

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 114**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 9/48** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/EP2012/056262**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12139964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12713714 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2697376**

54 Título: **Procedimiento de expresión con una proteasa auxiliar**

30 Prioridad:

**13.04.2011 DE 102011007313**

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

**25.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MAKSYM, LUKAS;  
KNAB, RAMONA;  
EVERS, STEFAN;  
MAURER, KARL-HEINZ y  
BONGAERTS, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 639 114 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

Procedimiento de expresión con una proteasa auxiliar

La invención pertenece al campo de la biotecnología, en particular de la síntesis microbiana de proteínas. La invención se refiere, en particular, a un procedimiento para la producción de proteínas mediante microorganismos modificados genéticamente y propone asimismo microorganismos que se usan en este tipo de procedimientos. La invención se refiere también a los usos de estos microorganismos para la producción de proteínas.

Para la producción de sustancias valiosas se pueden usar microorganismos.

Las sustancias valiosas son, por ejemplo, compuestos de bajo peso molecular, como suplementos nutricionales o compuestos con actividad farmacéutica, o proteínas, para las cuales existe a su vez, debido a su diversidad, un amplio campo de aplicaciones técnicas. En el primer caso, se aprovechan y/o modifican las propiedades metabólicas de los microorganismos en cuestión para la producción de las sustancias valiosas; en el segundo, se usan con preferencia microorganismos que expresen los genes de las proteínas de interés.

Para la producción biotecnológica a gran escala, los microorganismos en cuestión se cultivan en fermentadores equipados conforme a las propiedades metabólicas de los microorganismos. Durante el cultivo los microorganismos metabolizan el sustrato ofrecido y forman el producto deseado, que, una vez finalizada la fermentación, normalmente se separan de los organismos de producción y se purifican y/o concentran a partir de la pasta del fermentador y/o el medio de fermentación. En la producción fermentativa de proteínas se usan como sustrato típicamente materias primas complejas, ricas en proteínas, además de una fuente de carbono (típicamente glucosa). La producción de proteínas equivale así a una transformación biológica de las proteínas del sustrato en la proteína objetivo. Esto requiere la hidrólisis completa de la proteína del sustrato a los aminoácidos individuales, que luego están disponibles para la biosíntesis de la proteína objetivo.

En consecuencia, existe un amplio estado de la técnica relacionado con la fermentación de microorganismos, que alcanza desde la optimización de las cepas correspondientes, por ejemplo en cuanto a la tasa de producción y el aprovechamiento de nutrientes, hasta la obtención de las sustancias valiosas a partir de los microorganismos en cuestión y/o del medio de fermentación, pasando por el diseño técnico de los fermentadores.

Generalmente se desean obtener rendimientos de producto lo más elevados posible en la fermentación microbiana. La solicitud de patente internacional WO 91/02792, por ejemplo, da a conocer la producción fermentativa mejorada de una proteasa alcalina de *Bacillus lentus* en una cepa optimizada de *Bacillus licheniformis* bajo el control de secuencias reguladoras de la expresión génica de *Bacillus licheniformis*, en particular del promotor de *Bacillus licheniformis*.

En las publicaciones de Wu y col. (J. Bacteriol. 173(16), 4952-8 (1991); Appl. Environ. Microbiol. 68(7), 3261-9 (2002)) se propone desactivar las proteasas expresadas de forma endógena por el microorganismo para aumentar el rendimiento de la proteína objetivo. Con ello se pretende evitar la degradación proteolítica de la proteína objetivo y centrar la capacidad de síntesis de los microorganismos en el producto deseado.

El documento WO 2009/094084 describe un microorganismo de tipo bacilo que expresa una proteasa mutada y la proteína YmaH.

El documento EP 1921148 describe un microorganismo que expresa una proteasa mutada y en el que los clones correspondientes se seleccionaron con la ayuda de un gen de resistencia.

Siguen necesitándose procedimientos de fermentación microbiana que permitan obtener un alto rendimiento de producto. Sorprendentemente, y a diferencia de las publicaciones antes mencionadas, se ha descubierto que precisamente la expresión adicional de una determinada proteasa auxiliar resulta ventajosa para el rendimiento de producto.

La presente invención se propone el objetivo de aumentar el rendimiento del producto, en particular de una proteína, en una fermentación microbiana.

El objeto de la invención es un procedimiento para la producción de una proteína por un microorganismo, que comprende los pasos de procedimiento

(a) introducción en un microorganismo de una primera construcción de expresión que codifica la proteína;

(b) introducción en el microorganismo de una segunda construcción de expresión que codifica una proteasa auxiliar que difiere de la proteína y que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 65% de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, en la que la proteasa auxiliar presenta una actividad proteolítica y sustituye en el microorganismo al menos una proteasa codificada por el cromosoma;

(c) expresión de la proteína y de la proteasa auxiliar en el microorganismo, siendo la proteína una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasas, xantanasas, xiloglucanasas, [beta]-glucosidasas, pectinasas,

carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o lipasa.

Un procedimiento de acuerdo con la invención comprende opcionalmente el paso de procedimiento adicional

(d) cultivo del microorganismo.

5 Por consiguiente, en las configuraciones preferidas de acuerdo con la invención, un procedimiento de acuerdo con la invención es un procedimiento de fermentación.

10 Inesperadamente, la introducción y expresión de la proteasa auxiliar en el microorganismo no produce una disminución del rendimiento de producto de la proteína (proteína objetivo), por ejemplo a causa de la actividad proteolítica de la proteasa auxiliar expresada que podría degradar la proteína objetivo sintetizada. Más bien, la expresión de la proteasa auxiliar provoca un aumento del rendimiento de producto de la proteína. En las formas de realización preferidas de la invención, la proteasa auxiliar participa en la hidrólisis de la proteína del sustrato y produce, preferentemente junto con otras proteasas codificadas por el cromosoma (= proteasas de fondo) del microorganismo, una digestión mejorada de la proteína del sustrato, de forma que en el proceso de producción está disponible una mayor cantidad de las moléculas precursoras necesarias, en particular aminoácidos, por unidad de tiempo para la síntesis de la proteína objetivo. Por tanto, en estas configuraciones de acuerdo con la invención se complementan ventajosamente las especificidades por el sustrato de las proteasas de fondo y de la proteasa auxiliar en lo que respecta a la digestión del sustrato por el microorganismo.

15 A este respecto, según otras formas de realización preferidas de la invención no es necesario que la proteasa auxiliar esté presente en una proporción significativa en el producto de fermentación. La proteasa auxiliar fomenta a este respecto la expresión de la proteína y, por consiguiente, el rendimiento de producto de la proteína, si bien su proporción en el producto de fermentación es preferentemente pequeña o indetectable. Su proporción en el producto de fermentación es preferentemente inferior al 25%, y con preferencia creciente inferior al 20% en peso, 15% en peso, 10% en peso, 8% en peso, 7% en peso, 6% en peso, 5% en peso, 2,5% en peso, 2% en peso, 1,5% en peso, 1% en peso, 0,5% en peso, 0,1% en peso y 0,05% en peso. A este respecto, el producto de fermentación es la composición que contiene la proteína después de realizar un procedimiento de acuerdo con la invención, cultivar el microorganismo en un medio de cultivo y digerir opcionalmente el microorganismo para liberar la proteína de este si no es secretada por él. Preferentemente se han separado los microorganismos o sus fragmentos del producto de fermentación.

20 Por consiguiente, en una configuración preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención de un procedimiento para incrementar la expresión de una proteína en un microorganismo. Se presenta una expresión incrementada de la proteína cuando, por medio de un procedimiento de acuerdo con la invención, se obtiene una cantidad mayor de proteína que con un procedimiento del mismo tipo que únicamente difiere de un procedimiento de acuerdo con la invención en que prescinde del paso de procedimiento b), de modo que en el paso de procedimiento c) no se expresa ninguna proteasa auxiliar en el microorganismo. Ambos procedimientos que se han de comparar se realizan a este respecto en las mismas condiciones, durante el mismo periodo de tiempo y con microorganismos que únicamente difieren entre sí en la presencia o ausencia de la proteasa auxiliar.

25 Una construcción de expresión es una secuencia de ácido nucleico que hace que la proteína o la proteasa auxiliar se pueda expresar en el microorganismo. Comprende la información genética, es decir aquella secuencia de ácido nucleico (Gen) que codifica la proteína o la proteasa auxiliar. La expresión de una secuencia de ácido nucleico es su traducción al o a los producto(s) génico(s) codificado(s) por esta secuencia, es decir a un polipéptido (proteína) o varios polipéptidos (proteínas). Los términos polipéptido y proteína se utilizan como sinónimos en la presente solicitud. En el sentido de la presente invención, el término expresión designa, por consiguiente, la biosíntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas a partir de la información genética. En general, la expresión comprende la transcripción, es decir la síntesis de un ácido ribonucleico mensajero ("messenger") (ARNm) a partir de la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) del gen, y su traducción a la cadena polipeptídica correspondiente, que, dado el caso, puede ser modificada post-traduccionalmente. La expresión de una proteína describe, pues, la biosíntesis de la misma a partir de la información genética que de acuerdo con la invención está presente en el microorganismo.

30 Una construcción de expresión comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico, preferentemente ADN, con una función reguladora para la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o la proteasa auxiliar (denominada secuencia reguladora de la expresión génica). Una secuencia reguladora de la expresión génica es en este caso cualquier secuencia de ácido nucleico cuya presencia en el microorganismo correspondiente afecta, preferentemente incrementa, la frecuencia de transcripción de aquella secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o la proteasa auxiliar. Preferentemente se trata de una secuencia promotora, ya que una secuencia de este tipo es esencial para la expresión de una secuencia de ácido nucleico. No obstante, una construcción de expresión también puede comprender otras secuencias reguladoras de la expresión génica, por ejemplo una o varias secuencias potenciadoras. Por consiguiente, una construcción de expresión según la invención comprende al menos una unidad funcional formada por gen y promotor. Puede, pero no necesariamente debe, estar presente en forma de una unidad física.

La presencia de al menos un promotor es esencial para una construcción de expresión. Por promotor se entiende, por tanto, una secuencia de ADN que permita la expresión regulada de un gen. La secuencia promotora es un componente natural de un gen y a menudo se encuentra en su extremo 5' y, por tanto, delante de la región codificante de ARN.

- 5 En una construcción de expresión la secuencia promotora preferentemente se encuentra en dirección 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o la proteasa auxiliar. La característica más importante de un promotor es la interacción específica con al menos una proteína o un polipéptido de unión a ADN que media la iniciación de la transcripción del gen por una ARN-polimerasa y se denomina factor de transcripción. Con frecuencia están implicados varios factores de transcripción y/u otras proteínas en la iniciación de la transcripción por una ARN-polimerasa. Por tanto, un promotor es preferentemente una secuencia de ADN con actividad promotora, es decir una secuencia de ADN a la que se une, al menos de forma transitoria, al menos un factor de transcripción para iniciar la transcripción de un gen. La fuerza de un promotor se puede medir mediante la frecuencia de transcripción del gen expresado, es decir mediante el número de moléculas de ARN, en particular de moléculas de ARNm, generadas por unidad de tiempo. Un promotor de una construcción de expresión puede ser un promotor propio del microorganismo. Por tanto, una secuencia promotora de este tipo está presente de forma natural en el microorganismo. De forma alternativa, el promotor de una construcción de expresión también se puede haber introducido en el microorganismo por recombinación. Lo mismo es válido para todas las demás secuencias reguladoras de la expresión génica que pueda presentar una construcción de expresión.

- 20 La primera construcción de expresión codifica una proteína. Comprende, por consiguiente, una secuencia de ácido nucleico que codifica esta proteína. En principio se puede usar para ello cualquier secuencia de ácido nucleico que se pueda traducir a una proteína. Se trata de aquella proteína que se ha de producir con la ayuda de un procedimiento de acuerdo con la invención (proteína objetivo). De acuerdo con la invención se trata de una enzima como se describe a continuación. La segunda construcción de expresión codifica la proteasa auxiliar. La proteasa auxiliar difiere de la proteína, es decir que ella y la proteína presentan secuencias de aminoácidos diferentes. La proteasa auxiliar comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 65%, y con preferencia creciente al menos un 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y con muy especial preferencia el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1. Con especial preferencia, la proteasa auxiliar presenta una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 65%, y con preferencia creciente al menos un 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y con muy especial preferencia el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1.

- 35 La identidad de las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos se determina por comparación de secuencias. Esta comparación se efectúa relacionando entre sí sucesiones similares en las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Esta comparación de secuencias se realiza preferentemente en base al algoritmo BLAST, utilizado habitualmente y establecido en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, p. 3389-3402), y consiste principalmente en relacionar entre sí sucesiones similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, respectivamente. La relación de las posiciones en cuestión en forma de cuadro se denomina alineamiento. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencias (alineamientos), en particular las comparaciones de secuencias múltiples, se establecen habitualmente con programas informáticos. A menudo se utilizan, por ejemplo, la serie Clustal (véase, por ejemplo, Chenna y col. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (véase, por ejemplo, Notredame y col. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas basados en estos programas o algoritmos. En el marco de la presente invención las comparaciones de secuencias y los alineamientos se realizan preferentemente con el programa informático Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE.UU.) con los parámetros predeterminados de fábrica (default).

- Una comparación de este tipo permite realizar afirmaciones sobre la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Generalmente se expresa en porcentaje de identidad, es decir la proporción de nucleótidos o restos aminoácido idénticos presentes en las mismas posiciones o en posiciones equivalentes en un alineamiento. El término homología, más amplio, considera también en el caso de las secuencias de aminoácidos las sustituciones de aminoácidos conservados, es decir de aminoácidos con propiedades similares, puesto que estos normalmente desempeñan actividades o funciones similares dentro de la proteína. Así, la similitud de las secuencias comparadas también se puede expresar en porcentaje de homología o porcentaje de similitud. Los datos de identidad y/u homología pueden referirse a polipéptidos o genes completos, o solo a regiones individuales. Las regiones homólogas o idénticas de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos diferentes se definen, por tanto, por coincidencias en las secuencias. Con frecuencia poseen funciones idénticas o similares. Pueden ser cortas y comprender solo unos pocos nucleótidos o aminoácidos. Estas pequeñas regiones a menudo desempeñan funciones esenciales para la actividad total de la proteína. Por ello puede resultar razonable referir las coincidencias

de secuencia solo a regiones individuales, dado el caso pequeñas. Sin embargo, en la presente solicitud, los datos de identidad u homología se refieren, salvo que se indique lo contrario, a la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos indicada en cada caso. En el caso de las proteínas, en particular las enzimas, y entre ellas especialmente las proteasas, los datos se refieren además a la proteína madura, salvo que se indique lo contrario. Por consiguiente, si no se indica lo contrario, las reflexiones sobre las secuencias se dirigen siempre a la proteína madura y procesada, aun cuando el gen correspondiente codifique una forma inmadura que después de la traducción se procesa para dar la forma madura.

La proteasa auxiliar presenta asimismo una actividad proteolítica. Es, por tanto, catalíticamente activa, es decir que se trata de una enzima activa. La determinación de la actividad enzimática se puede llevar a cabo en función del tipo de enzima como es habitual en la técnica. El experto en el campo de la tecnología enzimática está familiarizado con los procedimientos para la determinación de la actividad y los usa de forma rutinaria. En Tenside, tomo 7 (1970), p. 125-132, por ejemplo, se dan a conocer procedimientos para la determinación de la actividad proteasa. La actividad proteolítica también se puede determinar mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La proteasa disocia el sustrato y libera pNA. La liberación de la pNA provoca un aumento de la extinción a 410 nm, cuyo curso temporal es una medida de la actividad enzimática (véase Del Mar y col., 1979). La medición se lleva a cabo a una temperatura de 25°C, a pH 8,6 y a una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición es de 5 min con intervalos de 20 s a 60 s entre las mediciones. La actividad proteasa se expresa preferentemente en UP (unidades de proteasa).

Los ácidos nucleicos y las construcciones de expresión se pueden generar mediante procedimientos conocidos en sí para la modificación de ácidos nucleicos. Estos se describen, por ejemplo, en manuales especializados como el de Fritsch, Sambrook y Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, y son conocidos para el experto en el campo de la biotecnología. Ejemplos de tales procedimientos son la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), opcionalmente en combinación con otros procedimientos convencionales de biología molecular y/o químicos o bioquímicos.

La presente invención es especialmente adecuada para la producción recombinante de proteínas, en particular de enzimas. Para ello se introducen la primera y la segunda construcción de expresión en un microorganismo, preferentemente por transformación. A este respecto, la inclusión de la construcción de expresión correspondiente o de partes de ella se efectúa preferentemente mediante vectores, en especial vectores de expresión. No obstante, también es posible introducir en el microorganismo solo partes de la construcción de expresión, preferentemente al menos el ácido nucleico que codifica la proteína o la proteasa auxiliar, de tal forma que la construcción de expresión acabada solo se genere en el microorganismo. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante un vector que provoque la inserción del gen para la proteína y/o el gen para la proteasa auxiliar en la célula huésped en un elemento genético ya presente, como el cromosoma, el ADN cromosómico u otros vectores, de manera que se aproveche, por ejemplo, un promotor endógeno para la expresión del gen para la proteína o del gen para la proteasa auxiliar. De este modo se puede enlazar funcionalmente, en particular, el gen que codifica la proteasa auxiliar con un promotor endógeno del microorganismo, lo que constituye entonces la segunda construcción de expresión. El término introducción comprende, por consiguiente, la posibilidad de introducir, preferentemente por transformación, una construcción de expresión completa en el microorganismo, pero también la posibilidad de introducir en el microorganismo, preferentemente por transformación, solo una parte de la construcción de expresión, con especial preferencia el ácido nucleico que codifica la proteasa auxiliar, y de generar la construcción de expresión completa una vez dentro del microorganismo. No obstante, en el marco de la invención siempre se introduce en el microorganismo al menos una parte de la construcción de expresión.

Los vectores son conocidos para el experto en el campo de la biotecnología. Son, especialmente cuando se usan en bacterias, plásmidos especiales, es decir elementos genéticos circulares. En el marco de la presente invención, las construcciones de expresión preferentemente están clonadas en un vector. Los vectores pueden incluir, por ejemplo, los que derivan de plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o vectores o plásmidos predominantemente sintéticos con elementos de los orígenes más diversos. Junto con los demás elementos genéticos presentes los vectores son capaces de establecerse en los microorganismos como unidades estables durante varias generaciones. Es irrelevante para la invención si se establecen fuera del cromosoma como unidades propias o si se integran en un cromosoma o ADN cromosómico. Cuál de los muchos sistemas se elija dependerá de cada caso. Pueden ser decisivos, por ejemplo, el número de copias que se pueden obtener, los sistemas de selección disponibles, entre ellos sobre todo las resistencias a antibióticos, o la facilidad con la que se puedan cultivar los microorganismos capaces de alojar los vectores.

Los vectores de expresión se pueden regular además modificando las condiciones de cultivo, como por ejemplo la densidad de células, o añadiendo determinados compuestos. Un ejemplo de un compuesto de este tipo es el derivado de galactosa isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), que se usa como activador del operón lactosa (operón lac) bacteriano.

En otra forma de realización de la invención, un procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la proteína no está presente de forma natural en el microorganismo y/o la proteasa auxiliar no está presente de forma natural en el microorganismo.

No presente de forma natural significa en este contexto que la proteína o la proteasa auxiliar no es una proteína o enzima propia del microorganismo. Por consiguiente, la proteína o la proteasa auxiliar no puede expresarse en el microorganismo a partir de una secuencia de ácido nucleico que forme parte del ADN cromosómico del microorganismo en su forma silvestre. Por tanto, la proteína o la proteasa auxiliar y/o la secuencia de ácido nucleico que las codifica respectivamente no está presente en la forma silvestre del microorganismo y/o no se puede aislar de la forma silvestre del microorganismo. Preferentemente se ha introducido selectivamente en el microorganismo una proteína no presente de forma natural en el microorganismo o una proteasa auxiliar no presente de forma natural en el microorganismo o la secuencia de ácido nucleico que las codifica respectivamente con la ayuda de procedimientos de ingeniería genética, de forma que el microorganismo está enriquecido en la proteína o la proteasa auxiliar o la secuencia de ácido nucleico que las codifica respectivamente. No obstante, una proteína o la proteasa auxiliar sí pueden estar presentes de forma natural en otro microorganismo; únicamente es relevante para la reflexión el microorganismo usado en el procedimiento.

También pueden no estar presentes de forma natural en el microorganismo tanto la proteína como la proteasa auxiliar. En una configuración alternativa, sin embargo, la proteína puede estar presente de forma natural en el microorganismo y la proteasa auxiliar puede no estar presente de forma natural en el microorganismo. En otra configuración alternativa, también puede no estar presente de forma natural en el microorganismo la proteína y estar presente de forma natural en el microorganismo la proteasa auxiliar.

El procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la proteasa auxiliar sustituye en el microorganismo al menos una proteasa codificada por el cromosoma. En este caso se intercambia al menos una proteasa cromosómica presente por una proteasa heteróloga que actúa de proteasa auxiliar. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa auxiliar se inserta en una secuencia de ácido nucleico cromosómica que codifica una proteasa del microorganismo. De este modo se inactiva funcionalmente la proteasa codificada por el cromosoma. El microorganismo expresa la proteasa auxiliar en lugar de la proteasa codificada por el cromosoma. Para la expresión de la proteasa auxiliar se puede usar el promotor original usado para la proteasa codificada por el cromosoma, de manera que la segunda construcción de expresión comprende en este caso, además de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa auxiliar, la secuencia promotora de la proteasa codificada por el cromosoma, es decir una secuencia promotora natural del microorganismo. De forma alternativa se puede usar un promotor previsto específicamente para la proteasa auxiliar, de manera que la segunda construcción de expresión no comprende en este caso la secuencia de ácido nucleico de la proteasa codificada por el cromosoma además de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa auxiliar. La segunda construcción de expresión preferentemente comprende en este caso una secuencia promotora no natural del microorganismo. Si se usa un promotor previsto específicamente para la proteasa auxiliar, este se ha insertado preferentemente junto con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa auxiliar en la secuencia de ácido nucleico cromosómica que codifica una proteasa del microorganismo. En otra configuración alternativa se pueden usar para la expresión de la proteasa auxiliar tanto el promotor usado para la proteasa codificada por el cromosoma como un promotor previsto específicamente para la proteasa auxiliar.

En otra forma de realización de la invención, un procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la proteasa auxiliar se expresa en el microorganismo adicionalmente a las proteasas codificadas por el cromosoma. De este modo se proporciona al microorganismo una actividad proteolítica adicional mediante una proteasa heteróloga que actúa de proteasa auxiliar de acuerdo con la invención. La segunda construcción de expresión comprende, por consiguiente, preferentemente al menos la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa auxiliar, así como un promotor previsto para la expresión de la proteasa auxiliar. En este caso, la segunda construcción de expresión comprende preferentemente una secuencia promotora no natural del microorganismo.

En una forma de realización especialmente preferida, un procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la proteasa auxiliar sustituye en el microorganismo al menos una proteasa codificada por el cromosoma que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80%, y con preferencia creciente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y con muy especial preferencia el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2. Con especial preferencia, la proteasa codificada por el cromosoma presenta una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80%, y con preferencia creciente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y con muy especial preferencia el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2. Una proteasa de este tipo es sustituida con especial preferencia en un microorganismo que es una bacteria, en especial del género *Bacillus* y, dentro de él, preferentemente *Bacillus licheniformis*.

En otra forma de realización de la invención, un procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque la expresión de la proteína se intensifica mediante la expresión de la proteasa auxiliar. Como ya se ha explicado anteriormente, la expresión de la proteasa auxiliar hace, según configuraciones preferidas de acuerdo con la invención, que se incremente el rendimiento de producto de la proteína. Esto se logra mediante una expresión incrementada, es decir una síntesis incrementada de la proteína por el microorganismo. La proteasa auxiliar participa en la hidrólisis de la proteína del sustrato y proporciona, dado el caso junto con otras proteasas del microorganismo codificadas por el cromosoma, una digestión mejorada de la proteína del sustrato que se pone a disposición del microorganismo durante su cultivo. De este modo se dispone de una mayor cantidad de las

moléculas precursoras necesarias, en particular aminoácidos, para la síntesis de la proteína.

Esta circunstancia se determina mediante la frecuencia de transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína y su traducción a la proteína deseada, es decir mediante el número de proteínas generadas por unidad de tiempo. El paso de la traducción se incluye en la determinación de la expresión. Como comparación sirve un procedimiento que difiere del procedimiento de acuerdo con la invención en la presencia de la proteasa auxiliar. Esta comparación se efectúa de acuerdo con la invención en microorganismos del mismo tipo y en las mismas condiciones para garantizar la comparabilidad de las mediciones.

De acuerdo con la invención, el procedimiento se caracteriza porque la proteína es una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasas, xantanasas, xiloglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas, pectinasas, carragenasas, perhidrolasas, oxidasas, oxidorreductasas o lipasas. En el caso de la proteína se trata con muy especial preferencia de una proteasa. Al mismo tiempo, la proteasa que se ha de producir (= proteasa objetivo) también participa en la hidrólisis del sustrato proteico, y ventajosamente puede mejorar aún más la digestión de la proteína del sustrato.

Con un procedimiento de acuerdo con la invención se pueden producir ventajosamente, por ejemplo, las enzimas mencionadas a continuación.

Entre las proteasas se prefieren las subtilisinas. Ejemplos son las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, la subtilisina DY y las enzimas termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7, clasificadas como subtilisinas aunque no como subtilisinas en el sentido más estricto. La subtilisina Carlsberg está disponible, en una forma perfeccionada, bajo el nombre comercial Alcalasa®, de la empresa Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca. Las subtilisinas 147 y 309 son comercializadas por la empresa Novozymes bajo los nombres comerciales Esperasa® y Savinasa®, respectivamente.

De la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483 derivan las variantes de proteasa vendidas bajo el nombre BLAP®. Otras proteasas preferidas son, por ejemplo, las enzimas vendidas bajo el nombre PUR. Otras proteasas son asimismo las enzimas que se pueden adquirir de la empresa Novozymes bajo los nombres comerciales Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym®, Natalase®, Kannase® y Ovozyme®, de la empresa Genencor bajo los nombres comerciales Purafect®, Purafect® OxP, Purafect® Prime, Excellase® y Properase®, de la empresa Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, bajo el nombre comercial Protosol®, de la empresa Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, bajo el nombre comercial Wuxi®, de la empresa Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoy, Japón, bajo los nombres comerciales Proleather® y Protease P® y de la empresa Kao Corp., Tokio, Japón, bajo el nombre Proteinasa K-16. Asimismo se prefieren las proteasas de *Bacillus gibsonii* y *Bacillus pumilus*, que se dan a conocer en las solicitudes de patente internacional WO 2008/086916 y WO 2007/131656.

Ejemplos de amilasas son las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *Bacillus amyloliquefaciens* o de *Bacillus stearothermophilus*, así como, en particular, sus perfeccionamientos mejorados para el uso en detergentes o productos de limpieza. La enzima de *Bacillus licheniformis* se puede adquirir de la empresa Novozymes bajo el nombre Termamyl® y de la empresa Danisco/Genencor bajo el nombre Purastar®ST. Se pueden adquirir productos perfeccionados de esta  $\alpha$ -amilasa de la empresa Novozymes bajo el nombre comercial Duramyl® y Termamyl®ultra, de la empresa Danisco/Genencor bajo el nombre Purastar®OxAm y de la empresa Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón, como Keistase®. La  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* es comercializada por la empresa Novozymes bajo el nombre BAN®, y las variantes derivadas de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, por la misma empresa Novozymes bajo los nombres BSG® y Novamyl®. Son de mencionar además la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrina-gluconotransferasa (CGTasa) de *Bacillus agaradherens* (DSM 9948). Igualmente se pueden usar productos de fusión de todas las moléculas mencionadas. Además son adecuados los perfeccionamientos de la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*, disponibles en la empresa Novozymes bajo los nombres comerciales Fungamyl®. Otros productos comerciales ventajosos son, por ejemplo, la amilasa Powerase® de la empresa Danisco/Genencor y las amilasas Amylase-LT®, Stainzyme® y Stainzyme plus®, estas últimas de la empresa Novozymes. También se pueden producir de acuerdo con la invención variantes de estas enzimas obtenibles por mutaciones puntuales. Otras amilasas preferidas se dan a conocer en las publicaciones para información de solicitud de patente internacional WO 00/60060, WO 03/002711, WO 03/054177 y WO 07/079938, a cuya divulgación se remite expresamente o cuya descripción a este respecto se incluye expresamente en la presente solicitud de patente. Las amilasas que se han de producir de acuerdo con la invención son preferentemente  $\alpha$ -amilasas.

Ejemplos de lipasas o cutinasas son las lipasas obtenibles originalmente o perfeccionadas de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), en especial las que presentan la sustitución de aminoácidos D96L. Se comercializan, por ejemplo, por la empresa Novozymes bajo los nombres comerciales Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®. Asimismo se pueden producir, por ejemplo, las cutinasas aisladas originalmente de *Fusarium solani* y *Humicola insolens*. Se pueden producir, por ejemplo, las lipasas o cutinasas de la empresa Danisco/Genencor cuyas enzimas de partida se han aislado originalmente de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como productos comerciales importantes también son de mencionar los preparados M1 Lipase® y Lipomax®, comercializados originalmente por la empresa Gist-Brocades (ahora Danisco/Genencor) y las enzimas comercializadas por la empresa Meito Sangyo KK, Japón, bajo los nombres Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase

PL®, así como el producto Lumafast® de la empresa Danisco/Genencor.

Ejemplos de celulasas (endoglucanasas, EG) comprenden secuencias del preparado fúngico de celulasa rico en endoglucanasa (EG) o sus perfeccionamientos que ofrece la empresa Novozymes bajo el nombre comercial Celluzyme®. Los productos Endolase® y Carezyme®, que también se pueden adquirir de la empresa Novozymes, se basan en la EG de 50 kD y la EG de 43 kD, respectivamente, de *Humicola insolens* DSM 1800. Otros productos comerciales de esta empresa que se pueden producir son Cellusoft®, Renozyme® y Celluclean®. Asimismo se pueden producir, por ejemplo, las celulasas que se pueden adquirir de la empresa AB Enzymes, Finlandia, bajo los nombres comerciales Ecostone® y Biotouch® y que se basan, al menos en parte, en la EG de 20 kD de *Melanocarpus*. Otras celulasas de la empresa AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Otras celulasas adecuadas son las de *Bacillus sp.* CBS 670.93 y CBS 669.93, de las cuales la de *Bacillus sp.* CBS 670.93 se puede adquirir de la empresa Danisco/Genencor bajo el nombre comercial Puradax®. Otros productos comerciales de la empresa Danisco/Genencor que se pueden producir son "Genencor detergent cellulase L" e IndiAge®Neutra.

También se pueden producir de acuerdo con la invención variantes de estas enzimas obtenibles por mutaciones puntuales. Las celulasas especialmente preferidas son las variantes de celulasa de *Thielavia terrestris* dadas a conocer en la publicación para información de solicitud de patente internacional WO 98/12307, las celulasas de *Melanocarpus*, en particular *Melanocarpus albomyces*, dadas a conocer en la publicación para información de solicitud de patente internacional WO 97/14804, las celulasas de tipo EGIII de *Trichoderma reesei* dadas a conocer en la solicitud de patente europea EP 1305432 o las variantes obtenibles a partir de ellas, en particular las que se dan a conocer en las solicitudes de patente europea EP 1240525 y EP 1305432, así como las celulasas dadas a conocer en las publicaciones para información de solicitud de patente internacional WO 1992/006165, WO 96/29397 y WO 02/099091. Por tanto, se remite expresamente a su divulgación correspondiente o se incluye expresamente la descripción a este respecto en la presente solicitud de patente.

Asimismo se pueden producir otras enzimas que se agrupan bajo el término hemicelulasas. Estas incluyen, por ejemplo, manasas, xantano liasas, xantanases, pectina liasas (= pectinasas), pectinesterasas, pectato liasas, xiloglucanasas, xilanasas, pululanases y  $\beta$ -glucanasas. Las enzimas adecuadas a este respecto se pueden adquirir, por ejemplo, de la empresa Novozymes bajo los nombres Gamanase®, Pektinex AR® y Pectaway®, de la empresa AB Enzymes bajo el nombre de Rohapec® 81 L y de la empresa Diversa Corp., San Diego, CA, EE.UU. bajo el nombre Pyrolase®. La  $\beta$ -glucanasa obtenida de *Bacillus subtilis* se puede adquirir de la empresa Novozymes bajo el nombre Cereflo®. Las hemicelulasas especialmente preferidas de acuerdo con la invención son las manasas, que son comercializadas, por ejemplo, por la empresa Novozymes bajo el nombre comercial Mannaway® o por la empresa Genencor bajo Purabrite®.

Además se pueden producir oxidorreductasas, por ejemplo oxidasas, oxigenasas, catalasas, peroxidasas como halo-, cloro-, bromo-, lignina, glucosa o manganeso peroxidasas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). Como productos comerciales adecuados son de mencionar Denilite® 1 y 2 de la empresa Novozymes. Otras enzimas se dan a conocer en las solicitudes de patente internacional WO 98/45398, WO 2005/056782, WO 2004/058961 y WO 2005/124012.

En otra forma de realización de la invención, el procedimiento se caracteriza porque el microorganismo es una bacteria.

Las bacterias constituyen microorganismos preferidos en los procedimientos de acuerdo con la invención. Las bacterias se caracterizan por tiempos cortos de generación y pocos requerimientos en cuanto a las condiciones de cultivo. De este modo se pueden establecer procedimientos de cultivo o procedimientos de producción económicos. Además, el experto dispone en el caso de las bacterias de una amplia y rica experiencia en la técnica de fermentación. Pueden ser adecuadas tanto bacterias Gram negativas como Gram positivas.

En el caso de las bacterias Gram negativas como, por ejemplo, *Escherichia coli*, se secreta un gran número de proteínas al espacio periplasmático, es decir al compartimento entre las dos membranas que encierran las células. Esto puede resultar ventajoso para aplicaciones especiales. Las bacterias Gram negativas también se pueden configurar de tal manera que no solo secreten las proteínas expresadas al espacio periplasmático, sino también al medio que rodea a la bacteria. Las bacterias Gram positivas como, por ejemplo, los bacilos o los microorganismos tales como *Actinomycetes* u otros representantes de *Actinomycetales*, por el contrario, no poseen membrana exterior, de forma que las proteínas secretadas son cedidas directamente al medio que rodea a las bacterias, generalmente al medio de cultivo, a partir del cual se pueden purificar las proteínas expresadas. Se pueden aislar directamente del medio o someter a un procesamiento ulterior.

Una bacteria preferida de acuerdo con la invención se selecciona del grupo formado por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Con más preferencia es una que se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Burkholderia glumae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Vibrio metschnikovii*. Se prefiere muy especialmente *Bacillus licheniformis*.

El microorganismo también puede ser una célula eucariota, caracterizada porque posee un núcleo celular. A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas son capaces de modificar post-traduccionalmente la proteína formada. Ejemplos de ellas son hongos, como *Actinomyces*, o levaduras, como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede resultar especialmente ventajoso, por ejemplo, cuando las proteínas deben experimentar, en relación con su síntesis, modificaciones específicas que permiten tales sistemas. Las modificaciones que realizan los sistemas eucariotas especialmente en relación con la síntesis de proteínas incluyen, por ejemplo, la unión de compuestos de bajo peso molecular, tales como anclajes de membrana u oligosacáridos. Estas modificaciones con oligosacáridos pueden ser deseables, por ejemplo, para reducir la alergenicidad de una proteína expresada. Asimismo puede ser ventajosa la coexpresión con las enzimas formadas de manera natural por este tipo de células, como, por ejemplo, celulasas o lipasas. También pueden ser adecuados, por ejemplo, los sistemas de expresión fúngicos termófilos, especialmente para la expresión de proteínas o variantes termorresistentes.

Los microorganismos que se han de usar de acuerdo con la invención pueden estar modificados en lo que respecta a sus requerimientos en relación con las condiciones de cultivo, presentar marcadores de selección diferentes o adicionales o expresar proteínas diferentes o adicionales. En particular, puede tratarse también de microorganismos que expresan transgénicamente varias proteínas objetivo. Preferentemente secretan la proteína (proteína objetivo) al medio que rodea al microorganismo.

Los microorganismos usados en los procedimientos de acuerdo con la invención se pueden cultivar y fermentar de manera habitual, por ejemplo en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso, se inocula un medio de cultivo adecuado con los microorganismos y se recoge la proteína del medio al cabo de un periodo de tiempo que se halla experimentalmente. Las fermentaciones continuas se caracterizan por alcanzar un equilibrio dinámico en el que, durante un periodo de tiempo relativamente largo, parte de las células mueren pero también se reproducen y, al mismo tiempo, se puede extraer del medio la proteína formada.

Los procedimientos de acuerdo con la invención son preferentemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación son conocidos en sí en el estado de la técnica y constituyen el paso de producción a gran escala propiamente dicho, seguido por lo general de un procedimiento de purificación adecuado para la proteína producida. Todos los procedimientos de fermentación basados en un procedimiento de acuerdo con la invención para la producción de una proteína constituyen formas de realización de este objeto de la invención.

Se consideran especialmente los procedimientos de fermentación que se caracterizan porque la fermentación se realiza mediante una estrategia de alimentación. En este caso se alimentan los componentes del medio que se consumen durante el cultivo continuo. De este modo se pueden lograr incrementos considerables tanto en la densidad de células como en la masa celular o masa seca. La fermentación también se puede configurar de tal manera que los productos metabólicos no deseados se eliminen por filtración o se neutralicen con contraiones apropiados en cada caso.

La proteína producida se puede recoger del medio de fermentación. Este procedimiento de fermentación se prefiere frente al aislamiento de la proteína del microorganismo, es decir la preparación del producto a partir de la masa celular (masa seca). Esto se puede lograr, por ejemplo, poniendo a disposición microorganismos adecuados o uno o más marcadores o mecanismos de secreción adecuados y/o sistemas de transporte para que los microorganismos secreten la proteína al medio de fermentación. En caso de no producirse secreción, se puede realizar como alternativa el aislamiento de la proteína a partir de la célula huésped, es decir la purificación de la misma a partir de la masa celular, por ejemplo por precipitación con sulfato de amonio o etanol, o por purificación cromatográfica.

Otro objeto de la invención es un microorganismo que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende los pasos de procedimiento

(a) introducción en un microorganismo de una primera construcción de expresión que codifica una proteína, siendo la proteína una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasas, xantanasa, xiloglucanasa, [beta]-glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o lipasa;

(b) introducción en el microorganismo de una segunda construcción de expresión que codifica una proteasa auxiliar que difiere de la proteína y que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 65% de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 (= Blap S), en la que la proteasa auxiliar presenta una actividad proteolítica y sustituye en el microorganismo al menos una proteasa codificada por el cromosoma.

Se trata, pues, de todos los microorganismos que pueden ser objeto de un procedimiento de acuerdo con la invención. Todas las circunstancias, objetos y formas de realización que se describen para los procedimientos de acuerdo con la invención también son aplicables a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se remite expresamente a la divulgación en el lugar correspondiente, indicando que esta divulgación también se aplica a los microorganismos de acuerdo con la invención.

Las formas de realización especialmente preferidas de los microorganismos de acuerdo con la invención se

caracterizan porque

(a) la proteína no está presente de forma natural en el microorganismo y/o

(b) la proteasa auxiliar no está presente de forma natural en el microorganismo y/o

(c) la proteasa auxiliar se expresa en el microorganismo además de las proteasas codificadas por el cromosoma y/o

5 (d) la expresión de la proteasa auxiliar intensifica la expresión de la proteína y/o

(e) el microorganismo es una bacteria, preferentemente una que se selecciona del grupo formado por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, con más preferencia una que se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Burkholderia glumae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*,  
10 *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Vibrio metschnikovii*. Se prefiere muy especialmente *Bacillus licheniformis*.

Los microorganismos de acuerdo con la invención se usan ventajosamente en los procedimientos de acuerdo con la invención para producir una proteína, siendo la proteína una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, [beta]-glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o lipasa.  
15

Todas las circunstancias, objetos y formas de realización que se describen para los procedimientos o microorganismos de acuerdo con la invención también son aplicables a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se remite expresamente a la divulgación en el lugar correspondiente, indicando que esta divulgación también se aplica a los usos de acuerdo con la invención.  
20

## EJEMPLOS

Todos los pasos de trabajo de biología molecular se realizan conforme a procedimientos convencionales, como los que 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, los conjuntos (kits) y los equipos se usaron según las instrucciones del fabricante correspondiente.  
25

### Ejemplo 1:

Sustitución del gen que codifica una proteasa según SEQ ID NO. 2 (aprE) por un gen que codifica una proteasa auxiliar según SEQ ID NO. 1 en *Bacillus licheniformis*.

Como cebadores (indicados en la orientación 5'→3') se usaron los siguientes oligonucleótidos:

aprE1 (SEQ ID NO. 3)	AAACTGCAGCGTACCGGCTCCTTGAAAGG
aprE2 (SEQ ID NO. 4)	GAGAAGACTAAGCTTCCCGAGGATCCCGAATGACAGG
	AGATTGCTCCATC
aprE3 (SEQ ID NO. 5)	TTCGGGATCCTCGGGAAGCTTAGTCTTCTCATTCTGATGAAGGTTG
	TTCAATATTTTGA ATCC
aprE4 (SEQ ID NO. 6)	AAATCTAGATAGACCTCGAAGAGGAGAAGC
tet5 (SEQ ID NO. 7)	GCGGATCCAAACGGGCCATATTGTTGTATAAG
tet6 (SEQ ID NO. 8)	CCAAGCTTCTCTCGTATCTTTTATTCAGCAATCGC
aprE7 (SEQ ID NO.9)	CGAAAGTATGAATAGACCGCTTCAGCCTGGCAGGGAAAGAGGTCC
	CGAGG

30

aprE8 (SEQ ID NO. 10) CTGCCGCTCAATAACATATTCTAACAAATAGCATATAGAAAAAGCTA  
 GTG  
 ziel9 (SEQ ID NO. 11) CTGCCAGGCTGAAGCGGTCTATTCATACTTTTCGAACTGAACATTTTT  
 CTA  
 ziel10 (SEQ ID NO. 12) ATTTGTTAGAATATGTTATTGATCGGCAGCTTCGACATTGATCAGAC  
 CTT

La sustitución se realizó con un paso intermedio en el que se sustituyó primero el gen aprE por el gen de resistencia a tetraciclina tet. Para la sustitución del gen aprE por el gen tet se amplificaron mediante los cebadores aprE1 y aprE2, así como los cebadores aprE3 y aprE4, segmentos de secuencia de 1033 pb y 1015 pb, respectivamente, en la dirección 5' y la dirección 3' del gen aprE (flancos A y B). Debido a los extremos sobresalientes correspondientes de los cebadores aprE2 y aprE3 se fusionaron los dos flancos a través de los cebadores exteriores aprE1 y aprE4 mediante la reacción de fusión en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de la PCR de fusión de 2018 pb se clonó en los sitios de restricción PstI y XbaI del vector pE194 (Horinouchi y Weisblum, J. Bacteriol. (150), p. 804 en adelante (1982)). El gen tet se amplificó mediante los cebadores tet5 y tet6 del plásmido pBC16 (Bernhard y col., J. Bacteriol. (133), p. 897 en adelante (1978)) y se clonó en los sitios de restricción centrales BamHI y HindIII de los flancos de aprE fusionados (véase la figura 1). Se transformó *Bacillus licheniformis* con el plásmido pRK25 obtenido. La selección se llevó a cabo tanto con 5 µg/ml de eritromicina como con 15 µg/ml de tetraciclina a 30°C. Tras el cultivo a 42°C se identificaron los clones con vector integrado por crecimiento en 0,3 µg/ml de eritromicina. Tras un nuevo cultivo a 42°C pero sin el uso de eritromicina, se obtuvieron clones que se seleccionaron en cuanto a resistencia a tetraciclina y, mediante PCR, en cuanto a la sustitución exitosa del gen aprE por el gen tet (*Bacillus licheniformis* ΔaprE::tet, véase la figura 2).

Para la sustitución del gen tet por el gen que codifica una proteasa auxiliar según SEQ ID NO. 1 se amplificaron, mediante los cebadores aprE1 y aprE7, así como los cebadores aprE8 y aprE4, segmentos de secuencia de 1061 pb y 1058 pb, respectivamente, en la dirección 5' y la dirección 3' del gen aprE (flancos C y D). El gen que codifica una proteasa auxiliar según SEQ ID NO. 1 se amplificó mediante los cebadores ziel9 y ziel10 del plásmido pCB76R49CK. Debido a los extremos sobresalientes correspondientes de los cebadores aprE7 y ziel9, así como aprE8 y ziel10, se fusionaron mediante PCR de fusión los dos flancos con el producto de PCR de la proteasa auxiliar a través de los cebadores exteriores aprE1 y aprE4. El producto de la PCR de fusión de 3704 pb se clonó en los sitios de restricción PstI y NdeI del vector pRK25 (véase la figura 1). Se transformó *Bacillus licheniformis* ΔaprEtet (véase anteriormente) con el plásmido pRK19 obtenido. La selección se llevó a cabo con 5 µg/ml de eritromicina a 30°C. Tras el cultivo a 42°C se identificaron los clones con vector integrado por crecimiento en 0,3 µg/ml de eritromicina. Tras un nuevo cultivo a 42°C pero sin el uso de antibiótico, se obtuvieron clones que se seleccionaron mediante PCR en cuanto a la sustitución exitosa del gen tet por el gen que codifica una proteasa auxiliar según SEQ ID NO. 1 (*Bacillus licheniformis* ΔaprE::proteasa auxiliar, véase la figura 2).

### 30 Ejemplo 2:

Producción fermentativa de una proteasa (proteína objetivo) con la ayuda de la cepa de producción *Bacillus licheniformis* ΔaprE::proteasa auxiliar.

La cepa de partida de *Bacillus licheniformis*, así como la mutante de sustitución ΔaprE::proteasa auxiliar, se transformaron con un plásmido de producción para una proteasa (proteína objetivo). Las cepas de producción resultantes se usaron en un procedimiento de fermentación convencional y se determinaron las actividades proteasa obtenidas. En comparación con la cepa de partida, el rendimiento se incrementó un 65% en el fermentador de laboratorio de 2 l (véase la figura 3). Las actividades proteasa medidas se basan esencialmente en la actividad de la proteasa objetivo puesto que la expresión de la proteasa objetivo se ha incrementado notablemente. Esto se verificó mediante un análisis de secreción del sobrenadante de fermentación del cultivo de *Bacillus licheniformis* ΔaprE::proteasa auxiliar/proteasa objetivo mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) nativa (véase la figura 4; t describe el tiempo de cultivo, AP103 es la proteasa auxiliar (dos bandas), AP217 es la proteasa objetivo). En comparación con la proteasa objetivo, el sobrenadante del cultivo solo presenta una cantidad muy pequeña de la proteasa auxiliar.

Descripción de las figuras

45 Figura 1: Representación esquemática de la construcción de los vectores pRK25 y pRK19 para la sustitución cromosómica del gen que codifica una proteasa según SEQ ID NO. 2 (aprE) por el gen de resistencia a tetraciclina tet o por el gen que codifica una proteasa auxiliar según SEQ ID NO. 1. Las flechas definen el marco de lectura de

los genes ydeD, aprE e yhfN, definen los cebadores, las barras definen los productos de PCR.

5 Figura 2: Localización del gen aprE en *Bacillus licheniformis*. Se representa la situación silvestre (arriba), la sustitución mediada por pRK19 del gen aprE por el gen de resistencia a tetraciclina tet (centro) y la sustitución mediada por pRK25 del gen de resistencia a tetraciclina tet por el gen que codifica una proteasa auxiliar según SEQ ID NO. 1 (abajo).

Figura 3: Rendimientos relativos de las cepas de producción *Bacillus licheniformis* proteasa objetivo y *Bacillus licheniformis*  $\Delta$ aprE::proteasa auxiliar/proteasa objetivo. Las cepas se usaron en un procedimiento de fermentación convencional para la producción de la proteasa objetivo.

10 Figura 4: Análisis de secreción del sobrenadante de fermentación en un procedimiento de acuerdo con la invención o en un microorganismo de acuerdo con la invención (*Bacillus licheniformis*  $\Delta$ aprE::proteasa auxiliar/proteasa objetivo, véase también la figura 3) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativa. La actividad proteasa incrementada se basa esencialmente en la actividad de la proteasa objetivo puesto que su expresión y secreción se ha incrementado notablemente (t: tiempo de cultivo, AP103: proteasa auxiliar (dos bandas), AP217: proteasa objetivo, Mpr: otro marcador de tamaño).

15 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Procedimiento de expresión

20 <130> H 08980 PCT

<150> DE102011007313.2

<151> 2011-04-13

25 <160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

30 <211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 1

35

ES 2 639 114 T3

Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95

Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser  
 145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175

ES 2 639 114 T3

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile  
180 185 190

Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
195 200 205

Ala Ser Asp Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
260 265

<210> 2

<211> 274

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 2

ES 2 639 114 T3

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val  
 1 5 10 15

Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30

Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala  
 35 40 45

Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly  
 50 55 60

Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val  
 65 70 75 80

Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn  
 85 90 95

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp  
 100 105 110

Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala  
 115 120 125

Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg



ES 2 639 114 T3

<223> Cebador aprE3  
 <400> 5  
 ttcgggatcc tcgggaagct tagtcttctc attctgatga aggttgttca atattttgaa 60  
 5 tcc 63  
 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador aprE4  
 15 <400> 6  
 aaatctagat agacctcgaa gaggagaagc 30  
 <210> 7  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador tet5  
 25 <400> 7  
 gcggatccaa acgggccata ttgtgtata ag 32  
 <210> 8  
 30 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador tet6  
 <400> 8  
 ccaagcttct ctgatatct ttattcagca atcgc 35  
 40 <210> 9  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador aprE7  
 <400> 9  
 cgaaagtatg aatagaccgc ttcagcctgg cagggaaaga ggtcccagg 50  
 50 <210> 10  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador aprE8  
 <400> 10  
 60 ctgccgctca ataacatatt ctaacaaata gcatatagaa aaagctagtg 50  
 <210> 11  
 <211> 50  
 <212> ADN

# ES 2 639 114 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador ziel9

5

<400> 11  
ctgccaggct gaagcggctc attcatactt tcgaactgaa cattttcta 50

10

<210> 12  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> Cebador ziel10

<400> 12  
atgtgttaga atatgttatt gatcggcagc ttcgacattg atcagacctt 50

## REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la producción de una proteína por medio de un microorganismo, que comprende los pasos de procedimiento
- (a) introducción en un microorganismo de una primera construcción de expresión que codifica la proteína;
- 5 (b) introducción en el microorganismo de una segunda construcción de expresión que codifica una proteasa auxiliar que difiere de la proteína y que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 65 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, presentando la proteasa auxiliar una actividad proteolítica y sustituyendo en el microorganismo al menos a una proteasa codificada por el cromosoma;
- 10 (c) expresión de la proteína y de la proteasa auxiliar en el microorganismo, siendo la proteína una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, [beta]-glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proteína no está presente de forma natural en el microorganismo y/o la proteasa auxiliar no está presente de forma natural en el microorganismo.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proteasa auxiliar sustituye en el microorganismo al menos a una proteasa codificada por el cromosoma que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la expresión de la proteína se intensifica mediante la expresión de la proteasa auxiliar.
- 20 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el microorganismo es una bacteria, preferentemente una seleccionada del grupo formado por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, con más preferencia una seleccionada del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Burkholderia glumae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Vibrio metschnikovii*.
- 25 6.- Microorganismo que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende los pasos de procedimiento
- (a) introducción en el microorganismo de una primera construcción de expresión que codifica una proteína, siendo la proteína una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, [beta]-glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa;
- 30 (b) introducción en el microorganismo de una segunda construcción de expresión que codifica una proteasa auxiliar que difiere de la proteína y que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 65 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, presentando la proteasa auxiliar una actividad proteolítica y sustituyendo en el microorganismo al menos a una proteasa codificada por el cromosoma.
- 35 7.- Microorganismo según la reivindicación 6, **caracterizado porque**
- (a) la proteína no está presente de forma natural en el microorganismo y/o
- (b) la proteasa auxiliar no está presente de forma natural en el microorganismo y/o
- (c) la expresión de la proteasa auxiliar intensifica la expresión de la proteína y/o
- 40 (d) el microorganismo es una bacteria, preferentemente una que se selecciona del grupo formado por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, con más preferencia una que se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Burkholderia glumae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Vibrio metschnikovii*.
- 45 8.- Uso de un microorganismo según una de las reivindicaciones 6 o 7 para la producción de una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, [beta]-glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa.
- 50

Figura 1:

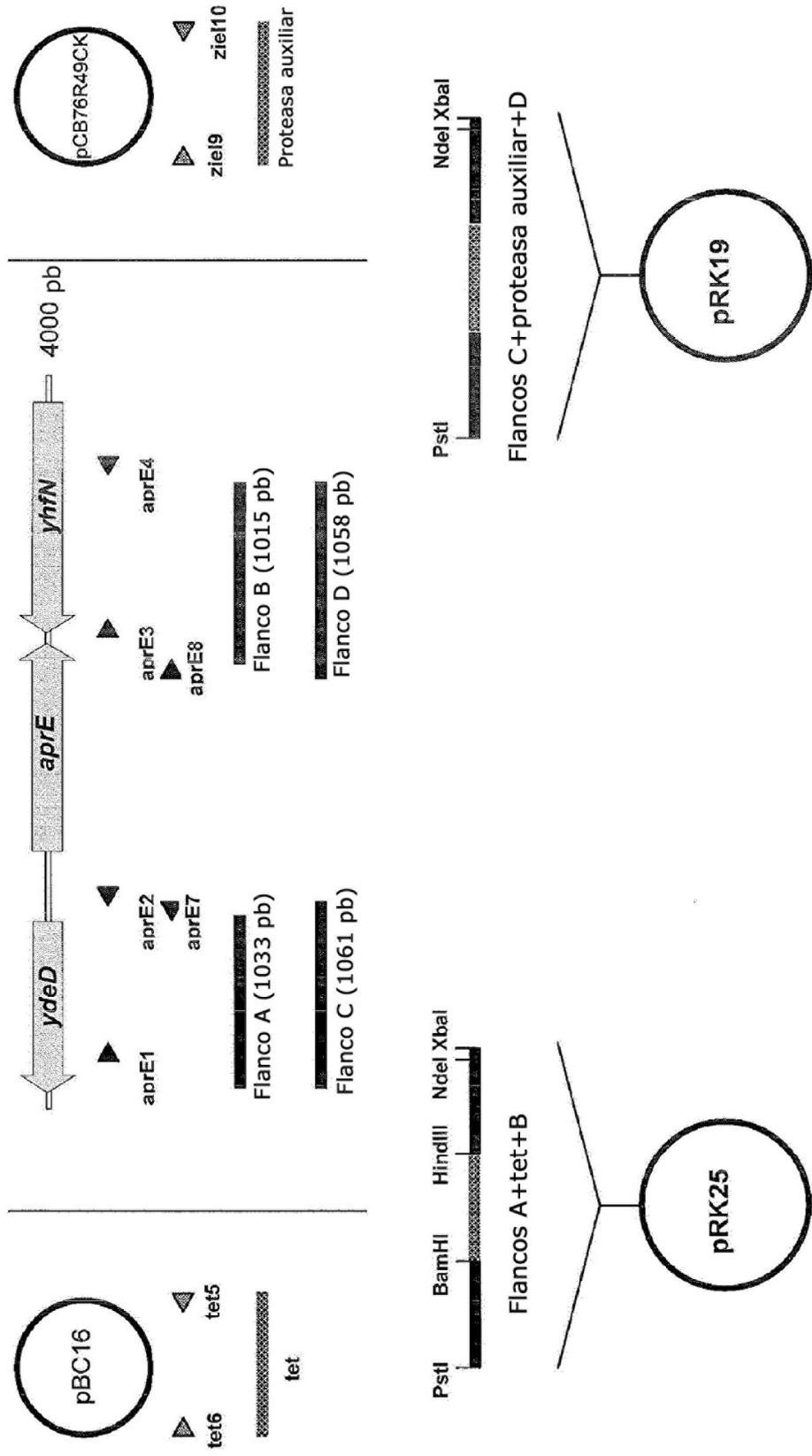
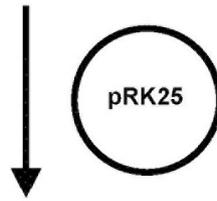
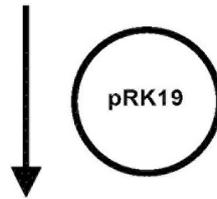


Figura 2:

Silvestre:



$\Delta aprE::tet$ :



$\Delta aprE::$ Proteasa auxiliar



Figura 3:

Actividad de la proteasa objetivo [%]

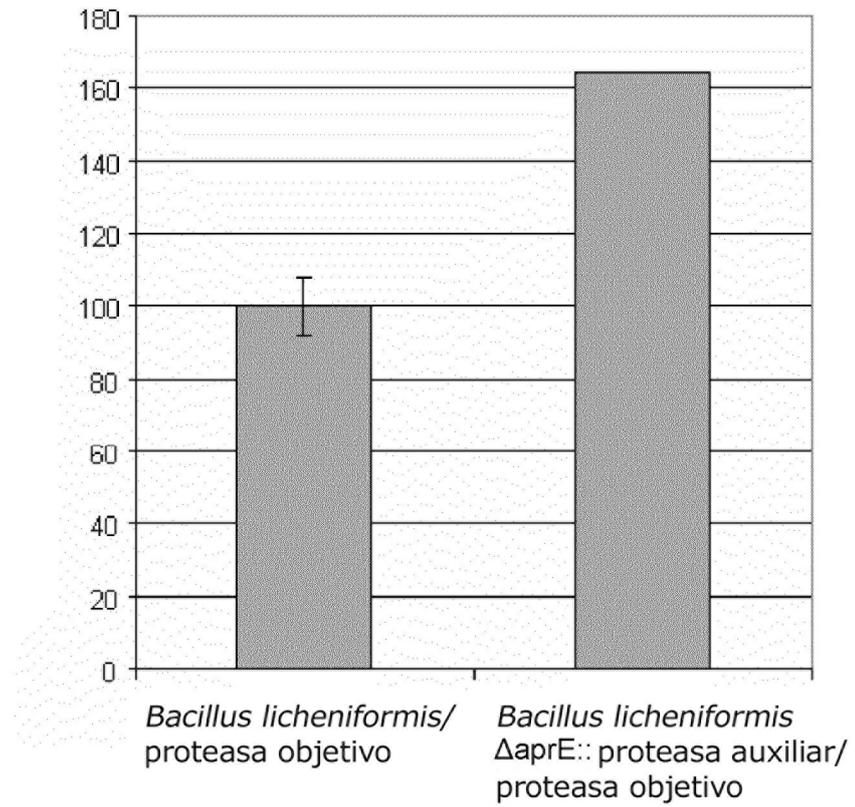


Figura 4:

