escalonamiento preferido de manera correspondiente.

Para determinar estos valores se fermentan células de una cepa no tratada y de una cepa tratada en condiciones por lo demás idénticas y se determina de manera adecuada durante la fermentación la viscosidad del medio

respectivo. Dado que las cepas son idénticas por lo demás, las diferencias de viscosidad pueden atribuirse a los diferentes contenidos en poliaminoácidos. A este respecto, de acuerdo con la invención se desea cualquier disminución de la viscosidad. Se obtienen valores porcentualmente comparables tomando muestras de ambas fermentaciones y determinando según métodos en sí conocidos el contenido en moco que contiene poliaminoácidos.

- 5 Se prefiere cada vez más cuando el valor determinable en la muestra de acuerdo con la invención en la transición a la fase de crecimiento estacionaria asciende a menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% y muy especialmente a menos del 1% del valor correspondiente de la fermentación comparativa.

Para el uso para la inactivación funcional del gen *ywtB* puede emplearse un ácido nucleico que codifica para una proteína no activa con una mutación puntual.

- 10 Los ácidos nucleicos de este tipo pueden generarse a través de procedimientos en sí conocidos para la mutagénesis puntual. Estos se describen por ejemplo en manuales especializados tales como el de Fritsch, Sambrook y Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989. Además, se encuentran disponibles para ello entre tanto numerosos sistemas modulares comerciales, por ejemplo el kit QuickChange® de la empresa Stratagene, La Jolla, EE.UU. Su principio consiste en que se sintetizan oligonucleótidos con cambios individuales (*Mismatch-Primer*) y se hibridan con el gen presentado monocatenario; la posterior polimerización del ADN da como resultado entonces mutantes puntuales correspondientes. Para ello pueden usarse las secuencias propias de las especies respectivas de estos genes. Debido a las altas homologías es posible y especialmente ventajoso de acuerdo con la invención, llevar a cabo esta reacción por medio de la secuencia puesta a disposición con la SEQ ID NO. 7. Esta secuencia puede servir también para proyectar Mismatch-Primer correspondientes para especies relacionadas, en particular por medio de las regiones conservadas identificables en los alineamientos de las Figuras 1 y 2.

20 De acuerdo con una forma de realización de este uso para la inactivación funcional se emplea en cada caso un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción, que comprende preferentemente las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para la proteína.

- 25 También estos procedimientos son en sí familiares para el experto. Por lo tanto es posible impedir la formación de un factor YwtB mediante la célula huésped porque se corta una parte del gen en cuestión en un vector de transformación correspondiente a través de endonucleasas de restricción y el vector se transforma a continuación en el huésped de interés, donde a través de la recombinación homóloga, hasta el momento aún posible, se cambia el gen activo por la copia inactiva. En la forma de realización de la mutación por inserción puede insertarse únicamente el gen intacto de manera ininterrumpida o en lugar de una parte de gen de otro gen, por ejemplo un marcador de selección. A través de esto puede comprobarse fenotípicamente de manera en sí conocida el acontecimiento de mutación.

- 30 Para permitir estos acontecimientos de recombinación necesarios en cada caso entre el gen defectuoso introducido en la célula y la copia de gen intacta presente de manera endógena por ejemplo en el cromosoma, es necesario, según el conocimiento actual, una coincidencia en, en cada caso, al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico continuas, en cada caso en las dos secuencias de borde con la parte no coincidente, no dependiendo de la parte entremedias. De manera correspondiente se prefieren aquellas formas de realización que comprenden únicamente dos regiones flanqueantes con al menos estos tamaños.

- 35 40 Para el uso pueden emplearse ácidos nucleicos con, en total dos secciones de ácido nucleico, que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico y por lo tanto flanquean al menos parcialmente, preferentemente por completo, la región que codifica para la proteína. Las regiones flanqueantes pueden determinarse (PCR anclada) a este respecto a partir de las secuencias conocidas a través de métodos en sí conocidos, por ejemplo con ayuda de cebadores de PCR dirigidos hacia fuera y una preparación de ADN genómico como matriz. Entonces para permitir solo el cambio de las dos copias de gen a través de recombinación homóloga, no necesita tratarse a este respecto forzosamente de secciones codificantes de proteína. De acuerdo con la presente invención pueden concebirse los cebadores necesarios para ello por medio de la SEQ ID NO. 7 también para otras especies de bacterias Gram positivas y entre estas en particular para aquellas del género *Bacillus*. Como alternativa a este planteamiento experimental pueden deducirse regiones de este tipo, al menos en parte no codificantes, para muchos de estos genes de especies relacionadas, por ejemplo de entradas de bancos de datos de *B. subtilis*, por ejemplo del banco de datos SubtiList del Institute Pasteur, París, Francia (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/genome.cgi>).

45 50 La presente invención se realiza también en forma de microorganismos modificados por ingeniería genética, a los que se aplica correspondientemente lo dicho anteriormente.

- 55 De manera muy general son microorganismos en los que el gen *ywtB* está funcionalmente inactivado.

Preferentemente estos son microorganismos en los que se trata de bacterias.

Entre estos se prefieren aquellos microorganismos en los que se trata de bacterias Gram negativas, en particular aquellos de los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas*, en particular de las cepas de *E.*

*coli* K12, *E. coli* B o *Klebsiella planticola*, y muy especialmente de derivados de las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3), *E. coli* RV308, *E. coli* DH5a, *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 o *Klebsiella planticola* (Rf).

No son menos preferidos los microorganismos en los que se trata de bacterias Gram positivas, en particular aquellas de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium*, muy especialmente de las especies *Bacillus lenthus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. globigii* o *B. alcalophilus*, *Staphylococcus camosus* o *Corynebacterium glutamicum* y entre estas muy especialmente se trata de *B. licheniformis* DSM 13.

De acuerdo con el objetivo en el que se basa la presente solicitud deben mejorarse en primer lugar los procedimientos de fermentación técnicos. Por consiguiente, la invención se realiza en particular en procedimientos de fermentación de acuerdo con la invención correspondientes.

A este respecto se trata muy en general de procedimientos para la fermentación de un microorganismo de acuerdo con la invención, descrito anteriormente.

De manera correspondiente a las realizaciones hasta el momento, los procedimientos caracterizados por esto se prefieren de manera correspondiente. A esto pertenece en particular, inactivar funcionalmente el gen *ywtB*. De manera especialmente preferente, se recurre para ello a los ácidos nucleicos descritos anteriormente, sobre todo los indicados bajo la SEQ ID NO. 7. Esto es válido de manera correspondiente también para las especies seleccionadas como adecuadas para la fermentación respectiva. De manera correspondiente a lo dicho anteriormente entre estas se prefieren cada vez más aquellas que presentan una cantidad creciente de parentesco con *B. licheniformis* DSM13, porque con ello aumentan las perspectivas de éxito con el uso de los ácidos nucleicos indicados.

Entre los procedimientos de fermentación de acuerdo con la invención se prefieren aquellos para la producción de un material reciclable, en particular para la producción de un compuesto de bajo peso molecular o de una proteína.

Entonces este es el campo de aplicación más importante para fermentaciones a escala industrial.

Se prefieren procedimientos, en los que en el caso del compuesto de bajo peso molecular se trata de un material natural, un complemento alimentario o de un compuesto farmacéuticamente relevante.

De esta manera se producen por ejemplo aminoácidos o vitaminas que se usan especialmente como complementos alimentarios. En el caso de compuestos farmacéuticamente relevantes puede tratarse de etapas previas o intermedias para dar medicamentos o incluso de estas mismas. En todos estos casos se habla también de biotransformación, según la cual se aprovechan las propiedades metabólicas de los microorganismos para sustituir la síntesis química por lo demás costosa por completo o al menos en etapas individuales.

No menos preferentes son procedimientos correspondientes en los que en el caso de la proteína formada de esta manera se trata de una enzima, en particular de una del grupo de las  $\alpha$ -amilasas, proteasas, celulasas, lipasas, oxidoreductasas, peroxidases, lacasas, oxidases y hemicelulasas.

Enzimas industriales, que se producen con procedimientos de este tipo, se usan por ejemplo en la industria alimentaria. De este modo las  $\alpha$ -amilasas sirven por ejemplo para impedir el endurecimiento del pan o para aclarar zumos de frutas. Las proteasas se usan para romper proteínas. Todas estas enzimas se describen para el uso en agentes de lavado y de limpieza, ocupando un lugar prominente en particular las proteasas de subtilisina producidas ya naturalmente por bacterias Gram positivas. En particular en la industria textil y del cuero sirven para el procesamiento de las materias primas naturales. Así mismo, todas estas enzimas pueden emplearse a su vez en el sentido de la biotransformación como catalizadores para reacciones químicas.

Muchas de estas enzimas proceden originalmente de especies de *Bacillus* y se producen por lo tanto de manera especialmente satisfactoria en organismos Gram positivos, en particular aquellos del género *Bacillus*, entre estos en muchos casos también derivados de *B. licheniformis* DSM13. En particular procedimientos de producción, que se basan en estos sistemas microbianos, pueden mejorarse con ayuda de la presente invención, porque en particular la secuencia indicada en la SEQ ID NO. 7 procede justo de este organismo.

Por último, los factores puestos a disposición con la presente solicitud también pueden emplearse positivamente, es decir, en el sentido de su función natural, es decir, en relación con una producción dirigida de poli-gamma-glutamato.

Se divultan por lo tanto procedimientos microbianos para la producción de poli-gamma-glutamato, en el que uno de los ácidos nucleicos *ywtB* descritos anteriormente o un ácido nucleico correspondiente, que codifica para una proteína descrita anteriormente, se usa de forma transgénica, preferentemente con la formación de la proteína descrita anteriormente correspondiente.

Entre estos se prefieren procedimientos, en los que se usa un microorganismo del género *Bacillus*, en particular *B. subtilis* o *B. licheniformis*.

De este modo es posible, tal como se describe por ejemplo en las solicitudes JP 08308590 A o WO 02/055671 A1, producir GLA de manera microbiana, concretamente en *B. subtilis* y *B. licheniformis*. Las secuencias de ADN puestos a disposición con la presente solicitud pueden usarse por ejemplo para elevar en células correspondientes,

las actividades de gen respectivas y aumentar por lo tanto el rendimiento.

Como alternativa a esto son posibles ahora también procedimientos sin células para la producción de poli-gamma-glutamato con la participación de un producto génico YwtB descrito anteriormente, implicado en la formación de poliaminoácidos, preferentemente con el uso de un ácido nucleico descrito anteriormente correspondiente.

- 5 De este modo estos factores pueden hacerse reaccionar por ejemplo en un biorreactor. La construcción de biorreactores de enzimas de este tipo es en sí conocida por el estado de la técnica.

Los siguientes ejemplos explican adicionalmente la presente invención.

### Ejemplos

10 Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen métodos convencionales, tal como se indican por ejemplo en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, u obras especializadas comparables. Las enzimas, sistemas modulares (kits) y aparatos se emplearon de acuerdo con los datos de los fabricantes respectivos.

#### Ejemplo 1

##### Identificación de los genes *ywsC*, *ywsC'*, *ywtA*, *ywtB* y *ywtD* de *B. licheniformis* DSM 13

15 De la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>) para cada cepa que puede obtenerse *B. licheniformis* DSM 13 se preparó según métodos convencionales el ADN genómico, se fraccionó mecánicamente y se separó a través de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Para una clonación en perdigonada de los fragmentos más pequeños se eluyeron los fragmentos de un tamaño de 2 a 2,5 kb a partir del gel de agarosa, se desfosforilaron y se ligaron como fragmentos de extremos romos (*blunt ended*) en los sitios de corte de restricción Smal del vector pTZ19R-Cm. A este respecto se trata de un derivado que confiere una resistencia cloramfenicol del plásmido pTZ19R que puede obtenerse comercialmente por la empresa Fermentas (St. Leon-Rot). De esta manera se obtuvo un banco de genes de los fragmentos más pequeños. Como segunda clonación por perdigonada se ligaron los fragmentos genómicos obtenidos mediante una restricción parcial con la enzima Saullal en el sistema de vector SuperCos-1 ("kit Cosmid Vector") de la empresa Stratagene, La Jolla, EE.UU., mediante lo cual se obtuvo un banco de genes a través de los fragmentos principalmente de mayor tamaño.

30 A partir de las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  que pueden obtenerse mediante transformación con los bancos de genes en cuestión (D.Hannahan (1983): "Studies on transformation on Escherichia coli"; J. Mol. Microbiol., volumen 166, páginas 557 - 580) se aislaron y secuenciaron los plásmidos recombinantes en cuestión. En este sentido se utilizó el método de terminación de colorante (*dye terminator chemistry*), llevado a cabo mediante el aparato secuenciador automático Mega-BACE 1000/4000 (empresa Amersham Bioscience, Piscataway, EE.UU.) y ABI Prism 377 (empresa Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.).

35 De esta manera se obtuvieron, entre otras, las secuencias SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7 y 9 indicadas en el protocolo de secuencias de la presente solicitud, que se encuentran en este orden para los genes *ywsC*, *ywsC'* (como variante acortada de *ywsC*), *ywtA*, *ywtB* y *ywtD*. Las secuencias de aminoácidos derivadas de estas están indicadas en el orden correspondiente en la SEQ ID NO. 2,4, 6, 8 o 10. Para el gen o la proteína *ywsC* (o YwsC) se indica una variante más corta *ywsC'* (o YwsC'), porque la comparación mostrada en la Figura 6 de la secuencia de aminoácidos para la proteína homóloga en *B. subtilis* muestra un polipéptido que con una homología por lo demás bastante alta y por consiguiente una actividad comparable, es unos 16 aminoácidos más cortos de manera N-terminal.

40 **Reproducibilidad**

Estos genes y productos génicos pueden sintetizarse artificialmente ahora de acuerdo con métodos en sí conocidos, y sin que deba reproducirse la secuenciación representada, de manera dirigida por medio de estas secuencias. Como alternativas adicionales para ello es posible obtener los genes en cuestión a partir de una cepa de *Bacillus*, en particular la cepa *B. licheniformis* DSM 13 que puede obtenerse de la DSMZ, a través de PCR, pudiendo usarse las secuencias de borde respectivas indicadas en el protocolo de secuencias para la síntesis de cebadores. En el caso del uso de otras cepas se obtienen en cada caso genes homólogos para ello, siendo la PCR tanto más satisfactoria cuanto más estrechamente están relacionadas las cepas seleccionadas con *B. licheniformis* DSM 13, porque una coincidencia de secuencia creciente también debería aparecer dentro de las regiones de unión de cebador.

#### Ejemplo 2

50 **Homologías de secuencia**

Tras determinar la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Ejemplo 1 se determinaron mediante búsquedas en los bancos de genes GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y Subtilist del Instituto Pasteur, París, Francia (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/genome.cgi>) los homólogos conocidos hasta el momento, en cada

caso más similares.

Las secuencias de ADN o secuencias de aminoácidos determinadas se confrontaron entre sí a través de los alineamientos representados en las Figuras 1 a 10; para ello se usó el programa informático Vector NTI® Suite Versión 7, que puede obtenerse de la empresa Informax Inc., Bethesda, EE.UU. En este caso se emplearon los parámetros convencionales de este programa, es decir, para la comparación de las secuencias de ADN: K-tuple size: 2; Number of best Diagonals: 4; Window size: 4; Gap penalty: 5; Gap opening penalty: 15 y Gap extension penalty: 6,66. Para la comparación de las secuencias de aminoácidos sirvieron los siguientes parámetros convencionales: K-tuple size: 1; Number of best Diagonals: 5; Window size: 5; Gap penalty: 3; Gap opening penalty: 10 y Gap extension penalty: 0,1. Los resultados de estas comparaciones de secuencias están reunidos en la siguiente Tabla 1, estando indicados como números de acceso los del banco de datos NCBI.

**Tabla 1:** Genes o proteínas más similares a los genes y proteínas determinados en el Ejemplo 1.

Gen o proteína hallado en <i>B. licheniformis</i> / SEQ ID NO.	Gen o proteína más relacionado	Entrada en el banco de datos del gen o proteína más próximo	Homología en % de identidad
ywsC / 1	ywsC de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	75,4
ywsC' / 3	ywsC de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	78,5
ywtA / 5	ywsA de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	77,8
YwtB / 7	ywsB de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	67,1
ywtD / 9	ywtD de <i>B. subtilis</i>	AB080748	62,3
YwsC / 2	YwsC de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	86,1
YwsC' / 4	YwsC de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	89,6
YwtA / 6	YwsA de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	89,9
YwtB / 8	YwsB de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	65,8
YwtD / 10	YwsD de <i>B. subtilis</i>	AB080748	57,3

### Ejemplo 3

#### Inactivación funcional de uno o varios de los genes ywsC, ywsC', ywtA y ywtB en *B. licheniformis*

##### Principio de la producción de un vector de delección

Cada uno de estos genes puede inactivarse funcionalmente por ejemplo por medio de un denominado vector de delección. Este modo de proceder se describe en sí por ejemplo por J. Vehmaanperä et al. (1991) en la publicación "Genetic manipulation of *Bacillus amiloliquefaciens*"; J. Biotechnol., volumen 19, páginas 221 - 240.

Un vector adecuado para ello es pE194, que está caracterizado en la publicación "Replication and incompatibility properties of plasmid pE194 in *Bacillus subtilis*" de T.J. Gryczan et al. (1982), J. Bacteriol., volumen 152, páginas 722 - 735. La ventaja de este vector de delección consiste en que tiene un origen de replicación dependiente de la temperatura. A 33°C, pE194 puede replicarse en la célula transformada, de modo que a esta temperatura se selecciona en primer lugar a una transformación satisfactoria. A continuación se incuban a 42°C las células que contienen el vector. A esta temperatura ya no se replica el vector de delección, y se ejerce una presión de selección sobre la integración del plásmido a través de una región homóloga seleccionada previamente en el cromosoma. Una segunda recombinación homóloga a través de una segunda región homóloga lleva entonces a la escisión del vector junto con la copia de gen intacta del cromosoma y con ello a la delección del gen localizado cromosómicamente *in vivo*. Sería posible también como segunda recombinación la reacción inversa a la integración, es decir, una recombinación del vector a partir del cromosoma, de modo que el gen cromosómico permanecía intacto. La delección de gen debe detectarse de acuerdo con métodos en sí conocidos, por ejemplo en la transferencia de tipo Southern tras la restricción del ADN cromosómico con enzimas adecuadas o con ayuda de la técnica de PCR por medio del tamaño de la región amplificada.

Es decir, es necesaria también la elección de dos regiones homólogas del gen que va a delezionarse, que comprenderán en cada caso al menos respectivamente 70 pares de bases, por ejemplo la región en 5' y la región en 3' del gen seleccionado. Estos se cloran en el vector de modo que flanquean de manera directamente sucesiva una parte que codifica para una proteína no activa u omitiendo la región entremedias. Para ello se obtiene el vector de delección.

##### Delección de los genes ywsC, ywsC', ywtA y ywtB considerados en este caso

Para la construcción de un vector de delección de acuerdo con la invención se amplificaron las regiones en 5' y las regiones en 3' de uno de estos cuatro o tres genes por medio de PCR. Para la construcción de cebadores adecuados se proporcionan las secuencias SEQ ID NO. 1, 3, 5 y 7 indicadas en el protocolo de secuencias, que proceden de *B. licheniformis*, serán adecuadas debido a las homologías a esperar pero también para otras especies, en particular del género *Bacillus*.

Las dos regiones amplificadas se clonian entremedias de manera adecuada inmediatamente uno tras otro en un vector usado para estos trabajos, por ejemplo en un vector pUC18, que es adecuado para etapas de clonación en *E. coli*.

- 5 En la siguiente etapa tiene lugar una reclonación en el vector pE194 seleccionado para la delección y su transformación en *B. subtilis* DB104, por ejemplo de acuerdo con el método de la transformación de protoplastos según Chang & Cohen (1979; "High Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA"; Molec. Gen. Genet. (1979), volumen 168, páginas 111-115). Todas las etapas de trabajo deben llevarse a cabo a 33°C, para garantizar una replicación del vector.
- 10 En una etapa siguiente se transforma el vector clonado entremedias así mismo por medio del método de la transformación de protoplastos en la cepa huésped deseada, en este caso *B. licheniformis*. Los transformantes obtenidos de esta manera e identificados como positivos con métodos habituales (selección a través del marcador de resistencia del plásmido; control a través de la preparación de plásmido y PCR para el inserto) se cultivan a continuación a 42°C bajo presión de selección mediante adición de eritromicina con respecto a la presencia del plásmido. A esta temperatura ya no puede replicarse el vector de delección, y sobreviven solo aquellas células, en las 15 que el vector está integrado en el cromosoma, teniendo lugar esta integración con la mayor probabilidad en regiones homólogas o idénticas. Mediante cultivo a 33°C sin presión de selección de eritromicina puede inducirse entonces a continuación la escisión del vector de delección, eliminándose el gen codificado cromosómicamente por completo del cromosoma. El éxito de la delección se examina a continuación a través de transferencia de tipo Southern tras la restricción del ADN cromosómico con enzimas adecuadas o con ayuda de la técnica de PCR.
- 20 Los transformantes de este tipo, en los que el gen en cuestión está delecionado, se caracterizan además por una limitación o incluso la incapacidad completa para la formación de GLA.

#### **Descripción de las Figuras**

Figura 1: Alineamiento del gen *ywtB* (SEQ ID NO. 7) de *B. licheniformis* DSM 13 (B.I. *ywtB*) con el gen homólogo *ywtB* de *B. subtilis* (B.s. *ywtB*).

- 25 Figura 2: Alineamiento de la proteína YwtB (SEQ ID NO. 8) de *B. licheniformis* DSM 13 (B.I. YwtB) con la proteína homóloga YwtB de *B. subtilis* (B.s. YwtB).

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

- 30 <110> Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien  
 <120> Nuevos productos génicos de *Bacillus licheniformis* que forman o que degradan poliaminoácidos y procedimientos de producción biotecnológicos mejorados basados en los mismos
- 35 <130> H 06382 PCT  
 <150> DE102004030938.8  
 <151> 26-06-2004
- 40 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.1
- 45 <210> 1  
 <211> 1230  
 <212> ADN  
 <213> *Bacillus licheniformis* DSM 13
- 50 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(1230)  
 <223> ywsC
- 55 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1230)  
 <223>
- <400> 1

## ES 2 603 984 T3

atg aat gaa ttt aca tat cag att cca aga agg aga tgt aga caa aca Met Asn Glu Phe Thr Tyr Gln Ile Pro Arg Arg Arg Cys Arg Gln Thr 1                   5                   10                   15	48
atg tgg gta atg cta tta gcc tgt gtg atc gtt gtt ggg atc ggc att Met Trp Val Met Leu Leu Ala Cys Val Ile Val Val Gly Ile Gly Ile 20                 25                 30	96
tat gaa aaa agg cgc cac cag caa aat atc gat gcg ctg cct gtc cga Tyr Glu Lys Arg Arg His Gln Gln Asn Ile Asp Ala Leu Pro Val Arg 35                 40                 45	144
gtg aac atc aac ggt ata cgc gga aag tcc acg gtg aca aga tta aca Val Asn Ile Asn Gly Ile Arg Gly Ser Thr Val Thr Arg Leu Thr 50                 55                 60	192
aca ggg ata tta atc gaa gca ggc tac aaa aca gta gga aaa aca acc Thr Gly Ile Leu Ile Glu Ala Gly Tyr Lys Thr Val Gly Lys Thr Thr 65                 70                 75                 80	240
ggg aca gac gca agg atg att tat tgg gac aca ccg gaa gag aag ccg Gly Thr Asp Ala Arg Met Ile Tyr Trp Asp Thr Pro Glu Glu Lys Pro 85                 90                 95	288

## ES 2 603 984 T3

atc aaa aga aag ccg caa ggg ccg aat atc gga gag cag aag gag gtt Ile Lys Arg Lys Pro Gln Gly Pro Asn Ile Gly Glu Gln Lys Glu Val 100 105 110	336
atg aaa gaa acg gtg gaa aga ggg gcc aat gcg att gtc agt gag tgc Met Lys Glu Thr Val Glu Arg Gly Ala Asn Ala Ile Val Ser Glu Cys 115 120 125	384
atg gcc gtt aat cct gat tac caa atc atc ttt cag gaa gaa ttg ctt Met Ala Val Asn Pro Asp Tyr Gln Ile Ile Phe Gln Glu Glu Leu Leu 130 135 140	432
cag gct aat atc ggc gtg atc gtg aac gtg ctg gag gat cac atg gat Gln Ala Asn Ile Gly Val Ile Val Asn Val Leu Glu Asp His Met Asp 145 150 155 160	480
gtg atg gga ccg act ttg gat gaa atc gca gaa gca ttc aca gca acc Val Met Gly Pro Thr Leu Asp Glu Ile Ala Glu Ala Phe Thr Ala Thr 165 170 175	528
att cct tat aat gga cat ttg gtt att act gat agt gag tat acc gat Ile Pro Tyr Asn Gly His Leu Val Ile Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Asp 180 185 190	576
tcc ttt aag caa att gca aaa gaa agg aac aca aaa gtc atc gtc gca Phe Phe Lys Gln Ile Ala Lys Glu Arg Asn Thr Lys Val Ile Val Ala 195 200 205	624
gac aat tct aaa ata aca gat gaa tac ctc aga cag ttt gag tac atg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Asp Glu Tyr Leu Arg Gln Phe Glu Tyr Met 210 215 220	672
gta ttc cct gat aat gcg tct ctt gcg ctc ggt gta gct caa gcg ttg Val Phe Pro Asp Asn Ala Ser Leu Ala Leu Gly Val Ala Gln Ala Leu 225 230 235 240	720
ggc att gac gaa acc gcc ttt aaa ggc atg ctg aat gcg ccg cct Gly Ile Asp Glu Glu Thr Ala Phe Lys Gly Met Leu Asn Ala Pro Pro 245 250 255	768
gat ccg gga gcc atg aga att ctg ccg ctg atg aac gcc aag aat ccc Asp Pro Gly Ala Met Arg Ile Leu Pro Leu Met Asn Ala Lys Asn Pro 260 265 270	816
gga cat ttc gtc aac ggt ttt gcg gcc aat gac gca gct tcc act tta Gly His Phe Val Asn Gly Phe Ala Ala Asn Asp Ala Ala Ser Thr Leu 275 280 285	864
aac att tgg aag cgt gta aaa gaa ata ggc tat cct acg gat cag ccg Asn Ile Trp Lys Arg Val Lys Glu Ile Gly Tyr Pro Thr Asp Gln Pro 290 295 300	912
atc gtc att atg aac tgc cgc gcc gac agg gta gac aga aca cag cag Ile Val Ile Met Asn Cys Arg Ala Asp Arg Val Asp Arg Thr Gln Gln 305 310 315 320	960
ttt gcg gaa gat gtc ctt cct tat att gaa gca agt gaa ctt gtg ctg Phe Ala Glu Asp Val Leu Pro Tyr Ile Glu Ala Ser Glu Leu Val Leu 325 330 335	1008

att gga gaa aca aca gag ccg atc gtc aaa gca tat gaa gca ggc aaa Ile Gly Glu Thr Thr Glu Pro Ile Val Lys Ala Tyr Glu Ala Gly Lys 340	345	350	1056
att cct gcg gac aag ctg ttt gat ttt gag cac aaa tca acg gaa gaa Ile Pro Ala Asp Lys Leu Phe Asp Phe Glu His Lys Ser Thr Glu Glu 355	360	365	1104
atc atg ttc atg ctg aaa aac aag ctt gag ggc gcg gtt att tac gga Ile Met Phe Met Leu Lys Asn Lys Leu Glu Gly Arg Val Ile Tyr Gly 370	375	380	1152
gtc gga aat atc cac gga gca gcg gag cct ctc att gaa aaa ata caa Val Gly Asn Ile His Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ile Glu Lys Ile Gln 385	390	395	400
gat tac aag att aag cag ctc gtt agc tag Asp Tyr Lys Ile Lys Gln Leu Val Ser 405			1230

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 409

&lt;212&gt; PRT

<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

&lt;400&gt; 2

Met Asn Glu Phe Thr Tyr Gln Ile Pro Arg Arg Arg Cys Arg Gln Thr 1	5	10	15
--	---	----	----

Met Trp Val Met Leu Leu Ala Cys Val Ile Val Val Gly Ile Gly Ile 20	25	30
---	----	----

Tyr Glu Lys Arg Arg His Gln Gln Asn Ile Asp Ala Leu Pro Val Arg 35	40	45
---	----	----

Val Asn Ile Asn Gly Ile Arg Gly Lys Ser Thr Val Thr Arg Leu Thr 50	55	60
---	----	----

Thr Gly Ile Leu Ile Glu Ala Gly Tyr Lys Thr Val Gly Lys Thr Thr 65	70	75
---	----	----

Gly Thr Asp Ala Arg Met Ile Tyr Trp Asp Thr Pro Glu Glu Lys Pro 85	90	95
---	----	----

Ile Lys Arg Lys Pro Gln Gly Pro Asn Ile Gly Glu Gln Lys Glu Val 100	105	110
--	-----	-----

Met Lys Glu Thr Val Glu Arg Gly Ala Asn Ala Ile Val Ser Glu Cys 115	120	125
--	-----	-----

ES 2 603 984 T3

Met Ala Val Asn Pro Asp Tyr Gln Ile Ile Phe Gln Glu Glu Leu Leu  
130 135 140

Gln Ala Asn Ile Gly Val Ile Val Asn Val Leu Glu Asp His Met Asp  
145 150 155 160

Val Met Gly Pro Thr Leu Asp Glu Ile Ala Glu Ala Phe Thr Ala Thr  
165 170 175

Ile Pro Tyr Asn Gly His Leu Val Ile Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Asp  
180 185 190

Phe Phe Lys Gln Ile Ala Lys Glu Arg Asn Thr Lys Val Ile Val Ala  
195 200 205

Asp Asn Ser Lys Ile Thr Asp Glu Tyr Leu Arg Gln Phe Glu Tyr Met  
210 215 220

Val Phe Pro Asp Asn Ala Ser Leu Ala Leu Gly Val Ala Gln Ala Leu  
225 230 235 240

Gly Ile Asp Glu Glu Thr Ala Phe Lys Gly Met Leu Asn Ala Pro Pro  
245 250 255

Asp Pro Gly Ala Met Arg Ile Leu Pro Leu Met Asn Ala Lys Asn Pro  
260 265 270

Gly His Phe Val Asn Gly Phe Ala Ala Asn Asp Ala Ala Ser Thr Leu  
275 280 285

Asn Ile Trp Lys Arg Val Lys Glu Ile Gly Tyr Pro Thr Asp Gln Pro  
290 295 300

Ile Val Ile Met Asn Cys Arg Ala Asp Arg Val Asp Arg Thr Gln Gln  
305 310 315 320

Phe Ala Glu Asp Val Leu Pro Tyr Ile Glu Ala Ser Glu Leu Val Leu  
325 330 335

Ile Gly Glu Thr Thr Glu Pro Ile Val Lys Ala Tyr Glu Ala Gly Lys  
340 345 350

Ile Pro Ala Asp Lys Leu Phe Asp Phe Glu His Lys Ser Thr Glu Glu

## ES 2 603 984 T3

355

360

365

Ile Met Phe Met Leu Lys Asn Lys Leu Glu Gly Arg Val Ile Tyr Gly  
 370                           375                           380

Val Gly Asn Ile His Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ile Glu Lys Ile Gln  
 385                           390                           395                           400

Asp Tyr Lys Ile Lys Gln Leu Val Ser  
 405

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1182

5       &lt;212&gt; ADN

<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gen

10      &lt;222&gt; (1)..(1182)

&lt;223&gt; ywsC'

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

15      &lt;222&gt; (1)..(1182)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

atg tgg gta atg cta tta gcc tgt gtg atc gtt gtt ggg atc ggc att          48  
 Met Trp Val Met Leu Leu Ala Cys Val Ile Val Val Gly Ile Gly Ile  
 1                           5                           10                           15

tat gaa aaa agg cgc cac cag caa aat atc gat gcg ctg cct gtc cga          96  
 Tyr Glu Lys Arg Arg His Gln Gln Asn Ile Asp Ala Leu Pro Val Arg  
 20                           25                           30

gtg aac atc aac ggt ata cgc gga aag tcc acg gtg aca aga tta aca          144  
 Val Asn Ile Asn Gly Ile Arg Gly Lys Ser Thr Val Thr Arg Leu Thr  
 35                           40                           45

aca ggg ata tta atc gaa gca ggc tac aaa aca gta gga aaa aca acc          192  
 Thr Gly Ile Leu Ile Glu Ala Gly Tyr Lys Thr Val Gly Lys Thr Thr  
 50                           55                           60

ggg aca gac gca agg atg att tat tgg gac aca ccg gaa gag aag ccg          240  
 Gly Thr Asp Ala Arg Met Ile Tyr Trp Asp Thr Pro Glu Glu Lys Pro  
 65                           70                           75                           80

atc aaa aga aag ccg caa ggg ccg aat atc gga gag cag aag gag gtt          288  
 Ile Lys Arg Lys Pro Gln Gly Pro Asn Ile Gly Glu Gln Lys Glu Val  
 85                           90                           95

atg aaa gaa acg gtg gaa aga ggg gcc aat gcg att gtc agt gag tgc          336  
 Met Lys Glu Thr Val Glu Arg Gly Ala Asn Ala Ile Val Ser Glu Cys

## ES 2 603 984 T3

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

## ES 2 603 984 T3

Ile Pro Ala Asp Lys Leu Phe Asp Phe Glu His Lys Ser Thr Glu Glu		
340	345	350
atc atg ttc atg ctg aaa aac aag ctt gag ggc cgc gtt att tac gga		1104
Ile Met Phe Met Leu Lys Asn Lys Leu Glu Gly Arg Val Ile Tyr Gly		
355	360	365
gtc gga aat atc cac gga gca gcg gag cct ctc att gaa aaa ata caa		1152
Val Gly Asn Ile His Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ile Glu Lys Ile Gln		
370	375	380
gat tac aag att aag cag ctc gtt agc tag		1182
Asp Tyr Lys Ile Lys Gln Leu Val Ser		
385	390	
<210> 4		
<211> 393		
5 <212> PRT		
<213> <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13		
<400> 4		
Met Trp Val Met Leu Leu Ala Cys Val Ile Val Val Gly Ile Gly Ile		
1	5	10
Tyr Glu Lys Arg Arg His Gln Gln Asn Ile Asp Ala Leu Pro Val Arg		
20	25	30
Val Asn Ile Asn Gly Ile Arg Gly Lys Ser Thr Val Thr Arg Leu Thr		
35	40	45
Thr Gly Ile Leu Ile Glu Ala Gly Tyr Lys Thr Val Gly Lys Thr Thr		
50	55	60
Gly Thr Asp Ala Arg Met Ile Tyr Trp Asp Thr Pro Glu Glu Lys Pro		
65	70	75
Ile Lys Arg Lys Pro Gln Gly Pro Asn Ile Gly Glu Gln Lys Glu Val		
85	90	95
Met Lys Glu Thr Val Glu Arg Gly Ala Asn Ala Ile Val Ser Glu Cys		
100	105	110
Met Ala Val Asn Pro Asp Tyr Gln Ile Ile Phe Gln Glu Glu Leu Leu		
115	120	125
Gln Ala Asn Ile Gly Val Ile Val Asn Val Leu Glu Asp His Met Asp		
130	135	140

ES 2 603 984 T3

Val Met Gly Pro Thr Leu Asp Glu Ile Ala Glu Ala Phe Thr Ala Thr  
145 150 155 160

Ile Pro Tyr Asn Gly His Leu Val Ile Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Asp  
165 170 175

Phe Phe Lys Gln Ile Ala Lys Glu Arg Asn Thr Lys Val Ile Val Ala  
180 185 190

Asp Asn Ser Lys Ile Thr Asp Glu Tyr Leu Arg Gln Phe Glu Tyr Met  
195 200 205

Val Phe Pro Asp Asn Ala Ser Leu Ala Leu Gly Val Ala Gln Ala Leu  
210 215 220

Gly Ile Asp Glu Glu Thr Ala Phe Lys Gly Met Leu Asn Ala Pro Pro  
225 230 235 240

Asp Pro Gly Ala Met Arg Ile Leu Pro Leu Met Asn Ala Lys Asn Pro  
245 250 255

Gly His Phe Val Asn Gly Phe Ala Ala Asn Asp Ala Ala Ser Thr Leu  
260 265 270

Asn Ile Trp Lys Arg Val Lys Glu Ile Gly Tyr Pro Thr Asp Gln Pro  
275 280 285

Ile Val Ile Met Asn Cys Arg Ala Asp Arg Val Asp Arg Thr Gln Gln  
290 295 300

Phe Ala Glu Asp Val Leu Pro Tyr Ile Glu Ala Ser Glu Leu Val Leu  
305 310 315 320

Ile Gly Glu Thr Thr Glu Pro Ile Val Lys Ala Tyr Glu Ala Gly Lys  
325 330 335

Ile Pro Ala Asp Lys Leu Phe Asp Phe Glu His Lys Ser Thr Glu Glu  
340 345 350

Ile Met Phe Met Leu Lys Asn Lys Leu Glu Gly Arg Val Ile Tyr Gly  
355 360 365

Val Gly Asn Ile His Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ile Glu Lys Ile Gln  
370 375 380

Asp Tyr Lys Ile Lys Gln Leu Val Ser  
385 390

<210> 5  
<211> 450

## ES 2 603 984 T3

&lt;212&gt; ADN

<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; gen

&lt;222&gt; (1)..(450)

&lt;223&gt; ywtA

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(450)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

15

atg ttt gga tca gat tta tat atc gcc ctc att tta gga gtc tta ctc Met Phe Gly Ser Asp Leu Tyr Ile Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Leu 1               5                   10                   15	48
agt ttg att ttt gca gag aaa acg gga att gta cca gcc ggc ctc gtc Ser Leu Ile Phe Ala Glu Lys Thr Gly Ile Val Pro Ala Gly Leu Val 20               25                   30	96
gta ccg ggt tat ttg gga ctt gtc ttc aat cag ccg att ttc atg ctg Val Pro Gly Tyr Leu Gly Leu Val Phe Asn Gln Pro Ile Phe Met Leu 35               40                   45	144
ctc gtt ctt ttt gtc agt ttg ctg acg tat gtc atc gtg aaa ttc gga Leu Val Leu Phe Val Ser Leu Leu Thr Tyr Val Ile Val Lys Phe Gly 50               55                   60	192
ctt tcc aaa att atg att cta tac gga cgc aga aaa ttc gca gca atg Leu Ser Lys Ile Met Ile Leu Tyr Gly Arg Arg Lys Phe Ala Ala Met 65               70                   75                   80	240
ctg att acg gga att ctt ttg aaa atc ggt ttt gat ttt ata tat ccg Leu Ile Thr Gly Ile Leu Leu Lys Ile Gly Phe Asp Phe Ile Tyr Pro 85               90                   95	288
gtg atg ccg ttt gag att gcc gaa ttc agg gga atc gga atc atc gtg Val Met Pro Phe Glu Ile Ala Glu Phe Arg Gly Ile Gly Ile Ile Val 100              105                   110	336
ccg ggg ctg atc gcc aat acc att caa aga cag gga tta acg att acg Pro Gly Leu Ile Ala Asn Thr Ile Gln Arg Gln Gly Leu Thr Ile Thr 115              120                   125	384
ctt gga agt acg ctt tta ttg agc gga gca aca ttc gtc att atg tat Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ser Gly Ala Thr Phe Val Ile Met Tyr 130              135                   140	432
gct tac tat cta atc taa Ala Tyr Tyr Leu Ile 145	450

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 149

&lt;212&gt; PRT

20 <213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

&lt;400&gt; 6

ES 2 603 984 T3

Met Phe Gly Ser Asp Leu Tyr Ile Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Ile Phe Ala Glu Lys Thr Gly Ile Val Pro Ala Gly Leu Val  
20 25 30

Val Pro Gly Tyr Leu Gly Leu Val Phe Asn Gln Pro Ile Phe Met Leu  
35 40 45

Leu Val Leu Phe Val Ser Leu Leu Thr Tyr Val Ile Val Lys Phe Gly  
50 55 60

Leu Ser Lys Ile Met Ile Leu Tyr Gly Arg Arg Lys Phe Ala Ala Met  
65 70 75 80

Leu Ile Thr Gly Ile Leu Leu Lys Ile Gly Phe Asp Phe Ile Tyr Pro  
85 90 95

Val Met Pro Phe Glu Ile Ala Glu Phe Arg Gly Ile Gly Ile Ile Val  
100 105 110

Pro Gly Leu Ile Ala Asn Thr Ile Gln Arg Gln Gly Leu Thr Ile Thr  
115 120 125

Leu Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr Phe Val Ile Met Tyr  
130 135 140

Ala Tyr Tyr Leu Ile  
145

<210> 7  
<211> 1170  
5 <212> ADN  
<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

10 <220>  
<221> gen  
<222> (1)..(1170)  
<223> ywtB

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1170)  
<223>

<400> 7

## ES 2 603 984 T3

atg aaa aaa caa ctg aac ttt cag gaa aaa ctg ctg aag ttg acg aag Met Lys Lys Gln Leu Asn Phe Gln Glu Lys Leu Leu Lys Leu Thr Lys 1 5 10 15	48
cag gag aaa aag aaa aca aac aag cac gtc ttt atc gta ttg ccc gtt Gln Glu Lys Lys Thr Asn Lys His Val Phe Ile Val Leu Pro Val 20 25 30	96
att ttc tgt tta atg ttt gtc ttt act tgg gtc gga agc gcc aaa act Ile Phe Cys Leu Met Phe Val Phe Thr Trp Val Gly Ser Ala Lys Thr 35 40 45	144
cct tcg caa atg gac aaa aaa gaa gat gcc aag ctt aca gct act ttt Pro Ser Gln Met Asp Lys Lys Glu Asp Ala Lys Leu Thr Ala Thr Phe 50 55 60	192
gtt ggc gat atc atg atg gga aga aac gta gaa aaa gtg aca aac ttg Val Gly Asp Ile Met Met Gly Arg Asn Val Glu Lys Val Thr Asn Leu 65 70 75 80	240
cac ggt tcg gaa agt gtc ttc aaa aat gtg aag ccg tac ttt aat gtg His Gly Ser Glu Ser Val Phe Lys Asn Val Lys Pro Tyr Phe Asn Val 85 90 95	288
tca gat ttt atc aca gga aac ttt gaa aac cct gta acc aat gca aag Ser Asp Phe Ile Thr Gly Asn Phe Glu Asn Pro Val Thr Asn Ala Lys 100 105 110	336
gac tat caa gag gca gaa aag aac atc cat ctg caa acg aat caa gaa Asp Tyr Gln Glu Ala Glu Lys Asn Ile His Leu Gln Thr Asn Gln Glu 115 120 125	384
tca gtc gaa aca ttg aaa aag ctg aac ttc agc gta ctg aat ttt gcc Ser Val Glu Thr Leu Lys Leu Asn Phe Ser Val Leu Asn Phe Ala 130 135 140	432
aac aac cat gcg atg gac tac ggg gaa gac ggt ttg aag gat acg ctc Asn Asn His Ala Met Asp Tyr Gly Glu Asp Gly Leu Lys Asp Thr Leu 145 150 155 160	480
aat aaa ttt tca aat gag aat ctg gag ctt gtc gga gca gga aat aat Asn Lys Phe Ser Asn Glu Asn Leu Glu Leu Val Gly Ala Gly Asn Asn 165 170 175	528
ctt gaa gac gcg aaa cag cac gta tcc tat cag aat gtg aac ggc gta Leu Glu Asp Ala Lys Gln His Val Ser Tyr Gln Asn Val Asn Gly Val 180 185 190	576

## ES 2 603 984 T3

aaa att gca acg ctc ggt ttt aca gac gtc tac aca aag aac ttt aca Lys Ile Ala Thr Leu Gly Phe Thr Asp Val Tyr Thr Lys Asn Phe Thr 195 200 205	624
gcc aaa aag aac aga ggc gga gtg ctg ccg ctc agt ccg aaa atc ttt Ala Lys Lys Asn Arg Gly Gly Val Leu Pro Leu Ser Pro Lys Ile Phe 210 215 220	672
att cca atg att gcg gaa gca tcg aaa aaa gcg gat ctt gtc ctt gtc Ile Pro Met Ile Ala Glu Ala Ser Lys Lys Ala Asp Leu Val Leu Val 225 230 235 240	720
cat gtg cac tgg gga caa gaa tat gac aat gaa ccg aac gac aga cag His Val His Trp Gly Gln Glu Tyr Asp Asn Glu Pro Asn Asp Arg Gln 245 250 255	768
aag gat ctg gcc aag gcg att gca gat gcc gga gca gat gtc atc atc Lys Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Asp Ala Gly Ala Asp Val Ile Ile 260 265 270	816
ggc gct cat ccc cat gtt ctc gaa ccg atc gaa gtg tat aac ggt act Gly Ala His Pro His Val Leu Glu Pro Ile Glu Val Tyr Asn Gly Thr 275 280 285	864
gtg att ttc tac agc ctc ggc aac ttt gta ttt gat cag ggc tgg tca Val Ile Phe Tyr Ser Leu Gly Asn Phe Val Phe Asp Gln Gly Trp Ser 290 295 300	912
aga aca cgg gac agc gcg ctt gta caa tac cat tta atg aat gac ggc Arg Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Gln Tyr His Leu Met Asn Asp Gly 305 310 315 320	960
aaa ggg cgc ttt gag gta acg cct ctc aac att cgc gaa gca acg ccg Lys Gly Arg Phe Glu Val Thr Pro Leu Asn Ile Arg Glu Ala Thr Pro 325 330 335	1008
acg cct tta ggc aag agc gac ttc tta aaa cga aaa gcg atc ttc cgt Thr Pro Leu Gly Lys Ser Asp Phe Leu Lys Arg Lys Ala Ile Phe Arg 340 345 350	1056
caa ttg aca aaa gga aca aac ctc gac tgg aaa gaa gag aac gga aaa Gln Leu Thr Lys Gly Thr Asn Leu Asp Trp Lys Glu Glu Asn Gly Lys 355 360 365	1104
tta acg ttt gaa gtc gat cat gcg gac aag ctg aaa aat aat aaa aac Leu Thr Phe Glu Val Asp His Ala Asp Lys Leu Lys Asn Asn Lys Asn 370 375 380	1152
gga gtg gtg aac aaa tga Gly Val Val Asn Lys 385	1170

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 389

&lt;212&gt; PRT

<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

&lt;400&gt; 8

ES 2 603 984 T3

Met Lys Lys Gln Leu Asn Phe Gln Glu Lys Leu Leu Lys Leu Thr Lys  
1 5 10 15

Gln Glu Lys Lys Thr Asn Lys His Val Phe Ile Val Leu Pro Val  
20 25 30

Ile Phe Cys Leu Met Phe Val Phe Thr Trp Val Gly Ser Ala Lys Thr  
35 40 45

Pro Ser Gln Met Asp Lys Lys Glu Asp Ala Lys Leu Thr Ala Thr Phe  
50 55 60

Val Gly Asp Ile Met Met Gly Arg Asn Val Glu Lys Val Thr Asn Leu  
65 70 75 80

His Gly Ser Glu Ser Val Phe Lys Asn Val Lys Pro Tyr Phe Asn Val  
85 90 95

Ser Asp Phe Ile Thr Gly Asn Phe Glu Asn Pro Val Thr Asn Ala Lys  
100 105 110

Asp Tyr Gln Glu Ala Glu Lys Asn Ile His Leu Gln Thr Asn Gln Glu  
115 120 125

Ser Val Glu Thr Leu Lys Lys Leu Asn Phe Ser Val Leu Asn Phe Ala  
130 135 140

Asn Asn His Ala Met Asp Tyr Gly Glu Asp Gly Leu Lys Asp Thr Leu  
145 150 155 160

Asn Lys Phe Ser Asn Glu Asn Leu Glu Leu Val Gly Ala Gly Asn Asn  
165 170 175

Leu Glu Asp Ala Lys Gln His Val Ser Tyr Gln Asn Val Asn Gly Val  
180 185 190

Lys Ile Ala Thr Leu Gly Phe Thr Asp Val Tyr Thr Lys Asn Phe Thr  
195 200 205

Ala Lys Lys Asn Arg Gly Gly Val Leu Pro Leu Ser Pro Lys Ile Phe  
210 215 220

Ile Pro Met Ile Ala Glu Ala Ser Lys Lys Ala Asp Leu Val Leu Val  
225 230 235 240

ES 2 603 984 T3

His Val His Trp Gly Gln Glu Tyr Asp Asn Glu Pro Asn Asp Arg Gln  
245 250 255

Lys Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Asp Ala Gly Ala Asp Val Ile Ile  
260 265 270

Gly Ala His Pro His Val Leu Glu Pro Ile Glu Val Tyr Asn Gly Thr  
275 280 285

Val Ile Phe Tyr Ser Leu Gly Asn Phe Val Phe Asp Gln Gly Trp Ser  
290 295 300

Arg Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Gln Tyr His Leu Met Asn Asp Gly  
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Glu Val Thr Pro Leu Asn Ile Arg Glu Ala Thr Pro  
325 330 335

Thr Pro Leu Gly Lys Ser Asp Phe Leu Lys Arg Lys Ala Ile Phe Arg  
340 345 350

Gln Leu Thr Lys Gly Thr Asn Leu Asp Trp Lys Glu Glu Asn Gly Lys  
355 360 365

Leu Thr Phe Glu Val Asp His Ala Asp Lys Leu Lys Asn Asn Lys Asn  
370 375 380

Gly Val Val Asn Lys  
385

5 <210> 9  
<211> 1245  
<212> ADN  
<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

10 <220>  
<221> gen  
<222> (1)..(1245)  
<223> ywtD

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1295)  
<223>

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> Codón inicial traducido como Met.

<400> 9

ES 2 603 984 T3

ttt ataaaaa gca aac aaa aag ttg gtt ttg ttt tgt gga att Leu Ile Lys Lys Ala Ala Asn Lys Lys Leu Val Leu Phe Cys Gly Ile 1 5 10 15	48
 gct gtg ctt tgg atg tct tta ttt tta acg aat cat aat gat gta cgc Ala Val Leu Trp Met Ser Leu Phe Leu Thr Asn His Asn Asp Val Arg 20 25 30	96
 gcc gat acg atc ggc gag aaa ata gct gaa act gcc aga cag ctt gag Ala Asp Thr Ile Gly Glu Lys Ile Ala Glu Thr Ala Arg Gln Leu Glu 35 40 45	144
 ggc gct aaa tac agc tac ggc gga gag aag ccc aaa acg ggg ttt gac Gly Ala Lys Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Lys Pro Lys Thr Gly Phe Asp 50 55 60	192
 tcg tca ggc ttt gtg caa tat gtg ttt caa tcg ctc gat att acg ctt Ser Ser Gly Phe Val Gln Tyr Val Phe Gln Ser Leu Asp Ile Thr Leu 65 70 75 80	240
 ccg aga acg gta aag gaa caa tcg act ctt ggg agc agt gtc ggc cgt Pro Arg Thr Val Lys Glu Gln Ser Thr Leu Gly Ser Ser Val Gly Arg 85 90 95	288
 cag cag ctc gaa aag ggg gac ctt gtc ttt ttc aag aat gcc gag ctg Gln Gln Leu Glu Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Lys Asn Ala Glu Leu 100 105 110	336
 gaa tcg gac gga ccg acc cat gtc gcc atc tat ttg gga aat gat caa Glu Ser Asp Gly Pro Thr His Val Ala Ile Tyr Leu Gly Asn Asp Gln 115 120 125	384
 atc atc cac agc aca aaa tca aac ggg gtt gtc gtg aca aag ctt gaa Ile Ile His Ser Thr Lys Ser Asn Gly Val Val Val Thr Lys Leu Glu 130 135 140	432
 ggc agc tct tac tgg agc tcg ggg tat ttt aaa gct aaa agg atc aca Gly Ser Ser Tyr Trp Ser Ser Gly Tyr Phe Lys Ala Lys Arg Ile Thr 145 150 155 160	480
 aaa gag cct gag att tcg atg gat cct gtc gtt caa aaa gca aaa agc Lys Glu Pro Glu Ile Ser Met Asp Pro Val Val Gln Lys Ala Lys Ser 165 170 175	528
 tat gtc ggt gtt cct tat gta ttt gga ggc aac tct ccg gat ctc gga Tyr Val Gly Val Pro Tyr Val Phe Gly Gly Asn Ser Pro Asp Leu Gly 180 185 190	576
 ttt gac tgt tcg ggg ttg acc caa tac gtc ttc aga gag gtg ctc ggc Phe Asp Cys Ser Gly Leu Thr Gln Tyr Val Phe Arg Glu Val Leu Gly 195 200 205	624

## ES 2 603 984 T3

gtt tat ttg cca agg tcg gct gaa cag caa tgg gct gtc ggt caa aag Val Tyr Leu Pro Arg Ser Ala Glu Gln Gln Trp Ala Val Gly Gln Lys 210 215 220	672
gtg aag ctt gaa gat atc cgg ccg ggt gat gtt ttg ttt ttc agc aat Val Lys Leu Glu Asp Ile Arg Pro Gly Asp Val Leu Phe Phe Ser Asn 225 230 235 240	720
acg tac aaa ccg gga ata tcc cat aac ggc atc tat gcc ggg ggc ggg Thr Tyr Lys Pro Gly Ile Ser His Asn Gly Ile Tyr Ala Gly Gly 245 250 255	768
cg <sup>g</sup> ttt atc cat gc <sup>g</sup> agc cgt tca aat aaa gtg acg ata tcc tac ttg Arg Phe Ile His Ala Ser Arg Ser Asn Lys Val Thr Ile Ser Tyr Leu 260 265 270	816
tcg gct tcc tat tgg cag aag aag ttc aca gga gtc aga cgt ttt gac Ser Ala Ser Tyr Trp Gln Lys Lys Phe Thr Gly Val Arg Arg Phe Asp 275 280 285	864
aac atg tcc ctg cca aaa aat ccg att gta tcc gaa gcc atc agg cat Asn Met Ser Leu Pro Lys Asn Pro Ile Val Ser Glu Ala Ile Arg His 290 295 300	912
atc ggc gaa gtc ggt tat caa aaa ggc ggc aca tcg cct aaa gaa ggc Ile Gly Glu Val Gly Tyr Gin Lys Gly Gly Thr Ser Pro Lys Glu Gly 305 310 315 320	960
ttt gat acg gct ggg ttt atc caa tat gtc tac aaa acg gcg gca gga Phe Asp Thr Ala Gly Phe Ile Gln Tyr Val Tyr Lys Thr Ala Ala Gly 325 330 335	1008
gtg gag ctt ccg agg tat gct gac aaa caa tac agc acg ggt aag aaa Val Glu Leu Pro Arg Tyr Ala Asp Lys Gln Tyr Ser Thr Gly Lys Lys 340 . 345 350	1056
att acc aaa cag gag ctt gag cct gga gac atc gtc ttc ttt aaa gga Ile Thr Lys Gln Glu Leu Glu Pro Gly Asp Ile Val Phe Phe Lys Gly 355 360 365	1104
acc act gtt atg aat ccc gcc atc tat atc gga aac ggc cag gtc gtt Thr Thr Val Met Asn Pro Ala Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Gln Val Val 370 375 380	1152
ctt gtc acc ttg tct gcc ggt gta acg aca gca gat atg gag acg agc Leu Val Thr Leu Ser Ala Gly Val Thr Thr Ala Asp Met Glu Thr Ser 385 390 395 400	1200
gcc tat tgg aaa gat aaa tac gcc gga agc gtc aga att gag tag Ala Tyr Trp Lys Asp Lys Tyr Ala Gly Ser Val Arg Ile Glu 405 410	1245

<210> 10  
<211> 414

5 <212> PRT  
<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

<220>  
<221> misc\_feature

10 <222> (1)..(3)  
<223> Codón inicial traducido como Met.

<400> 10

ES 2 603 984 T3

Leu Ile Lys Lys Ala Ala Asn Lys Lys Leu Val Leu Phe Cys Gly Ile  
1 5 10 15

Ala Val Leu Trp Met Ser Leu Phe Leu Thr Asn His Asn Asp Val Arg  
20 25 30

Ala Asp Thr Ile Gly Glu Lys Ile Ala Glu Thr Ala Arg Gln Leu Glu  
35 40 45

Gly Ala Lys Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Lys Pro Lys Thr Gly Phe Asp  
50 55 60

Ser Ser Gly Phe Val Gln Tyr Val Phe Gln Ser Leu Asp Ile Thr Leu  
65 70 75 80

Pro Arg Thr Val Lys Glu Gln Ser Thr Leu Gly Ser Ser Val Gly Arg  
85 90 95

Gln Gln Leu Glu Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Lys Asn Ala Glu Leu  
100 105 110

Glu Ser Asp Gly Pro Thr His Val Ala Ile Tyr Leu Gly Asn Asp Gln  
115 120 125

Ile Ile His Ser Thr Lys Ser Asn Gly Val Val Val Thr Lys Leu Glu  
130 135 140

Gly Ser Ser Tyr Trp Ser Ser Gly Tyr Phe Lys Ala Lys Arg Ile Thr  
145 150 155 160

Lys Glu Pro Glu Ile Ser Met Asp Pro Val Val Gln Lys Ala Lys Ser  
165 170 175

Tyr Val Gly Val Pro Tyr Val Phe Gly Gly Asn Ser Pro Asp Leu Gly  
180 185 190

Phe Asp Cys Ser Gly Leu Thr Gln Tyr Val Phe Arg Glu Val Leu Gly  
195 200 205

Val Tyr Leu Pro Arg Ser Ala Glu Gln Gln Trp Ala Val Gly Gln Lys

ES 2 603 984 T3

210                    215                    220

Val Lys Leu Glu Asp Ile Arg Pro Gly Asp Val Leu Phe Phe Ser Asn  
225                    230                    235                    240

Thr Tyr Lys Pro Gly Ile Ser His Asn Gly Ile Tyr Ala Gly Gly Gly  
245                    250                    255

Arg Phe Ile His Ala Ser Arg Ser Asn Lys Val Thr Ile Ser Tyr Leu  
260                    265                    270

Ser Ala Ser Tyr Trp Gln Lys Lys Phe Thr Gly Val Arg Arg Phe Asp  
275                    280                    285

Asn Met Ser Leu Pro Lys Asn Pro Ile Val Ser Glu Ala Ile Arg His  
290                    295                    300

Ile Gly Glu Val Gly Tyr Gln Lys Gly Gly Thr Ser Pro Lys Glu Gly  
305                    310                    315                    320

Phe Asp Thr Ala Gly Phe Ile Gln Tyr Val Tyr Lys Thr Ala Ala Gly  
325                    330                    335

Val Glu Leu Pro Arg Tyr Ala Asp Lys Gln Tyr Ser Thr Gly Lys Lys  
340                    345                    350

Ile Thr Lys Gln Glu Leu Glu Pro Gly Asp Ile Val Phe Phe Lys Gly  
355                    360                    365

Thr Thr Val Met Asn Pro Ala Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Gln Val Val  
370                    375                    380

Leu Val Thr Leu Ser Ala Gly Val Thr Thr Ala Asp Met Glu Thr Ser  
385                    390                    395                    400

Ala Tyr Trp Lys Asp Lys Tyr Ala Gly Ser Val Arg Ile Glu  
405                    410

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para reducir moco atribuible a poli-gamma-glutamato, **caracterizado por** impedir la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* con una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como subunidad de una enzima de este tipo.
- 5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** está impedita la función de la proteína YwtB durante la fermentación del microorganismo.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por** una reducción de hasta el 50 % del moco atribuible a poliaminoácidos.
- 10 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1, 2 o 3, **caracterizado porque** el microorganismo
- a) es una bacteria, y/o
  - b) es una bacteria Gram negativa, o
  - c) es una bacteria Gram positiva.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el microorganismo está seleccionado de uno de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium*.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** las siguientes etapas para impedir la función de la proteína YwtB codificada por el gen *ywtB*:
- 20 a) seleccionar dos regiones de la secuencia SEQ ID NO. 7,
- b) clonar las regiones en un vector, de modo que flanquean una parte que codifica para una proteína no activa, o de modo que se suceden directamente omitiendo la región entremedias,
  - c) delecionar el gen *ywtB* con el vector producido en la etapa b), y
  - d) detectar la delección del gen.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la función de la proteína YwtB (CapA, PsgA) codificada por el gen *ywtB* está impedita mediante el uso de un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción, que comprende preferentemente las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para la proteína.
- 30 8. Procedimiento para la producción de un material recicitable mediante fermentación de un microorganismo, **caracterizado porque** durante la fermentación está reducida la formación de poli-gamma-glutamato por el microorganismo impidiendo la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* con una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como subunidad de una enzima de este tipo.
- 35 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* está impedita mediante un procedimiento con las siguientes etapas:
- a) seleccionar dos regiones de la secuencia SEQ ID NO. 7,
  - b) clonar las regiones en un vector, de modo que flanquean una parte que codifica para una proteína no activa, o de modo que se suceden directamente omitiendo la región entremedias,
  - c) delecionar el gen *ywtB* con el vector producido en la etapa b), y
  - d) detectar la delección del gen.
- 40 10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado porque** la función de la proteína YwtB (CapA, PsgA) codificada por el gen *ywtB* está impedita mediante el uso de un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción, que comprende preferentemente las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para la proteína.
- 45 11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9 o 10, **caracterizado porque** el material recicitable es material natural, un complemento alimentario o un compuesto farmacéuticamente relevante o una enzima.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** la enzima está seleccionada del grupo de las α-amilasas, proteasas, celulasas, lipasas, oxidoreductasas, peroxidases, laccasas, oxidases y hemicelulasas.
- 50 13. Uso de un ácido nucleico que codifica para una proteína YwtB (CapA, PgsA) implicada en la formación de poli-gamma-glutamato con una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, o en cada caso partes de la misma para impedir la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) como una enzima implicada en la formación de poliaminoácidos o como

subunidad de una enzima de este tipo.

14. Uso de un ácido nucleico que codifica para una proteína YwtB (CapA, PgsA) implicada en la formación de poli-gamma-glutamato con una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8, o en cada caso partes de la misma para reducir hasta el 50 % el moco atribuible a poli-gamma-glutamato durante la fermentación de un microorganismo.
- 5           15. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado porque** el ácido nucleico tiene la secuencia SEQ ID NO. 7.
- 10          16. Uso de un ácido nucleico con una mutación por delección o inserción que comprende las secuencias borde que comprenden en cada caso al menos de 70 a 150 posiciones de ácido nucleico de la región que codifica para una proteína YwtB (CapA, PsgA) con la secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 8 para la reducción del moco atribuible a poli-gamma-glutamato durante la fermentación de un microorganismo.
- 15          17. Microorganismo, en el que el gen *ywtB* que codifica para un producto génico implicado en la formación de poli-gamma-glutamato está funcionalmente inactivado, teniendo la secuencia de nucleótido codificante *ywtB* una secuencia de nucleótido que presenta una identidad de al menos el 94 % con la secuencia de nucleótido indicada en la SEQ ID NO. 7.
18. Microorganismo de acuerdo con la reivindicación 17, en el que se trata de *Bacillus licheniformis*.

Figura 1 / Parte 1

B.l. ywtB	ATGAAAAAAC AACTGAAC TT TCAGGAAAAA CTGCTGAAGT TGACGAAGCA	50
B.s. ywtB	ATGAAAAAAG AACTGAGCTT TCATGAAAAG CTGCTAAAGC TGACAAAACA	
	51	100
B.l. ywtB	GGAGAAAAAG AAAACAAACA AGCACGTCTT TATCGTATTG CCCGTTATTT	
B.s. ywtB	GCAAAAAAAG AAAACCAATA AGCACGTATT TATTGCCATT CCGATCGTTT	
	101	150
B.l. ywtB	TCTGTTAAT GTTTGTCTT ACTTGGGTCG GAAGGCCAA AACTCCTTCG	
B.s. ywtB	TTGTCCTTAT GTTCGTTTC ATGTGGCGG GAAAAGCGGA AACGCC...G	
	151	200
B.l. ywtB	CAAATGGACA AAAAGAAGA TGCCAAGCTT ACAGCTACTT TTGTTGGCGA	
B.s. ywtB	AAGGTCAAAA CGTATTCTGA CGACGTACTC TCAGCCTCAT TTGTAGGCAG	
	201	250
B.l. ywtB	TATCATGATG GGAAGAACG TAGAAAAAGT GACAAACTTG CACGGTTCCG	
B.s. ywtB	TATTATGATG GGACGCTATG TTGAAAAAGT AACGGAGCAA AAAGGGGCAG	
	251	300
B.l. ywtB	AAAGTGTCTT CAAAAATGTG AAGCCGTACT TTAATGTGTC AGATTTTATC	
B.s. ywtB	ACAGTATTTT TCAATATGTT GAACCGATCT TTAGAGCCTC GGATTATGTA	
	301	350
B.l. ywtB	ACAGGAAACT TTGAAAACCC TGTAACCAAT GCAAAGGACT ATCAAGAGGC	
B.s. ywtB	GCAGGAAACT TTGAAAACCC GGTAACCTAT CAAAAGAATT ATAAACAAAGC	
	351	400
B.l. ywtB	AGAAAAGAAC ATCCATCTGC AAACGAATCA AGAATCAGTC GAAACATTGA	
B.s. ywtB	AGATAAAGAG ATTCACTCTGC AGACGAATAA GGAATCAGTG AAAGTCTTGA	
	401	450
B.l. ywtB	AAAAGCTGAA CTTCAGCGTA CTGAATTTG CCAACAACCA TGCGATGGAC	
B.s. ywtB	AGGATATGAA TTTCACGGTT CTCAACAGCG CCAACAACCA CGCAATGGAT	
	451	500
B.l. ywtB	TACGGGGAAG ACGGTTTGAA GGATACGCTC AATAAATTT CAAATGAGAA	
B.s. ywtB	TACGGCGTTC AGGGCATGAA AGATACGCTT GGAGAATTTG CGAAGCAAAA	
	501	550
B.l. ywtB	TCTGGAGCTT GTCGGAGCAG GAAATAATCT TGAAGACGCG AAACAGCACG	
B.s. ywtB	TCTTGATATC GTTGGAGCGG GATACAGCTT AAGTGATGCG AAAAAGAAAA	
	551	600
B.l. ywtB	TATCCTATCA GAATGTGAAC GGC GTAAAAA TTGCAACGCT CGGTTTACA	
B.s. ywtB	TTTCGTACCA GAAAGTCAAC GGGGTAACGA TTGCGACGCT TGGCTTTACC	

Figura 1 / Parte 2

	601	650
B.l. ywtB	GACGTCTACA CAAAGAACTT TACAGCCAAA AAGAACAGAG GCGGAGTGCT	
B.s. ywtB	GATGTGTCGG GGAAAGGTTT CGCGGCTAAA AAGAATACGC CGGGCGTGCT	
	651	700
B.l. ywtB	GCCGCTCAG. TCCGAAAATC TTTATTCCAA TGATTGCGGA AGCATCGAAA	
B.s. ywtB	GCC.CGCAGA TCCTGAAATC TTCATCCCTA TGATTCAGA AGCGAAAAAA	
	701	750
B.l. ywtB	AAAGCGGATC TTGTCCTTGT CCATGTGCAC TGGGGACAAG AATATGACAA	
B.s. ywtB	CATGCGGACA TTGTTGTTGT GCAGTCACAC TGGGGACAAG AGTATGACAA	
	751	800
B.l. ywtB	TGAACCGAAC GACAGACAGA AGGATCTGGC CAAGGCGATT GCAGATGCCG	
B.s. ywtB	TGATCCAAAT GACCGCCAGC GCCAGCTTGC AAGAGCCATG TCTGATGCCG	
	801	850
B.l. ywtB	GAGCAGATGT CATCATCGGC GCTCATCCCC ATGTTCTCGA ACCGATCGAA	
B.s. ywtB	GAGCTGACAT CATCGTCGGC CATCACCCGC ACGTCTTAGA ACCGATTGAA	
	851	900
B.l. ywtB	GTGTATAACG GTACTGTGAT TTTCTACAGC CTCGGCAACT TTGTATTTGA	
B.s. ywtB	GTATATAACG GAACCGTCAT TTTCTACAGC CTCGGCAACT TTGTCTTTGA	
	901	950
B.l. ywtB	TCAGGGCTGG TCAAGAACAC GGGACAGCGC GCTTGTACAA TACCATTAA	
B.s. ywtB	CCAAGGCTGG ACGAGAACAA GAGACAGTGC ACTGGTTCAAG TATCACCTGA	
	951	1000
B.l. ywtB	TGAATGACGG CAAAGGGCGC TTTGAGGTAA CGCCTCTCAA CATTGCGAA	
B.s. ywtB	AGAAAAATGG AACAGGACGC TTTGAAGTGA CACCGATCGA TATCCATGAA	
	1001	1050
B.l. ywtB	GCAACGCCGA CGCCTTTAGG CAAGAGCGAC TTCTTAAAC GAAAAGCGAT	
B.s. ywtB	GCGACACCTG CGCCT...GT GAAAAAAGAC AGCCTTAAAC AGAAAACCAT	
	1051	1100
B.l. ywtB	CTTCCGTCAA TTGACAAAAG GAACAAACCT CGACTGGAAA GAAGAGAACG	
B.s. ywtB	TATTGCGAA CTGACGAAAG ACTCTAATT CGCTTGGAAA GTAGAAGACG	
	1101	1150
B.l. ywtB	GAAAATTAAC GTTGAGTC GATCATCGGG ACAAGCTGAA AAATAATAAA	
B.s. ywtB	GAAAAGTAC GTTGATATT GATCATAGTG ACAAAACTAAA ATCTAAA...	
	1151	1171
B.l. ywtB	AACGGAGTGG TGAACAAATG A	
B.s. ywtB	..... . . . . .	

Figura 2

B.l. YwtB	MKKQLNFQEK	LLKLTKQEKK	KTNKHVFIVL	PVIFCLMFVF	TWVGSAKTPS	50
B.s. YwtB	MKKELSFHEK	LLKLTKQQKK	KTNKHVFIAI	PIVFVLMFAF	MWAGKAETP.	
B.l. YwtB	QMDKKEDAKL	TATFVGDIMM	GRNVEKVTLN	HGSESVFKNV	KPYFNVSDFI	100
B.s. YwtB	KVKTYSDDVL	SASFVGDIMM	GRYVEKVTEQ	KGADSIFQYV	EPIFRASDYV	
B.l. YwtB	TGNFENPVN	AKDYQEAEKN	IHLQTQNQESV	ETLKKLNFSV	LNFANNHAMD	150
B.s. YwtB	AGNFENPVY	QKNYKQADKE	IHLQTNKESV	KVLKDMNFTV	LNSANNHAMD	
B.l. YwtB	YGEDGLKDTL	NKFSNENLEL	VGAGNNLEDA	KQHVSYQNVN	GVKIATLGFT	200
B.s. YwtB	YGVQGMKDTL	GEFAKQNLDI	VGAGYSLSDA	KKKISYQKVN	GVTIATLGFT	
B.l. YwtB	DVYTKNFTAK	KNRGGVPLS	PKIFIPMIAE	ASKKADLVLV	HVHWGQEYDN	250
B.s. YwtB	DVSGKGFAAK	KNTPGVLPAD	PEIFIPMISE	AKKHADIVVV	QSHWGQEYDN	
B.l. YwtB	EPNDRQKDLA	KAIADAGADV	IIGAHPHVLE	PIEVYNGTVI	FYSLGNFVFD	300
B.s. YwtB	DPNDRQRQLA	RAMSDAGADI	IVGHHPHVLE	PIEVYNGTVI	FYSLGNFVFD	
B.l. YwtB	QGWSRTRDSA	LVQYHLMNDG	KGRFEVTPLN	IREATPTPLG	KSDFLKRKAI	350
B.s. YwtB	QGWTRTRDSA	LVQYHLKKNG	TGRFEVTPID	IHEATPAPV.	KKDSLKQKTI	
B.l. YwtB	FRQLTKGTNL	DWKEENGKLT	FEVDHADKLK	NNKNGVVNK		389
B.s. YwtB	IRELTKDSNF	AWKVEDGKLT	FDIDHSDKLK	SK.....		