

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 técnico. En el primer caso, se aprovechan y/o modifican las propiedades metabólicas de 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 genéticas de las cepas empleadas.

25 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 dificultados durante la fermentación o el procesamiento.

30 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 nutriente, el valor de pH o la tasa de formación de CO₂. 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 reciclable 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 del proceso de procesamiento global.

45 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 nutriente 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.

50 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 disrupción 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-polyglutamic 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 gen 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-glutamil-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 reciclable 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) deleccionar el gen *ywtB* con el vector producido en la etapa b), y
d) detectar la deleción 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 deleción 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 reciclable 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) deleccionar el gen *ywtB* con el vector producido en la etapa b), y
d) detectar la deleción 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 deleción 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 reciclable 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, peroxidasas, lacasas, oxidasas 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 deleción 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 divulgan 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.

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.

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.

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).

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 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%.

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.

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
20 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*.

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
25 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.

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
30 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.

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

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

De este modo, existen diferencias especialmente entre especies relacionadas de lejos en cuando al uso de codones
40 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.

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

45 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
50 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
55 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.

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*.

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).

Además se divulgan 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 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.

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.

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.

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).

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

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

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.

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).

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 públicas 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.

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 lentus*, *B. licheniformis*, *B.*

amiloliquefaciens, *B. subtilis*, *B. globigii* o *B. alcalophilus*, *Staphylococcus carnosus* 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 desprender 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 divulgan 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
15 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-
20 Primer correspondientes para especies relacionadas, en particular por medio de las regiones conservadas identificables en los alineamientos de las Figuras 1 y 2.

- 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
25 proteína.

- 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
30 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.

- 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
35 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.

- 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,
45 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
50 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>).

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* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 o *Klebsiella planticola* (Rf).

- 5 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 lentus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *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.

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

- 15 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.

- 20 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.

- 25 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.

- 30 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 α -amilasas, proteasas, celulasas, lipasas, oxidorreductasas, peroxidasas, lacasas, oxidasas y hemicelulasas.

- 35 Enzimas industriales, que se producen con procedimientos de este tipo, se usan por ejemplo en la industria alimentaria. De este modo las α -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.

- 40 Muchas de estas enzimas proceden originalmente de especies de *Bacillus* y se producen por lo tanto de maneja 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.

- 45 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 divulgan 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.

- 50 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
- 20 gel de agarosa, se desfosforilaron y se ligaron como fragmentos de extremos romos (*blunt ended*) en los sitios de corte de restricción SmaI 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
- 25 enzima SauIII 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.

- A partir de las bacterias *E. coli* DH5 α 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
- 30 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.).

- 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
- 35 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.

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
- 45 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

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 Institute 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
<i>ywsC</i> / 1	<i>ywsC</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	75,4
<i>ywsC'</i> / 3	<i>ywsC</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	78,5
<i>ywtA</i> / 5	<i>ywsA</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	77,8
<i>YwtB</i> / 7	<i>ywsB</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	67,1
<i>ywtD</i> / 9	<i>ywtD</i> de <i>B. subtilis</i>	AB080748	62,3
<i>YwsC</i> / 2	<i>YwsC</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	86,1
<i>YwsC'</i> / 4	<i>YwsC</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	89,6
<i>YwtA</i> / 6	<i>YwsA</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	89,9
<i>YwtB</i> / 8	<i>YwsB</i> de <i>B. subtilis</i>	AB046355.1	65,8
<i>YwtD</i> / 10	<i>YwsD</i> 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 amyloliquefaciens*"; 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 permaneciera 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 deleccionarse, 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 clonan 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 clonan 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

<160> 10

40 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1230

45 <212> ADN

<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

<220>

<221> gen

50 <222> (1)..(1230)

<223> ywsC

<220>

<221> CDS

55 <222> (1)..(1230)

<223>

<400> 1

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

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

```

att gga gaa aca aca gag ccg atc gtc aaa gca tat gaa gca ggc aaa      1056
Ile Gly Glu Thr Thr Glu Pro Ile Val Lys Ala Tyr Glu Ala Gly Lys
      340                      345                      350

att cct gcg gac aag ctg ttt gat ttt gag cac aaa tca acg gaa gaa      1104
Ile Pro Ala Asp Lys Leu Phe Asp Phe Glu His Lys Ser Thr Glu Glu
      355                      360                      365

atc atg ttc atg ctg aaa aac aag ctt gag ggc cgc gtt att tac gga      1152
Ile Met Phe Met Leu Lys Asn Lys Leu Glu Gly Arg Val Ile Tyr Gly
      370                      375                      380

gtc gga aat atc cac gga gca gcg gag cct ctc att gaa aaa ata caa      1200
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      1230
Asp Tyr Lys Ile Lys Gln Leu Val Ser
      405

```

<210> 2
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

 <400> 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                      80

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

```

5

10

Met 130	Ala	Val	Asn	Pro	Asp	Tyr 135	Gln	Ile	Ile	Phe	Gln 140	Glu	Glu	Leu	Leu
Gln 145	Ala	Asn	Ile	Gly	Val 150	Ile	Val	Asn	Val	Leu 155	Glu	Asp	His	Met	Asp 160
Val	Met	Gly	Pro	Thr 165	Leu	Asp	Glu	Ile	Ala 170	Glu	Ala	Phe	Thr	Ala 175	Thr
Ile	Pro	Tyr	Asn 180	Gly	His	Leu	Val	Ile 185	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr 190	Thr	Asp
Phe	Phe	Lys 195	Gln	Ile	Ala	Lys	Glu 200	Arg	Asn	Thr	Lys	Val 205	Ile	Val	Ala
Asp	Asn 210	Ser	Lys	Ile	Thr	Asp 215	Glu	Tyr	Leu	Arg	Gln 220	Phe	Glu	Tyr	Met
Val 225	Phe	Pro	Asp	Asn 230	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly 235	Val	Ala	Gln	Ala	Leu 240
Gly	Ile	Asp	Glu	Glu 245	Thr	Ala	Phe	Lys	Gly 250	Met	Leu	Asn	Ala	Pro 255	Pro
Asp	Pro	Gly 260	Ala	Met	Arg	Ile	Leu	Pro 265	Leu	Met	Asn	Ala	Lys 270	Asn	Pro
Gly	His 275	Phe	Val	Asn	Gly	Phe	Ala 280	Ala	Asn	Asp	Ala	Ala 285	Ser	Thr	Leu
Asn 290	Ile	Trp	Lys	Arg	Val	Lys 295	Glu	Ile	Gly	Tyr	Pro 300	Thr	Asp	Gln	Pro
Ile 305	Val	Ile	Met	Asn 310	Cys	Arg	Ala	Asp	Arg	Val 315	Asp	Arg	Thr	Gln	Gln 320
Phe	Ala	Glu	Asp	Val 325	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu 330	Ala	Ser	Glu	Leu	Val 335	Leu
Ile	Gly	Glu	Thr 340	Thr	Glu	Pro	Ile	Val 345	Lys	Ala	Tyr	Glu	Ala 350	Gly	Lys
Ile	Pro	Ala	Asp	Lys	Leu	Phe	Asp	Phe	Glu	His	Lys	Ser	Thr	Glu	Glu

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

<210> 3
<211> 1182
<212> ADN
<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

<220>
<221> gen
<222> (1)..(1182)
<223> ywsC'

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1182)
<223>

<400> 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	

20

ES 2 603 984 T3

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

```

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
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis* DSM 13
 <400> 4

```

Met Trp Val Met Leu Leu Ala Cys Val Ile Val Val Gly Ile Gly Ile
  1              5              10              15

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              80

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

```

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

<212> ADN
<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

<220>
<221> gen
<222> (1)..(450)
<223> ywtA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(450)
<223>

<400> 5

```

atg ttt gga tca gat tta tat atc gcc ctc att tta gga gtc tta ctc      48
Met Phe Gly Ser Asp Leu Tyr Ile Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Leu
1                               5                               10                               15

agt ttg att ttt gca gag aaa acg gga att gta cca gcc ggc ctc gtc      96
Ser Leu Ile Phe Ala Glu Lys Thr Gly Ile Val Pro Ala Gly Leu Val
                               20                               25                               30

gta ccg ggt tat ttg gga ctt gtc ttc aat cag ccg att ttc atg ctg      144
Val Pro Gly Tyr Leu Gly Leu Val Phe Asn Gln Pro Ile Phe Met Leu
                               35                               40                               45

ctc gtt ctt ttt gtc agt ttg ctg acg tat gtc atc gtg aaa ttc gga      192
Leu Val Leu Phe Val Ser Leu Leu Thr Tyr Val Ile Val Lys Phe Gly
                               50                               55                               60

ctt tcc aaa att atg att cta tac gga cgc aga aaa ttc gca gca atg      240
Leu Ser Lys Ile Met Ile Leu Tyr Gly Arg Arg Lys Phe Ala Ala Met
65                               70                               75                               80

ctg att acg gga att ctt ttg aaa atc ggt ttt gat ttt ata tat ccg      288
Leu Ile Thr Gly Ile Leu Leu Lys Ile Gly Phe Asp Phe Ile Tyr Pro
                               85                               90                               95

gtg atg ccg ttt gag att gcc gaa ttc agg gga atc gga atc atc gtg      336
Val Met Pro Phe Glu Ile Ala Glu Phe Arg Arg Gly Ile Gly Ile Ile Val
                               100                              105                              110

ccg ggg ctg atc gcc aat acc att caa aga cag gga tta acg att acg      384
Pro Gly Leu Ile Ala Asn Thr Ile Gln Arg Gln Gly Leu Thr Ile Thr
                               115                              120                              125

ctt gga agt acg ctt tta ttg agc gga gca aca ttc gtc att atg tat      432
Leu Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr Phe Val Ile Met Tyr
                               130                              135                              140

gct tac tat cta atc taa
Ala Tyr Tyr Leu Ile
145

```

<210> 6
<211> 149
<212> PRT
<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

<400> 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

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

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

<400> 7

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 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 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

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

<210> 8
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis* DSM 13
 <400> 8

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

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

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

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

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

```
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> Codón inicial traducido como Met.
```

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 414

<212> PRT

<213> *Bacillus licheniformis* DSM 13

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Codón inicial traducido como Met.

<400> 10

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

210	215	220
Val Lys Leu Glu Asp 225	Ile Arg Pro Gly Asp 230	Val Leu Phe Phe Ser Asn 235 240
Thr Tyr Lys Pro Gly 245	Ile Ser His Asn Gly 250	Ile Tyr Ala Gly Gly Gly 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.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** está impedida 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.
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.
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*:
 - 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.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) 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.
8. Procedimiento para la producción de un material reciclable 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.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) codificada por el gen *ywtB* está impedida 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.
10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado porque** la función de la proteína YwtB (CapA, PgsA) 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.
11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9 o 10, **caracterizado porque** el material reciclable 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, oxidorreductasas, peroxidasas, lacasas, oxidasas y hemicelulasas.
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.

5 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.

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, PgsA) 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

	1				50
B.l. ywtB	ATGAAAAAAC	AACTGAACTT	TCAGGAAAAA	CTGCTGAAAGT	TGACGAAGCA
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	TCTGTTTAAT	GTTTGTCTTT	ACTTGGGTCG	GAAGCGCCAA	AACTCCTTCG
B.s. ywtB	TTGTCCTTAT	GTTTCGCTTTC	ATGTGGGCGG	GAAAAGCGGA	AACGCC...G
	151				200
B.l. ywtB	CAAATGGACA	AAAAAGAAGA	TGCCAAGCTT	ACAGCTACTT	TTGTTGGCGA
B.s. ywtB	AAGGTCAAAA	CGTATTCTGA	CGACGTACTC	TCAGCCTCAT	TTGTAGGCGA
	201				250
B.l. ywtB	TATCATGATG	GGAAGAAACG	TAGAAAAAGT	GACAAACTTG	CACGGTTTCGG
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	ATAACAAGC
	351				400
B.l. ywtB	AGAAAAGAAC	ATCCATCTGC	AAACGAATCA	AGAATCAGTC	GAAACATTGA
B.s. ywtB	AGATAAAGAG	ATTTCATCTGC	AGACGAATAA	GGAATCAGTG	AAAGTCTTGA
	401				450
B.l. ywtB	AAAAGCTGAA	CTTCAGCGTA	CTGAATTTTG	CCAACAACCA	TGCGATGGAC
B.s. ywtB	AGGATATGAA	TTTCACGGTT	CTCAACAGCG	CCAACAACCA	CGCAATGGAT
	451				500
B.l. ywtB	TACGGGGAAG	ACGGTTTGAA	GGATACGCTC	AATAAATTTT	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	GGCGTAAAAA	TTGCAACGCT	CGGTTTTTACA
B.s. ywtB	TTTCGTACCA	GAAAGTCAAC	GGGGTAACGA	TTGCGACGCT	TGGCTTTACC

Figura 1 / Parte 2

	601				650
B.1. ywtB	GACGTCTACA	CAAAGAACTT	TACAGCCAAA	AAGAACAGAG	GCGGAGTGCT
B.s. ywtB	GATGTGTCCG	GGAAAGGTTT	CGCGGCTAAA	AAGAATACGC	CGGGCGTGCT
	651				700
B.1. ywtB	GCCGCTCAG.	TCCGAAAATC	TTTATTCCAA	TGATTGCGGA	AGCATCGAAA
B.s. ywtB	GCC.CGCAGA	TCCTGAAATC	TTCATCCCTA	TGATTTCAGA	AGCGAAAAAA
	701				750
B.1. ywtB	AAAGCGGATC	TTGTCCTTGT	CCATGTGCAC	TGGGGACAAG	AATATGACAA
B.s. ywtB	CATGCGGACA	TTGTTGTTGT	GCAGTCACAC	TGGGGACAAG	AGTATGACAA
	751				800
B.1. ywtB	TGAACCGAAC	GACAGACAGA	AGGATCTGGC	CAAGGCGATT	GCAGATGCCG
B.s. ywtB	TGATCCAAAT	GACCGCCAGC	GCCAGCTTGC	AAGAGCCATG	TCTGATGCGG
	801				850
B.1. ywtB	GAGCAGATGT	CATCATCGGC	GCTCATCCCC	ATGTTCTCGA	ACCGATCGAA
B.s. ywtB	GAGCTGACAT	CATCGTCGGC	CATCACCCGC	ACGTCTTAGA	ACCGATTGAA
	851				900
B.1. ywtB	GTGTATAACG	GTA CTGTGAT	TTTCTACAGC	CTCGGCAACT	TTGTATTTGA
B.s. ywtB	GTATATAACG	GAACCGTCAT	TTTCTACAGC	CTCGGCAACT	TTGTCTTTGA
	901				950
B.1. ywtB	TCAGGGCTGG	TCAAGAACAC	GGGACAGCGC	GCTTGTAACA	TACCATTTAA
B.s. ywtB	CCAAGGCTGG	ACGAGAACAA	GAGACAGTGC	ACTGGTTCAG	TATCACCTGA
	951				1000
B.1. ywtB	TGAATGACGG	CAAAGGGCGC	TTTGAGGTAA	CGCCTCTCAA	CATTCGCGAA
B.s. ywtB	AGAAAAATGG	AACAGGACGC	TTTGAAGTGA	CACCGATCGA	TATCCATGAA
	1001				1050
B.1. ywtB	GCAACGCCGA	CGCCTTTAGG	CAAGAGCGAC	TTCTTAAAAC	GAAAAGCGAT
B.s. ywtB	GCGACACCTG	CGCCT...GT	GAAAAAAGAC	AGCCTTAAAC	AGAAAACCAT
	1051				1100
B.1. ywtB	CTTCCGTCAA	TTGACAAAAG	GAACAAACCT	CGACTGGAAA	GAAGAGAACG
B.s. ywtB	TATTCGCGAA	CTGACGAAAG	ACTCTAATTT	CGCTTGAAAA	GTAAGAAGACG
	1101				1150
B.1. ywtB	GAAAATTAAC	GTTTGAAGTC	GATCATGCGG	ACAAGCTGAA	AAATAATAAA
B.s. ywtB	GAAAAC TGAC	GTTTGATATT	GATCATAGTG	ACAAACTAAA	ATCTAAA...
	1151		1171		
B.1. ywtB	AACGGAGTGG	TGAACAAATG	A		
B.s. ywtB		

Figura 2

	1		50
B.l. YwtB	MKKQLNFQEK LLKLTQKEKK KTNKHVFIVL PVIFCLMFVF TWVGS AKTPS		
B.s. YwtB	MKKELSFHEK LLKLTQQKK KTNKHVFIAI PIVFVLMFAF MWAGKAETP.		
	51		100
B.l. YwtB	QMDKKEDAKL TATFVG DIMM GRNVEKVTNL HGSESVFKNV KPYFNVSDFI		
B.s. YwtB	KVKTYSDDV L SASFVG DIMM GRYVEKVTEQ KGADSIFQYV EPIFRASDYV		
	101		150
B.l. YwtB	TGNFENPVTN AKDYQEA EKN IHLQTNQESV ETLKKLNFSV LNFANNHAMD		
B.s. YwtB	AGNFENPVTY QKNYKQADKE IHLQTNKESV KVLKDMNFTV LNSANNHAMD		
	151		200
B.l. YwtB	YGEDGLKDTL NKFSNENLEL VGAGNNLEDA KQHVSYQNVN GVKIATLGFT		
B.s. YwtB	YGVQGMKDTL GEF AKQNLDI VGAGYSLSDA KKKISYQKVN GVTIATLGFT		
	201		250
B.l. YwtB	DVYTKNFTAK KNRGGVLP LS PKIFIPMIAE ASKKADLV LV HVHWGQEYDN		
B.s. YwtB	DVSGKGFAAK KNTPGVLPAD PEIFIPMISE AKKHADIVVV QSHWGQEYDN		
	251		300
B.l. YwtB	EPNDRQKDLA KAIADAGADV IIGAHPHVLE PIEVYNGTVI FYSLGNFVFD		
B.s. YwtB	DPNDRQRQLA RAMSDAGADI IVGHHPHVLE PIEVYNGTVI FYSLGNFVFD		
	301		350
B.l. YwtB	QGWSRTRDSA LVQYHLMNDG KGRFEVTP LN IREATPTPLG KSDFLKRKAI		
B.s. YwtB	QGWTRTRDSA LVQYHLKKN G TGRFEVTPID IHEATPAPV. KKDSLKQKTI		
	351		389
B.l. YwtB	FRQLTKGTNL DWKEENGKLT FEVDHADK LK NNKNGVVNK		
B.s. YwtB	IRELTKDSNF AWKVEDGKLT FDIDHSDK LK SK.....		