(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 667 318**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/54	(2006.01)
C11D 3/386	(2006.01)
A23K 50/75	(2006.01)
A23K 20/189	(2006.01)
A23K 50/60	(2006.01)
A23K 50/30	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/EP2012/076355**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098185**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12812955 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2798062**

(54) Título: **Polipéptidos con actividad de proteasa**

(30) Prioridad:

28.12.2011 EP 11195932

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2018

(73) Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es:

HOFF, TINE;
SJOEHOLM, CARSTEN;
OESTERGAARD, PETER RAHBEK y
PONTOPPIDAN, KATRINE

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 667 318 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

Polipéptidos con actividad de proteasa.

Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de proteasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican las proteasas. La invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores y células huésped, que incluyen células vegetales y animales, que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, al igual que a métodos para producir y utilizar las proteasas, en particular el uso de las proteasas en pienso para animales y detergentes.

Antecedentes de la invención

[0003] En el uso de proteasas en pienso para animales (*in vivo*), y/o el uso de tales proteasas para tratar proteínas vegetales (*in vitro*), cabe señalar que las proteínas son factores nutricionales esenciales para animales y humanos. Mucho ganado y muchos seres humanos obtienen las proteínas necesarias a partir de fuentes de proteínas vegetales. Fuentes de proteínas vegetales importantes son, por ejemplo, cultivos oleaginosos, legumbres y cereales.

[0004] Cuando, por ejemplo, se incluye harina de soja en el pienso de animales monogástricos tales como cerdos y aves de corral, una proporción significativa de los sólidos de la harina de soja no se digiere eficazmente (la digestibilidad de proteína ileal aparente en lechones, cerdos en crecimiento y aves de corral tales como pollos de engorde, gallinas ponedoras y gallos es solo de alrededor del 80 %).

[0005] El tracto gastrointestinal de los animales consiste en una serie de segmentos que representan cada uno ambientes de pH diferentes. En animales monogástricos tales como cerdos y aves de corral y muchos pescados, el estómago muestra pH fuertemente ácido tan bajo como pH 1-2, mientras que el intestino muestra un pH más neutro en la región de pH 6-7. Las aves de corral, además de estómago e intestino, también tienen un buche antes del estómago, el pH en el buche se determina principalmente por el pienso ingerido y, por lo tanto, se extiende típicamente en el rango de pH 4-6. La digestión de proteínas por una proteasa puede ocurrir a lo largo de todo el tracto digestivo, dado que la proteasa es activa y sobrevive a las condiciones en el tracto digestivo. Por lo tanto, son especialmente deseables las proteasas que son altamente estables en ácido para la supervivencia en el ambiente gástrico y que al mismo tiempo son eficientemente activas en un amplio pH fisiológico del animal objetivo.

[0006] También, se formula frecuentemente el pienso para animales en forma granulada, donde se aplica vapor en el proceso de granulación. Por lo tanto, también es deseable que las proteasas usadas en el pienso para animales sean capaces de permanecer activas después de la exposición al tratamiento de vapor.

[0007] Las proteasas también se han usado durante muchos años en composiciones detergentes para hidrolizar materiales proteicos en tejidos, superficies duras y otras superficies, como la piel, etc. Tales composiciones detergentes se pueden usar para la limpieza de tejidos, lavado a mano o en máquinas automáticas mediante polvos, comprimidos o pastillas de jabón, y en el lavado de la vajilla a mano o máquina como polvos y comprimidos.

[0008] WO2001/58276 divulga el uso en pienso para animales de proteasas estables en ácido relacionadas con la proteasa derivada de *Nocardiopsis sp.* NRRL 18262 (la proteasa 10R).

[0009] Las nuevas proteasas de la familia S53 de la invención son útiles también para estos fines.

[0010] Para producir una proteasa para uso industrial, es importante que la proteasa se produzca en grandes producciones que hagan que el producto esté disponible en cantidades suficientes con el objetivo de ser capaz de proporcionar la proteasa a un precio favorable.

Polipéptidos con actividad de proteasa

[0011] Los polipéptidos con actividad de proteasa, o proteasas, son a veces también designados peptidasas, proteinasas, péptido hidrolasas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo que hidrolizan péptidos que empiezan en cada extremo de las mismas, o del tipo endo que actúan internamente en las cadenas

del polipéptido (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran actividad en sustratos de péptidos bloqueados en el N y C terminal que son pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

[0012] El término "proteasa" se define aquí como una enzima que hidroliza enlaces de péptidos. Esta definición de proteasa también se aplica a la parte de proteasa de los términos "proteasa progenitora" y "variante de proteasa" usados en este documento. El término "proteasa" incluye cualquier enzima pertenenciente al grupo enzimático EC 3.4 (incluidas cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a Enzyme Nomenclature 1992 de NC-IUBBM, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Bio-chem. 1994, 223,1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232,1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237,1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250,1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente. La nomenclatura se suplementa y actualiza regularmente; véase, por ejemplo, la World Wide Web (WWW) en http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html.

[0013] Las proteasas de la invención y para el uso según la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) proteasas pertenecientes al grupo enzimático EC 3.4.21.; y/o
(b) serina proteasas de la familia S53 de peptidasas, que comprende dos tipos diferentes de peptidasas: tripeptidil aminopeptidasas (tipo exo) y endopeptidasas.

[0014] Como se describe en Biochem. J. 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasas MEROPS, versión 9.4 (31 de enero de 2011) (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 38, D227-D233.

[0015] La familia S53 de peptidasas contiene endopeptidasas que actúan en ácido y tripeptidil peptidasas.

[0016] Los residuos de la tríada catalítica son Glu, Asp, Ser, y hay un residuo ácido adicional, Asp, en el agujero de oxoanión. El residuo Ser es el nucleófilo equivalente a Ser en la tríada de subtilisina Asp, His, Ser, y el Glu de la tríada es una sustitución para la base general His en subtilisina.

[0017] La mutación de cualquiera de los aminoácidos de la tríada catalítica u agujero de oxoanión dará lugar a un cambio o pérdida de actividad enzimática. Los aminoácidos de la tríada catalítica y agujero de oxoanión de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 (SEQ ID N.º: 5) son probablemente posiciones Glu-82, Asp-86, Asp-175 y Ser-353.

[0018] Las peptidasas de la familia S53 tienden a ser lo más activas en pH ácido (a diferencia de las subtilisinas homólogas), y esto se puede atribuir a la importancia funcional de los residuos carboxílicos, sobre todo Asp en el agujero de oxoanión.

[0019] Las secuencias de aminoácidos no son muy similares a las de la familia S8, y esto, tomado junto con los residuos de sitio activo bastante diferentes y el pH inferior resultante para la actividad máxima, proporciona una diferencia sustancial con esa familia.

[0020] El pliegue de proteínas de la unidad de peptidasa para miembros de esta familia se parece al de la subtilisina, el ejemplo tipo de clan SB.

[0021] Una nueva proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 con alta actividad a bajo pH (3-4) en la harina de soja-maíz se identificó y clonó en relación con la presente invención.

[0022] Para determinar si una proteasa determinada es una serina proteasa, y una proteasa de la familia S53, se hace referencia al manual anterior y a los principios indicados en el mismo. Tal determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0023] La actividad de proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, en el que se emplee un sustrato, que incluya enlaces de péptidos pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El ensayo de pH y el ensayo de temperatura también se deben adaptar a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Ejemplos de temperatura de ensayo son 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 o 95 °C. Ejemplos de sustratos de proteasa son colágeno, tal como colágeno reticulado con azurina (colágeno AZCL), orsuc-AAPR-pNA. Ejemplos de ensayos de proteasas adecuados se describen en la parte experimental.

Descripción de la técnica relacionada.

[0024] Proteasas S53 aisladas de *Bacillus sp.* se conocen en la técnica. Un ejemplo es un *B. coagulans* del que dos proteasas S53 han sido asignadas con una identidad con la SEQ ID N.º: 5 de la presente invención del 41,3 % y 37,2 % y *Bacillus sp.* MN-32 con una identidad con la SEQ ID N.º: 5 de la presente invención del 39,5 %.

[0025] En Noelling *et al.*; 'Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium Clostridium acetobutylicum' J Bacteriol. 183:4823-4838 (2001) se describe una posible proteasa de aspartilo periplásmico que tiene el 65,9 % identidad con la SEQ ID N.º: 5 de la presente invención (UNIPROT:Q97LD7, SEQ ID N.º: 9). La publicación indica que es una serina proteasa. La misma secuencia con número de UNIPROT F0K735 se describe también por Hu *et al.* en 'Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in Clostridium acetobutylicum EA 2018', BMC Genomics 12:93-93 (2011) y fue además presentada a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ por Bao, G Li, Y en abril de 2011 bajo UNIPROT:F7ZTR3.

[0026] En WO 2005/066339 se describen dos secuencias (SEQ ID N.º: 29 y 30) de una cepa de *Alicyclusbacillus sp*. como serina proteasas carboxílicas. Las secuencias tienen el 52,3 % identidad con la SEQ ID N.º: 5 de la presente invención. La solicitud no indica ningún uso específico del péptido de las SEQ ID N.º: 29 o 30, pero indica usos de composiciones que comprenden los diversos péptidos descritos en detergente, comida, repostería, productos fermentados, zumos de frutas, pienso para animales, fabricación de pasta, etc.

[0027] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las proteasas de la invención son serina proteasas de la familia S53 de peptidasas. Las proteasas de la invención muestran propiedades de pH, especialmente propiedades de estabilidad de pH que las hacen de interés sustancial como candidatas para el uso en pienso para animales y otras aplicaciones.

[0028] Las proteasas de la invención son proteasas ácidas con una especificidad de tipo tripsina. Las proteasas tienen actividad en Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA con un amplio rango de pH de 3-6 y retienen más del 80 % de actividad después de someterse durante 2 horas a pH tan bajo como 3.

[0029] El uso de proteasas en pienso para animales para mejorar la digestión de proteínas en el pienso es conocido. WO 95/28850 divulga la combinación de una fitasa y una o más enzimas proteolíticas microbianas para mejorar la solubilidad de proteínas vegetales. WO 01/58275 divulga el uso de proteasas estables en ácido de la familia de la subtilisina en el pienso para animales. WO 01/58276 divulga el uso en pienso para animales de proteasas estables en ácido en relación con la proteasa derivada de *Nocardiopsis sp.* NRRL 18262 (la proteasa 10R), al igual que una proteasa derivada de *Nocardiopsis alba* DSM 14010. WO 04/072221, WO 04/111220, WO 04/111223, WO 05/035747 y WO 05/123911 revelan proteasas relacionadas con la proteasa 10R y su uso en pienso para animales. También, WO 04/072279 divulga el uso de otras proteasas.

[0030] WO 04/034776 divulga el uso de una subtilisina/queratinasa, PWD-1 de *B. licheniformis* en el pienso para aves de corral. WO 04/077960 divulga un método para aumentar la digestibilidad de un forraje o un grano en rumiantes aplicando una proteasa bacteriana o fúngica.

[0031] Productos comerciales que comprenden una proteasa y comercializados para el uso en el pienso para animales incluyen RONOZYME® ProAct (DSM, NP/Novozymes) Axtra® (Danisco), Avizyme® (Danisco), Porzyme® (Danisco), Allzyme™ (Alltech), Versazyme® (BioResources; Int.), Poultrygrow™ (Jefo) y Cibenza® DP100 (Novus).

Resumen de la invención

[0032] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de proteasa seleccionados del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6;
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3;
(c) una variante que comprende una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6, donde el número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50; y
(d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c), que tiene actividad de proteasa, donde el fragmento comprende al menos 415 residuos de aminoácidos;

donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

[0033] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención, constructos de ácido nucleico, vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos, y a métodos de producción de los polipéptidos.

[0034] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden el polipéptido de la invención tales como composiciones de pienso para animales al igual que aditivos para pienso para animales que comprenden el polipéptido de la invención. La presente invención se refiere además a métodos para la preparación de una composición para el uso en pienso para animales, para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y métodos de tratamiento de proteínas para usarse en las composiciones de pienso para animales.

Breve descripción de las figuras

[0035] En las figuras:

La fig. 1 muestra un perfil de pH-actividad de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en comparación con la proteasa 10R. Se usó suc-AAPR-pNA como sustrato para la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138. Se usó suc-AAPF-pNA como sustrato para la proteasa 10R,
La fig. 2 muestra el perfil de ph-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a 37 °C de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en comparación con la proteasa 10R,
La fig. 3 muestra el perfil de temperatura-actividad a pH 4,0 de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en comparación con el perfil de temperatura-actividad a pH 6,5 de la proteasa 10R,
La fig. 4 muestra la especifidad P1 en 10 sustratos de Suc-AAPX-pNA a pH 4,0 de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en comparación con la especifidad P1 en 10 sustratos de Suc-AAPX-pNA a pH 9,0 de la proteasa 10R,
La fig. 5 muestra la actividad relativa en harina de soja-maíz de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en comparación con la proteasa 10R.
La fig. 6 muestra el nivel de grupos α-amino libres tras la incubación de digesta de molleja durante 1 hora a dosis de proteasas en aumento en comparación con una muestra sin incubar, y
La fig. 7 muestra el grado de hidrólisis de proteínas (DH; %) en las muestras de digestión *in vitro* después del tratamiento con la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 o proteasa 10R y medido después de la incubación gástrica (■) y la incubación gástrica + intestinal completa (□). Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticamente.

Visión general del listado de secuencias

[0036]

La SEQ ID N.º: 1 es la secuencia de ADN aislada a partir de *Bacillus sp.* 19138.
La SEQ ID N.º: 2 es la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la SEQ ID N.º: 1.
La SEQ ID N.º: 3 es la secuencia de ADN de la secuencia de ADN expresada recombinante con etiqueta HQ.
La SEQ ID N.º: 4 es la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la SEQ ID N.º: 3.
La SEQ ID N.º: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *Bacillus sp.* 19138.
La SEQ ID N.º: 6 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa madura obtenida a partir de la SEQ ID N.º 3.
La SEQ ID N.º: 7 es la secuencia de ADN de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID N.º: 1).
La SEQ ID N.º: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID N.º: 2).
La SEQ ID N.º: 9 es la secuencia de aminoácidos a partir de *Clostridium-acetobutylicum* (SWISSPROT:F0K735).
La SEQ ID N.º: 10 es una señal de secreción de *Bacillus lentus*.

Matriz de identidad de las secuencias:

	SEQ ID Nº: 2	SEQ ID Nº: 4	SEQ ID Nº: 5	SEQ ID Nº: 6	SEQ ID Nº: 8	SEQ ID Nº: 9
SEQ ID Nº: 2	100	98,1	100	100	33,3	58,6
SEQ ID Nº: 4	98,1	100	100	100	33,3	59,3
SEQ ID Nº: 5	100	100	100	100	29,6	65,9
SEQ ID Nº: 6	100	100	100	100	29,6	65,9
SEQ ID Nº: 8	33,3	33,3	29,6	29,6	100	28,6
SEQ ID Nº: 9	58,6	59,3	65,9	65,9	28,6	100

Definiciones

[0037] **Variante alélica**: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin

cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0038] **ADNc**: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro empalmado obtenida a partir de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN primario inicial es un precursor para el ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, entre los que se incluye el empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0039] **Secuencia codificante**: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido recombinante, sintético, ADNc o ADN.

[0040] **Secuencias de control**: el término "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativas o foráneas entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptidos, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada de transcripción y de traducción. Las secuencias de control pueden proprocionarse con enlaces con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0041] **Expresión**: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido entre los que se incluyen, pero de forma no limitativa, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0042] **Vector de expresión**: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y que se enlaza operativamente a nucleótidos adicionales que proprocionan su expresión.

[0043] **Fragmento**: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (varios) aminoácidos eliminados del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de proteasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 415 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 11-425 de la SEQ ID N.º: 2), al menos 425 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 6 a 430 de la SEQ ID N.º: 2). En otro aspecto, un fragmento contiene al menos 420 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 11-430 de la SEQ ID N.º: 4), al menos 430 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 6 a 435 de la SEQ ID N.º: 4).

[0044] **Célula huésped**: el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0045] **Polinucleótido aislado**: el término "polinucleótido aislado" significa un polinucleótido que se modifica mediante la acción del hombre con respecto a ese polinucleótido tal como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos 1 % puro, por ejemplo, al menos 5 % puro, más al menos 10 % puro, al menos 20 % puro, al menos 40 % puro, al menos 60 % puro, al menos 80 % puro, al menos 90 % puro y al menos 95 % puro, determinado por electrofóresis de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético o sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0046] **Polipéptido aislado**: el término "polipéptido aislado" significa un polipéptido que se modifica mediante la acción del hombre con respecto a ese polipéptido tal como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, el polipéptido es al menos 1 % puro, por ejemplo, al menos 5 % puro, al menos 10 % puro, al menos 20 % puro, al menos 40 % puro, al menos 60 % puro, al menos 80 % puro y al menos 90 % puro, determinado por SDS-PAGE.

[0047] **Polipéptido maduro**: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento del N-terminal, truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 435 en la numeración de la SEQ ID N.º: 2, los aminoácidos -204 a -177 de la SEQ ID N.º: 2 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 442 en la numeración de la SEQ ID N.º: 4, los aminoácidos -203 a -177 de la SEQ ID N.º: 4 son un péptido señal.

[0048] **Secuencia codificante del polipéptido maduro**: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 613-1917 en la numeración de la SEQ ID N.º: 1. Además, los nucleótidos 1 a 84 en la numeración de la SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 610-1929 en la numeración de la SEQ ID N.º: 3. Además, los nucleótidos 1 a 81 en la numeración de la SEQ ID N.º: 3 codifican un péptido señal.

[0049] **Constructo de ácido nucleico**: el término "constructo de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, o monocatenaria o bicatenaria, que se aísla a partir de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no exisitiría de otro modo en la naturaleza o que es sintética. El término constructo de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0050] **Operativamente enlazado**: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con relación a la secuencia de codificación de un polinucleótido de tal manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

[0051] **Actividad de proteasa**: el término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Hay diferentes tipos de actividad de proteasa: los tres tipos de actividad principales son: tipo tripsina donde hay escisión de sustratos de amida después de Arg o Lys en P1, tipo quimiotripsina donde la escisión ocurre después de uno de los aminoácidos hidrofóbicos en P1, y tipo elastasa con escisión después de un Ala en P1. Para los fines de la presente invención, la actividad de proteasa se determina según el procedimiento descrito en "Materiales y métodos" más adelante.

[0052] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, y al menos el 100 % de la actividad de proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 5. Alternativamente, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60%, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % y al menos el 100 % de la actividad de proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 6.

[0053] **Identidad de secuencia**: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

[0054] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle marcado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción no resumida) se usa como el procentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100) / (Longitud de la alineación – número total de espacios en la alineación)

[0055] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle marcado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción no resumida) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Longitud de la alineación – número total de espacios en la alineación)

[0056] **Condiciones de astringencia**: las diferentes condiciones de astringencia se definen de la siguiente manera.

[0057] El término "condiciones de muy baja astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25 % de formamida, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 45 °C.

[0058] El término "condiciones de baja astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25 % de formamida, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 50 °C.

[0059] El término "condiciones de media astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35 % de formamida, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 55 °C.

[0060] El término "condiciones de media-alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35 % de formamida, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 60 °C.

[0061] El término "condiciones de alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50 % de formamida, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 65 °C.

[0062] El término "condiciones de muy alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50 % de formamida, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 70 °C.

[0063] **Subsecuencia**: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de proteasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1245 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 643 a 1887 de la SEQ ID N.º: 1), por ejemplo, y al menos 1275 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 628 a 1902 de la SEQ ID N.º: 1). En otro aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1260 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 640 a 1899 de la SEQ ID N.º: 3), por ejemplo, y al menos 1290 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 625 a 1914 de la SEQ ID N.º: 3).

[0064] **Polinucleótido sustancialmente puro**: el término "polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para usar en sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho el 10 %, como mucho el 8 %, como mucho el 6 %, como mucho el 5 %, como mucho el 4 %, como mucho el 3 %, como mucho el 2 %, como mucho el 1 % y como mucho el 0,5 % en peso de otro material de polinucleótido con el cual se asocia de forma nativa o recombinantemente. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos 90 % puro, por ejemplo, al menos 92 % puro, al menos 94 % puro, al menos 95 % puro, al menos 96 % puro, al menos 97 % puro, al menos 98 % puro, al menos 99 % puro y al menos 99,5 % puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención son preferiblemente de una forma sustancialmente pura.

[0065] **Polipéptido sustancialmente puro**: el término "polipéptido sustancialmente puro" significa una preparación que contiene como mucho el 10 %, como mucho el 8 %, como mucho el 6 %, como mucho el 5 %, como mucho el 4 %, como mucho el 3 %, como mucho el 2 %, como mucho el 1 % y como mucho el 0,5 % en peso de otro material de polipéptido con el cual se asocia de forma nativa o recombinantemente. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 92 % puro, por ejemplo, al menos 94 % puro, al menos 95 % puro, al menos 96 % puro, al menos 97 % puro, al menos 98 % puro, al menos 99 %, al menos 99,5 % puro y 100 % puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención son preferiblemente de una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

[0066] **Variante**: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de proteasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una deleción significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de proteasa

[0067] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de proteasa seleccionados del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6;
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3;
(c) una variante que comprende una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6, donde el número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50; y
(d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c), que tiene actividad de proteasa, donde el fragmento comprende al menos 415 residuos de aminoácidos;

donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

[0068] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que tiene actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8. En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cincuenta aminoácidos, por ejemplo, por cuarenta y tres aminoácidos, por cuarenta aminoácidos, por treinta y cinco aminoácidos, por treinta aminoácidos, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0069] La presente invención también se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 80 %, por ejemplo al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 87 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que tienen actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8. En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cincuenta aminoácidos, por ejemplo, por cuarenta y tres aminoácidos, por cuarenta aminoácidos, por treinta y cinco aminoácidos, por treinta aminoácidos, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por diez aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0070] La presente invención se refiere además a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 4 de al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que tienen actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8. En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cincuenta aminoácidos, por ejemplo, por cuarenta y tres aminoácidos, por cuarenta aminoácidos, por treinta y cinco aminoácidos, por treinta aminoácidos, por veinticinco aminoácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por doce aminoácidos, por diez aminoácidos, por nueve aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 4.

[0071] La presente invención también se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 4 de al menos el 80 %, por ejemplo al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 87 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que tienen actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R

expuesta en la SEQ ID N.º: 8. En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cincuenta aminoácidos, por ejemplo, por cuarenta y tres aminoácidos, por cuarenta aminoácidos, por treinta y cinco aminoácidos, por treinta aminoácidos, por veinticinco ácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por diez aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 4.

[0072] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0073] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 85 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0074] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0075] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 91 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0076] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 92 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0077] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 93 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0078] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 94 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0079] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0080] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 96 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0081] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 97 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0082] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 98 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0083] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 99 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0084] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con el 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0085] La presente invención también se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 de al menos el 80 %, por ejemplo al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 87 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que tienen actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8. En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cincuenta aminoácidos, por ejemplo, por cuarenta y tres aminoácidos, por cuarenta aminoácidos, por treinta y cinco aminoácidos, por treinta aminoácidos, por veinticinco ácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por diez aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5.

[0086] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0087] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 85 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0088] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0089] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 91 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0090] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 92 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0091] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 93 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0092] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 94 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0093] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0094] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 96 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0095] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 97 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0096] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 98 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0097] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 99 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0098] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con el 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0099] La presente invención también se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 6 de al menos el 80 %, por ejemplo al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 87 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que tienen actividad de proteasa, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8. En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cincuenta aminoácidos, por ejemplo, por cuarenta y tres aminoácidos, por cuarenta aminoácidos, por treinta y cinco aminoácidos, por treinta aminoácidos, por veinticinco ácidos, por veinte aminoácidos, por quince aminoácidos, por diez aminoácidos, por ocho aminoácidos, por siete aminoácidos, por seis aminoácidos, por cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos y por un aminoácido del polipéptido de la SEQ ID N.º: 6.

[0100] Un polipéptido de la presente invención comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento que falta, por ejemplo, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos del N y/o C-terminal y que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 435 de la SEQ ID N.º: 2.

[0101] Un polipéptido de la presente invención comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 4 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento que falta, por ejemplo 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos del N y/o C-terminal y que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 442 de la SEQ ID N.º: 4.

[0102] Un polipéptido de la presente invención comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 5 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento que falta, por ejemplo, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos desde el N y/o C-terminal y que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 435 de la SEQ ID N.º: 5.

[0103] Un polipéptido de la presente invención comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 6 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento que falta, por ejemplo 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos del N y/o C-terminal y que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 442 de la SEQ ID N.º: 6.

[0104] La presente invención también divulga polipéptidos aislados con actividad de proteasa que se codifican por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de alta astringencia, o condiciones de muy alta astringencia, con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 3, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii) (J.

Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0105] El polinucleótido de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3; o una subsecuencia de la misma, al igual que la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 5, la SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 o un fragmento del mismo, se puede utilizar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos con actividad de proteasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el genómico o ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero deberían tener una longitud de al menos 14, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos o al menos 900 nucleótidos. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S, biotina o avidina). Tales sondas se incluyen en la presente invención.

[0106] Una biblioteca de ADN o ADNc genómico obtenido a partir de tales otras cepas se puede consultar para ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de proteasa. El ADN genómico u otro de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3; o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa preferiblemente en una transferencia de Southern.

[0107] Para los fines de la presente invención, hibridación indica que el polinucleótido hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 3; su cadena complementaria en toda su longitud; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de media a muy alta astringencia. Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, película de rayos X.

[0108] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5, la SEQ ID N.º: 6, el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 4, o un fragmento del mismo. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3.

[0109] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de alta a muy alta astringencia se definen como prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y o 25 % de formamida para muy bajas y bajas astringencias, o 35 % de formamida para medias y altas astringencias, o 50 % de formamida para altas y muy altas astringencias, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas óptimamente. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 65 °C (alta astringencia), y a 70 °C (muy alta astringencia).

[0110] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación e hibridación a de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C por debajo de la T_m calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 48:1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de ácido etilendiaminotetraacético, 0,5 % de NP-40,1X solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP, y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas óptimamente. El material portador se lava finalmente una vez en 6X SCC más 0,1 % de SDS durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos utilizando 6X SSC a de 5 °C a 10 °C por debajo de la T_m calculada.

[0111] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados con actividad de proteasa codificada por polinucleótidos con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 de al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

[0112] La presente invención se refiere además a polipéptidos aislados con actividad de proteasa codificada por polinucleótidos con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID

N.º: 3 de al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

[0113] En formas de realización particulares, las proteasas progenitoras y/o las variantes de proteasas de la invención y para el uso según la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.21; y
(b) serina proteasas de la familia S53 de peptidasas; como se describen en Biochem.J. 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasas MEROPS, versión 9.5 (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 38, D227-D233.

[0114] Para determinar si una proteasa determinada es una serina proteasa, y una proteasa de la familia S53, se hace referencia al manual anterior y a los principios indicados en el mismo. Tal determinación se puede llevar a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0115] La presente invención también divulga variantes que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 o una secuencia homóloga de la misma. Alternativamente, la presente invención divulga una variante del polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 que comprende una sustitución, deleción y/o inserción en una o más (varias) posiciones. El número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

[0116] La presente invención también divulga variantes que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 4 o una secuencia homóloga de la misma. Alternativamente, la presente invención divulga una variante del polipéptido de la SEQ ID N.º: 4 que comprende una sustitución, deleción y/o inserción en una o más (varias) posiciones. El número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones del polipéptido de la SEQ ID N.º: 4 no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

[0117] La presente invención también divulga variantes que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o una secuencia homóloga de la misma. Alternativamente, la presente invención también se refiere a una variante del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 que comprende una sustitución, deleción y/o inserción en una o más (varias) posiciones, donde el número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 y 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

[0118] La presente invención también divulga variantes que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 6 o una secuencia homóloga de la misma. Alternativamente, la presente invención también se refiere a una variante del polipéptido de la SEQ ID N.º: 6 que comprende una sustitución, deleción y/o inserción en una o más (varias) posiciones, donde el número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 6 no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50, donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 y 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

[0119] Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de naturaleza menor, es decir sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del terminal amino o carboxilo, tal como un residuo de metionina del terminal amino; un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0120] Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina,

triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en The Proteins, Academic Press, Nueva York. Los intercambios que ocurren más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0121] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares. Los aminoácidos esenciales en un polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Well, 1989, Science 244: 1081-1085). En la técnica anterior, mutaciones de alanina única se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de proteasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos a la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. Las identidades de aminoácidos esenciales también se pueden inferir a partir de análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el polipéptido progenitor.

[0122] Las sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como los que se describen por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE.UU. nº 5.223.409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire *et al.*, 1986, Gene 46: 145; Ner *et al.*, 1988, DNA 7: 127).

[0123] Los métodos de mutagénesis/redistribución pueden combinarse con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar a partir de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar de la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0124] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una porción de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal de una porción de otro polipéptido.

[0125] El polipéptido puede ser un polipéptido fusionado o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido fusionado se produce mediante la fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estas estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor (los mismos promotores) y terminador. Las proteínas de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde se crean fusiones postraduccionalmente (Cooper *et al.*, 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson *et al.*, 1994, Science 266: 776-779).

[0126] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y libera los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin *et al.*, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton *et al.*, 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter *et al.*, 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0127] El polipéptido se puede expresar mediante una secuencia de ADN recombinante que contiene la codificación para una etiqueta His o etiqueta HQ para dar, después de cualquier modificación postraduccional, el polipéptido maduro que contiene la totalidad o parte de la etiqueta His o HQ. La etiqueta HQ, con la secuencia -RHQHQHQ, se puede escindir completamente o parcialmente del polipéptido durante las modificaciones postraduccionales dando como resultado, por ejemplo, los aminoácidos adicionales tales como -RHQHQH, -RHQHQ, -RHQH, -RHQ, -RH o -R fijados al *N*-terminal del polipéptido maduro. La etiqueta His, que tiene la secuencia - RPHHHHHH, se puede escindir completamente o parcialmente del polipéptido durante las

modificaciones postraduccionales dando como resultado aminoácidos adicionales tales como -RPHHHHH, -RPHHHH, -RPHHH, - RPHH, -RPH, -RP o -R fijados al *N*-terminal del polipéptido maduro.

Formas de realización

[0128] En algunas formas realización de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades térmicas beneficiosas tales como termoestabilidad, estabilidad al vapor, etc. y/o propiedades de pH, tales como estabilidad en ácido, pH óptimo, etc.

[0129] Una forma de realización de la invención son polipéptidos aislados con actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5, tal como entre pH 4 y 5, tal como pH 3, tal como pH 4, tal como pH 5, a 25 °C en comparación con la proteasa 10R.

[0130] Una forma de realización adicional de la invención son polipéptidos aislados con actividad de proteasa mejorada entre 15 °C y 60 °C, tal como entre 25 °C y 50 °C, tal como a 15 °C, a 25 °C, a 37 °C, a 50 °C o a 60 °C en comparación con la proteasa 10R.

[0131] Una forma de realización adicional de la invención es actividad de proteasa mejorada en harina de soja-maíz entre pH 3,0 y 5,0, tal como a pH 3,0, a pH 4,0 o a pH 5,0 a 40 °C en comparación con la proteasa 10R.

[0132] Otra forma de realización de la invención es actividad de degradación de proteínas mejorada de digesta de pollos de engorde expresada como el nivel de grupos alfa-amino libres en la molleja después de 1 hora a 40 °C en comparación con el original (sin proteasa presente).

Propiedades de acidez/alcalinidad

[0133] En algunas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades beneficiosas con respecto al pH, tales como estabilidad en ácido, pH óptimo, etc. La estabilidad de la proteasa a pH bajo es beneficiosa, ya que la proteasa puede tener actividad en el intestino después de pasar por el estómago. En una forma de realización de la invención, la proteasa retiene > 80 % de actividad después de 2 horas a pH 3 como se determina utilizando el método descrito en el ejemplo 3.

Temperatura-actividad

[0134] El perfil de temperatura-actividad de la proteasa se puede determinar como se describe en el ejemplo 3. La actividad a bajas temperaturas (30-40 °C) puede ser ventajosa para la digestión de proteínas en un animal.

[0135] En una forma de realización, la invención comprende una proteasa que tiene un perfil de temperatura-actividad a pH 4,0 con actividad relativa de 0,20 o superior a 25 °C, o actividad relativa de 0,50 o superior a 37 °C en comparación con la actividad de la proteasa a 60 °C (*cf.* ejemplo 3).

Termoestabilidad

[0136] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 8, es decir usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, T_d, de la proteína de proteasa purificada. La Td es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: a mayor T_d, mayor termoestabilidad. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la proteasa de la invención tiene una T_d que es superior a la T_d de una proteasa de referencia, donde la T_d se determina en las muestras de proteasa purificada (preferiblemente con una pureza de al menos el 90 % o 95 %, como se determina por SDS-PAGE).

[0137] En formas de realización preferidas, las propiedades térmicas tales como la estabilidad térmica, la estabilidad de temperatura, la termoestabilidad, la estabilidad al vapor y/o la estabilidad de granulación proporcionada por la actividad residual, la temperatura de desnaturalización T_d, u otro parámetro de la proteasa de la invención son mayores que el valor correspondiente, tal como la actividad residual o T_d, de la proteasa de la SEQ ID N.º: 6, más preferiblemente al menos el 101 % del mismo, o al menos el 102 %, 103 %, 104 %, 105 %, 106 %, 107 %, 108 %, 109 %, o al menos el 110 % del mismo. Aún más preferiblemente, el valor del parámetro, tal como actividad residual o T_d, de la proteasa de la invención es al menos el 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 % o al menos el 190 % del valor para la proteasa de la SEQ ID N.º: 6.

[0138] En otras formas de realización particulares adicionales, la proteasa termoestable de la invención tiene una temperatura de fusión, T_m (o una temperatura de desnaturalización, T_d), determinada usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) como se describe en el ejemplo 10 (es decir, en 20 mM de acetato sódico, pH 4,0), de al menos 50 °C. En otras formas de realización particulares adicionales, la T_m es al menos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 100 °C.

Estabilidad al vapor

[0139] La estabilidad al vapor se puede determinar como se describe en el ejemplo 9 determinando la actividad residual de moléculas de proteasa después del tratamiento de vapor a 85 °C o 90 °C durante un corto periodo de tiempo.

Estabilidad de granulación

[0140] La estabilidad de granulación se puede determinar como se describe en el ejemplo 10 usando granulado enzimático premezclado con pienso. Desde el mezclador, el pienso se acondiciona con vapor a 95 °C. Después del acondicionamiento, el pienso se prensa en gránulos y se determina la actividad residual.

Fuentes de polipéptidos con actividad de proteasa

[0141] Un polipéptido con actividad de proteasa de la presente invención puede obtenerse a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenerse a partir de" como se utiliza aquí en relación con una fuente determinada significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente determinada se secreta extracelularmente.

[0142] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido con actividad de proteasa a partir de una bacteria grampositiva dentro de un filo tal como *Bacillus, Firmicutes* o *Actinobacteria* o a partir de una bacteria gramnegativa dentro de un tipo tal como *Proteobacteria*.

[0143] En un aspecto, el polipéptido es una proteasa a partir de una bacteria de la clase *Bacilli*, tal como del orden *Bacillales*, o del género *Bacillus* o la especie *Bacillus sp.* 19138.

[0144] Las cepas de estos taxones son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivo, tal como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0145] El polipéptido se puede identificar y obtener partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. El polinucleótido que codifica el polipéptido puede entonces obtenerse filtrando de forma similar una biblioteca genómica o de ADNc u otra muestra de microorganismo o de ADN mezclado. Una vez que se ha detectado con la(s) sonda(s) un polinucleótido que codifica un polipéptido, el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Polinucleótidos

[0146] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención.

[0147] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento a partir de ADN genómico, la preparación a partir de ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o filtrado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada por ligación (LAT) y amplificación basada en polinucleótidos (NASBA) se pueden utilizar. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Bacillus sp.*, u organismo relacionado u otro del orden *Bacillales* y así, por ejemplo, puede ser un alélico o variante de especie del polipéptido que codifica una región del polinucleótido.

[0148] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en polinucleótidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3 de al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, que codifican un polipéptido con actividad de proteasa.

[0149] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas que no ocurren de forma natural del polipéptido. Estos polipéptidos

pueden diferir de algún modo diseñado del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La variante se puede construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0150] La presente invención también divulga polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de alta astringencia, o condiciones de muy alta astringencia, con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3, (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define aquí.

[0151] En un aspecto, el polinucleótido comprende o consiste en la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3, la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3, o una subsecuencia de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3 que codifica un fragmento de la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º 4 con actividad de proteasa, tal como el polinucleótido de los nucleótidos 613-1917 de la SEQ ID N.º: 1 o el polinucleótido de los nucleótidos 610-1929 de la SEQ ID N.º: 3.

Constructos de ácido nucleico

[0152] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0153] Un polinucleótido se puede manipular de varias maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0154] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de la elección, entre los que se incluyen promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.

[0155] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos a partir del gen de alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de penicilinasa (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, operón lac de *E. coli*, gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor* y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert *et al.*, 1980, Scientific American, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

[0156] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos a partir de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido *de Aspergillus niger,* glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado con un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* donde el líder no traducido

ha sido sustituido por un líder no traducido de un gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados que incluyen el gen que condifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0157] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0158] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de la transcripción adecuada, que se reconoce por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al 3'-terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de la elección se puede utilizar en la presente invención.

[0159] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0160] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0161] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, cuando transcrita es una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5'-terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de la elección se puede utilizar.

[0162] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0163] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0164] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3'-terminal del polinucleótido y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de la elección se puede utilizar.

[0165] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0166] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[0167] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal enlazada de forma natural en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal foránea puede ser requerida donde la secuencia codificante no contenga de forma natural una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de la elección se puede utilizar.

[0168] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras (*nprT, nprS, nprM*) de *Bacillus stearothermophilus* y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal se describen por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0169] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0170] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles se describen por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0171] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0172] Donde tanto el péptido señal como las secuencias de propéptidos estén presentes en el N-terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptidos se sitúa junto al N-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal se sitúa junto al N-terminal de la secuencia de propéptidos.

[0173] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen que se va a activar o desactivar en respuesta a un estímulo químico o físico, entre los que se incluyen la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac, tac* y *trp*. En la levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de alfa-amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido se enlazaría operativamente con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0174] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada de la transcripción y la traducción. Los diversos nucleótidos y secuencias de control se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar mediante la inserción del polinucleótido o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0175] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se debe introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0176] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma (los cromosomas) donde se ha integrado. Además, se puede utilizar un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se debe introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0177] El vector contiene preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocida o virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0178] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los dalgenes de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como ampicilina, cloranfenicol, canamicina o resistencia de tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Preferidos para el uso en una célula de *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0179] El vector contiene preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0180] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación (unas ubicaciones) precisa(s) en el cromosoma (los cromosomas). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases, y de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

[0181] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" significa un polinucleótido que habilita la replicación *in vivo* de un plásmido o vector.

[0182] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184, que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1, que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0183] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0184] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0185] Se pueden insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0186] Los procedimientos usados para ligar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0187] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un

polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriomente. El término "célula huesped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifique el polipéptido y su fuente.

[0188] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0189] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus, Brevibacillus, Clostridium, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Paenibacillus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero de forma no limitativa, *E. coli*, y *Pseudomonas*.

[0190] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillales* entre las que se incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

[0191] La célula huésped bacteriana puede ser también cualquier célula de *Streptomyces* entre las que se incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0192] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos y electroporación (véase, por ejemplo, Gong *et al.*, 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier *et al.*, 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (véase, por ejemplo, Burke *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, efectuarse por electroporación (véase, por ejemplo, Choi *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, efectuarse por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207, por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley *et al.*, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped se puede usar.

[0193] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

[0194] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye los filos *Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como se define por Hawkswort *et al.* en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido), así como el *Oomycota* (como se cita en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

[0195] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (*Endomycetales*), levadura basidioesporogénea y levadura perteneciente a los hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series Nº. 9, 1980).

[0196] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyce lactis, Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces norbensis, Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

[0197] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define por Hawkswort *et al.*,

1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0198] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Chrysosporium, Coprinus, Coriolus, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromyces, Pleurotus, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes* o *Trichoderma*.

[0199] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0200] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de un modo conocido *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y de *Trichoderma* se describen en EP 238023 y Yelton *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* se describen por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75: 1920.

Métodos de producción

[0201] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) el cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Bacillus*. En un aspecto más preferido, la célula es de *Bacillus sp*-19138.

[0202] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

[0203] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación, y fermentación a pequeña escala o a gran escala (entre las que se incluyen fermentaciones continuas, en lote, en lote alimentado o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan la expresión o el aislamiento del polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente a partir del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar a partir de lisados celulares.

[0204] Más detalles se proporcionan en la sección en "Constructos de ácido nucleico, vectores de expresión, células huésped recombinantes y métodos para la producción de proteasas" más adelante.

[0205] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido.

[0206] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar a partir del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero de forma no limitativa, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0207] El polipéptido se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero de forma no limitativa, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, de cromatoenfoque hidrofóbica y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

[0208] En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que una célula huésped de la presente invención que expresa un polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.

Plantas

[0209] La presente invención también divulga plantas, por ejemplo, una planta transgénica, una parte de una planta o una célula vegetal, que incluye un polinucleótido aislado de la presente invención de manera que expresa y produce el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar a partir de la planta o de la parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de la planta que contiene el polipéptido se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas o para destruir un factor antinutritivo.

[0210] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de prados (pasto azul, Poa), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0211] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, legumbres, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo de modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0212] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemos. Los compartimentos de células vegetales específicos, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma también se consideran que son una parte de una planta. Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen del tejido, se considera que es una parte de una planta. Asimismo, partes de una planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de una planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0213] También se incluye en el campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0214] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido en el genoma huésped vegetal o genoma de cloroplasto y propagando la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

[0215] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de la planta de la elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huésped en las que se ha integrado el constructo de expresión y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método de introducción de ADN que se vaya a usar).

[0216] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias señales o de tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea que se exprese el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido puede ser constitutiva o inducible, o puede ser de desarrollo, de fase o tejido específico, y el producto génico puede dirigirse a un tejido específico o parte de una planta tal como las semillas o las hojas. Las secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, por Tague *et al.*, 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0217] Para la expresión constitutiva, se pueden utilizar el 35S-CaMV, la ubiquitina 1 de maíz, y el promotor de actina 1 de arroz (Franck *et al.*, 1980, Cell 21: 285-294; Christensen *et al.*, 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689;

Zhang *et al.*, 1991, Plant Cell 3: 1155-1165). Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patatas y frutos (Edwards y Coruzzi, 1990, Ana. Rev. Genet. 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemos (Ito *et al.*, 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como la glutelina, prolamina, globulina, o un promotor de albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, Plant Cell Physiol. 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, J. Plant Physiol. 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo oleaginoso de semilla (Chen *et al.*, 1998, Plant Cell Physiol. 39: 935-941), el promotor *napA* de la proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyozuka *et al.*, 1993, Plant Physiol. 102: 991-1000), el promotor de gen de adenina metiltransferasa del virus de chlorella (Mitra e Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26: 85-93), el promotor *aldP* del gen de arroz (Kagaya *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet. 248: 668-674), o un promotor inducible por herida como el promotor *pin2* de patata (Xu *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol. 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0218] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir una mayor expresión de un polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

[0219] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de los disponibles en la técnica.

[0220] El constructo de ácido nucleico se incorpora en el genoma vegetal según técnicas convencionales conocidas en la técnica, que incluyen transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, Sciece 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, Nature 338: 274).

[0221] Actualmente, la transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para consulta, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y también puede usarse para la transfomación de monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son frecuentemente usados para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno recubiertos con el ADN de transfomación) de callos embriogénicos o embriones de desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como se describe por Omirulleh *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428. Los métodos de transformación adicionales para el uso conforme a la presente descripción incluyen aquellos descritos en las patentes de EE.UU. Nº. 6.395.966 y 7.151.204.

[0222] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o bien en las generaciones siguientes usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica del sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0223] Además de la transformación directa de un genotipo vegetal particular con un constructo preparado según la presente invención, las plantas transgénicas se pueden hacer cruzando una planta que tiene el constructo con una segunda planta que carece del constructo. Por ejemplo, un constructo que codifica un polipéptido se puede introducir en una variedad de planta particular por cruce, sin la necesidad de transformar siempre directamente una planta de esta variedad determinada. Por lo tanto, la presente invención abarca no solo una planta directamente regenerada a partir de células que han sido transformadas conforme a la presente invención, sino también la progenie de tales plantas. Como se utiliza en este caso, progenie puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente invención. Tal progenie puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención, o una porción de un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención. El cruce da como resultado la introducción de un transgén en una línea vegetal por polinización cruzada de una línea de inicio con una línea vegetal donadora. Ejemplos no limitativos de tales pasos se articulan adicionalmente en la patente de EE.UU. N.º: 7.151.204.

[0224] Las plantas se pueden generar a través de un proceso de conversión retrocruzada. Por ejemplo, plantas incluyen plantas referidas como un genotipo, línea, innato o híbrido convertido retrocruzado.

[0225] Los marcadores genéticos se pueden utilizar para asistir en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un contexto genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas con respecto al cultivo convencional en tanto que este se puede usar para evitar errores provocados por variaciones de fenotipos. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que de otro modo tiene un contexto genético no agronómicamente deseable se cruza con un progenitor de élite, se pueden utilizar marcadores genéticos para seleccionar las progenies que no solo poseen la característica de interés, sino que también tienen una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, el número de generaciones requerido para la introgresión de uno o más rasgos en un contexto genético particular se minimiza.

[0226] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprenden: (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

Composiciones

[0227] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una proteasa de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal proteasa. El término "enriquecerse" indica que la actividad de proteasa de la composición se ha aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

[0228] La composición puede comprender una proteasa de la presente invención como el principal componente enzimático, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa. La(s) enzima(s) adicional(es) se puede(n) producir, por ejemplo, por microorganismos tales como bacterias u hongos o por plantas o por animales. Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede ser en forma de un granulado o un microgranulado. La proteasa se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0229] La presente invención también se dirige a métodos para utilizar los polipéptidos con actividad de proteasa, o composiciones de los mismos.

Uso en pienso para animales

[0230] La presente invención también se dirige a métodos para utilizar las proteasas con actividad de proteasa en el pienso para animales, al igual que para composiciones alimenticias y aditivos alimentarios que comprenden las proteasas de la invención.

[0231] El término animal incluye todos los animales, incluidos los seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado, por ejemplo, ganado bovino, vacas y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o porcinos (incluidos, de forma no limitativa, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluidos, de forma no limitativa, pollos de engorde, ponedoras); caballos (incluidos, de forma no limitativa, de sangre caliente, de sangre fría y de sangre templada), terneros jóvenes; y pescado (incluidos, de forma no limitativa, salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas; y crustáceos (incluidos, de forma no limitativa, langostinos y gambas).

[0232] El término pienso o composición alimenticia significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para, o destinada para, la ingesta por un animal.

[0233] En el uso según la invención, la proteasa puede alimentarse al animal antes o después de la dieta o simultáneamente. Se prefiere la última opción.

[0234] En una forma de realización particular, la proteasa, en la forma en que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo para pienso, está bien definida. Bien definida significa que la preparación de proteasa es al menos 50 % pura determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (véase el ejemplo 12 de WO

01/58275). En otras formas de realización particulares, la preparación de proteasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95 % pura determinado por este método.

[0235] Una preparación de proteasa bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente al pienso una proteasa que es libre esencialmente de interferir o contaminar otras proteasas. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basándose en el efecto deseado.

[0236] Para el uso en pienso para animales, sin embargo, la proteasa no necesita ser tan pura; esta puede, por ejemplo, incluir otras enzimas, en cuyo caso se podría denominar una preparación de proteasa.

[0237] La preparación de proteasa puede (a) adicionarse directamente al pienso (o usarse directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) puede usarse en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimentarios o premezclas que se añaden posteriormente al pienso (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de proteasa original, tanto si se usa según (a) como (b) anteriores.

[0238] Las preparaciones de proteasa con purezas de este orden de magnitud son en particular obtenibles usando métodos recombinantes de producción, aunque que no son tan fácilmente obtenidas y también se someten a una variación entre lotes mucho mayor cuando la proteasa se produce por métodos de fermentación tradicionales.

[0239] Tal preparación de proteasa puede estar, por supuesto, mezclada con otras enzimas.

[0240] La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y hueso, harina de pluma y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

[0241] El término proteínas vegetales como se utiliza en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluya al menos una proteína derivada u originada a partir de un vegetal, que incluyen proteínas modificadas y derivados de proteína. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60 % (p/p).

[0242] Las proteínas vegetales se pueden derivar a partir de fuentes de proteína vegetal, tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*leguminosae*), *Cruciferaceae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de altramuz y harina de semilla de colza.

[0243] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo, soja, altramuz, guisante o judía.

[0244] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.

[0245] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.

[0246] La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0247] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.

[0248] En una forma de realización particular de un proceso de tratamiento, la(s) proteasa(s) en cuestión está(n) afectando (o actuando en, o ejerciendo su hidrolización o influencia de degradación en) las proteínas, tales como proteínas vegetales o fuentes de proteína. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteína se suspende típicamente en un solvente, por ejemplo, un solvente acuoso tal como agua, y el pH y los valores de temperatura se ajustan teniendo en consideración las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a un valor de pH en el que la actividad de la proteasa real sea al menos del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o al menos del 90 %. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a una temperatura en la que la actividad de la proteasa real sea al menos del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o al menos del 90 %. Las indicaciones de porcentaje de actividad anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática se continúa hasta que se consiga el resultado deseado, después de lo cual se puede o no detener inactivando la enzima, por ejemplo, mediante un paso de tratamiento térmico.

[0249] En otra forma de realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de proteasa se sostiene, lo que significa, por ejemplo, que la proteasa se adiciona a las proteínas, pero su influencia de hidrolización no se acciona, por así decirlo, hasta después cuando se desee, una vez que las condiciones de

hidrolización adecuadas sean establecidas, o una vez que cualquier inhibidor enzimático sea desactivado, o cualquier otro medio que pudiera haberse aplicado para posponer la acción de la enzima.

[0250] En una forma de realización, el tratamiento es un pretratamiento de pienso para animales o proteínas para usar en pienso para animales, es decir las proteínas se hidrolizan antes de la ingesta.

[0251] El término mejorar el valor nutricional de un pienso para animales significa mejorar la disponibilidad de los nutrientes en el pienso. En esta invención, mejorar los valores nutricionales se refiere en particular a mejorar la disponibilidad de la fracción de proteína del pienso, conduciendo así a una extracción de proteína aumentada, mayores producciones de proteína y/o una utilización de proteína mejorada. Cuando el valor nutricional del pienso se aumenta, la digestibilidad de proteínas y/o aminoácidos se aumenta y el índice de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión de pienso (es decir, el peso de pienso ingerido con respecto al aumento de peso) del animal se puede mejorar.

[0252] La proteasa se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como una proteasa relativamente pura o en una mezcla con otros componentes destinados para adición a pienso para animales, es decir en forma de aditivos para pienso, tales como las denominadas premezclas para pienso para animales.

[0253] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones para el uso en el pienso para animales, tales como pienso para animales y aditivos para pienso, por ejemplo, premezclas.

[0254] Aparte de la proteasa de la invención, los aditivos para pienso para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.

[0255] Además, ingredientes de aditivos para pienso opcionales son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína; estabilizadores; aditivos de mejora del crecimiento y compuestos aromáticos/aromatizantes, por ejemplo creosol, anetol, deca y/o undeca y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilideno ftálido, butilideno ftálio, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo; también se puede usar un soporte que puede contener, por ejemplo, 40-50 % en peso de fibras de madera, 8-10 % en peso de estearina, 4-5 % en peso de polvo de cúrcuma, 4-58 % en peso de polvo de romero, 22-28 % en peso de piedra caliza, 1-3 % en peso de una goma, tal como goma arábiga, 5-50 % en peso de azúcar y/o almidón y 5-15 % en peso de agua.

[0256] Un pienso o un aditivo para pienso de la invención también puede comprender al menos una otra enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa adicional (EC 3.4); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

[0257] En una forma de realización particular, estas otras enzimas son bien definidas (como se define anteriormente para las preparaciones de proteasa).

[0258] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, leucocina A, tritrpticina, protegrina 1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y estatinas, que incluyen los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

[0259] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, al igual que variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0260] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

[0261] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0262] Por lo general, las vitaminas solubles en grasa y agua, al igual que los oligoelementos, forman parte de una denominada premezcla destinada para la adición al pienso, mientras que los macrominerales se añaden normalmente de forma separada al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con una proteasa de la invención, es un aditivo alimentario para animales de la invención.

[0263] En una forma de realización particular, el aditivo para pienso para animales de la invención se destina para ser incluido (o se prescribe como que tiene que ser incluido) en dietas o pienso para animales en niveles de

0,01 a 10,0 %; más particularmente de 0,05 a 5,0 %; o de 0,2 a 1,0 % (donde el % significa g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

[0264] Las siguiente son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

[0265] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, ca-D-pantotenato.

[0266] Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

[0267] Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

[0268] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes se deberían proporcionar en la dieta en las concentraciones indicadas.

[0269] Alternativamente, el aditivo para pienso de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro, etcétera, hasta todos los trece, o hasta todos los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en tal cantidad que proporcione una concentración en pienso en el rango indicado en la columna cuatro, o columna cinco o columna seis de la tabla A.

[0270] En una otra forma de realización adicional, el aditivo para pienso para animales de la invención comprende al menos una de las siguientes vitaminas, preferiblemente para proporcionar una concentración en pienso en los rangos especificados a continuación en la tabla 1 (para dietas de lechón y dietas de pollos de engorde, respectivamente).

Tabla 1: Recomendaciones típicas de vitaminas

Vitamina	Dieta de lechón	Dieta de pollo de engorde
Vitamina A	10.000-15.000 UI/kg de pienso	8-12.500 UI/kg de pienso
Vitamina D3	1800-2000 UI/kg de pienso	3000-5000 UI/kg de pienso
Vitamina E	60-100 mg/kg de pienso	150-240 mg/kg de pienso
Vitamina K3	2-4 mg/kg de pienso	2-4 mg/kg de pienso
Vitamina B1	2-4 mg/kg de pienso	2-3 mg/kg de pienso
Vitamina B2	6-10 mg/kg de pienso	7-9 mg/kg de pienso
Vitamina B6	4-8 mg/kg de pienso	3-6 mg/kg de pienso
Vitamina B12	0,03-0,05 mg/kg de pienso	0,015-0,04 mg/kg de pienso
Niacina (vitamina B3)	30-50 mg/kg de pienso	50-80 mg/kg de pienso
Ácido pantoténico	20-40 mg/kg de pienso	10-18 mg/kg de pienso
Ácido fólico	1-2 mg/kg de pienso	1-2 mg/kg de pienso
Biotina	0,15-0,4 mg/kg de pienso	0,15-0,3 mg/kg de pienso
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de pienso	300-600 mg/kg de pienso

[0271] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales. Las composiciones de pienso o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas de aves de corral y de cerdos se pueden caracterizar como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además, tales dietas de pescado normalmente tienen un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg.

[0272] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334.

[0273] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y comprende además al menos una proteasa como se reivindica aquí.

[0274] Además, o alternativamente (al contenido de proteína bruta indicado anteriomente), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

[0275] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de cualquiera de los rangos 2, 3, 4 o 5 de la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

[0276] La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina mediante el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis, 14ª ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.).

[0277] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación NRC Nutrient requirements in swine, novena edición corregida, 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

[0278] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas se calcula basándose en tablas de pienso tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

[0279] En una forma de realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.

[0280] La composición de pienso para animales de la invención también puede contener proteína animal, tal como harina de carne y hueso, harina de pluma y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad del 0-25 %. La composición de pienso para animales de la invención también puede comprender granos de destilería secos con solubles (DDGS), típicamente en cantidades del 0-30 %.

[0281] En otras formas de realización particulares adicionales, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80 % de maíz; y/o 0-80 % de sorgo; y/o 0-70 % de trigo; y/o 0-70 % de cebada; y/o 0-30 % de avena; y/o 0-40 % de harina de soja; y/o 0-25 % de harina de pescado; y/o 0-25 % de harina de carne y hueso; y/o 0-20 % de suero de leche.

[0282] Las dietas para animales pueden fabricarse, por ejemplo, como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los piensos molidos se mezclan y se agregan cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales según las especificaciones para las especies en cuestión. Las enzimas se pueden adicionar como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para pienso triturado, una formulación enzimática sólida o líquida se puede adicionar antes de o durante el paso de la mezcla de ingredientes. Para pienso granulado, la preparación de proteasa/enzima (líquida o sólida) también se puede adicionar antes de o durante el paso de ingrediente de pienso. Típicamente una preparación de proteasa/enzima líquida se añade después del paso de granulación. La enzima también se puede incorporar en un aditivo para pienso o premezcla.

[0283] La concentración enzimática final en la dieta está en el rango de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo, en el rango de 0,5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.

[0284] La proteasa debería, por supuesto, aplicarse en una cantidad eficaz, es decir en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis, la digestibilidad, y/o mejorar el valor nutricional del pienso. Actualmente se contempla que la enzima se administre en una o varias de las siguientes cantidades (rangos de dosificación): 0,01-200, 0,01-100, 0,5-100, 1-50, 5-100, 10-100, 0,05-50; o 0,10-10 - donde todos estos rangos están en mg de proteína de proteasa por kg de pienso (ppm).

[0285] Para la determinación de los mg de proteína de proteasa por kg de pienso, la proteasa se purifica a partir de la composición de pienso y la actividad específica de la proteasa purificada se determina usando un ensayo pertinente (véase bajo actividad de proteasa, sustratos y ensayos). La actividad de proteasa de la composición de pienso como tal se determina también usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína de proteasa por kg de pienso.

[0286] Los mismos principios se aplican a la determinación de mg de proteína de proteasa en aditivos alimentarios. Por supuesto, si está disponible una muestra de la proteasa usada para la preparación del aditivo para pienso o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no hay necesidad de purificar la proteasa de la composición de pienso o el aditivo).

Composiciones detergentes

[0287] Se revela que la proteasa de la invención se puede adicionar a una composición detergente y volverse así un componente de la misma.

[0288] La composición detergente de la invención puede formularse, por ejemplo, como una composición detergente de lavado a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo para lavado adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante de tejido adicionado de enjuague, o formularse como una composición detergente para usar en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o formularse para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0289] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo detergente que comprende la proteasa de la invención. El aditivo detergente, al igual que la composición detergente, puede comprender una o más enzimas diferentes tales como otra proteasa, tales como proteasas alcalinas de *Bacillus*, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o una peroxidasa.

[0290] En general, las propiedades de la(s) enzima(s) elegida(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

[0291] Las lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados químicamente o creados genéticamente de proteína están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258068 y EP 305216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, cepa SD 705 de *Pseudomonas sp*. (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis* (Dartois *et al.* (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131,253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. Pumilus* (WO 91/16422). Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Las enzimas de lipasa disponibles comercialmente preferidas incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S). Las (alfa y/o beta) amilasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1.296.839. Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 97/43424, WO 00/60060 y WO 01/66712, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444. Las amilasas disponibles comercialmente son Natalase™, Supramyl™, Stainzyme™, Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

[0292] Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados químicamente o creados genéticamente de proteína están incluidos. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens, Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757 y WO 89/09259. Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutrales que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495257, EP 531372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/01544. Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0293] Las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257. Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes).

[0294] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una lechada, etc. Las formulaciones de aditivo detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lechadas.

[0295] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4.106.991 y 4.661.452 y se pueden recubrir opcionalmente por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenoglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos

etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento filmógenos adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas se pueden estabilizar, por ejemplo, añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238216.

[0296] La composición detergente de la invención puede tener cualquier forma conveniente, por ejemplo, una pastilla, un comprimido, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente con hasta un 70 % de agua y 0-30 % de solvente orgánico, o no acuoso.

[0297] La composición detergente comprende uno o más surfactantes, que pueden ser no iónicos, incluidos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los surfactantes están típicamente presentes en un nivel del 0,1 % al 60 % en peso.

[0298] Cuando se incluyen en el mismo, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de alcohol graso), alcohol etoxisulfato, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido graso alfa-sulfo, ácido alquil o alquenilsuccínico o jabón.

[0299] Cuando se incluyen en el mismo, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polihidroxi alquilo, o derivados N-acilo N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

[0300] El detergente puede contener 0-65 % de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminatetraacético, ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido alquil o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst).

[0301] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli (etilenglicol), poli (alcohol vinílico), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0302] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H_2O_2 tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de peracido tal como tetraacetiletilenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, del tipo amida, imida o sulfona.

[0303] La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención se puede(n) estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0304] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de tejidos que incluyen arcillas, potenciadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes suspensores de suciedad, agentes antirredeposición de suciedad, colorantes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótropos, inhibidores de decoloración o perfumes.

[0305] Actualmente se contempla que en las composiciones detergentes cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, puede adicionarse en una cantidad que corresponde con 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado.

[0306] La enzima de la invención se puede incorporar adicionalmente en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

Constructos de ácido nucleico, vectores de expresión, células huésped recombinantes y métodos para la producción de proteasas

[0307] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales polinucleótidos que codifican las proteasas de la invención.

[0308] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una proteasa, que comprenden: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende tal polinucleótido; y (b) la recuperación de la proteína.

[0309] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped. El término "proteína" no se pretende aquí que se refiera a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos y polipéptidos fusionados.

[0310] Preferiblemente, la proteína es una proteasa. Por ejemplo, la proteína puede ser una hidrolasa, tal como una enzima proteolítica o proteasa.

[0311] El gen se puede obtener a partir de cualquier fuente procariota, eucariota u otra.

[0312] La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no deberían interpretarse como limitativos del ámbito de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Ensayos de proteasa

1) Ensayo de suc-AAPR-pNA:

[0313]

Sustrato de pNA:	suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720).
Temperatura:	temperatura ambiente (25 °C)
Tampones de ensayo:	100 mM de ácido succínico, 100mM de HEPES, 100mM de CHES, 100 mM de CABS, 1mM de $CaCl_2$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100 ajustados para valores de pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0 con HCl o NaOH.

[0314] 20 µl de proteasa (diluidos en 0,01 % de Triton X-100) se mezclaron con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con 0,01 % de Triton X-100). El aumento en OD_{405} se controló como una medida de la actividad de proteasa.

2) Ensayo de suc-AAPF-pNA:

[0315]

Sustrato de pNA:	Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).
Temperatura:	temperatura ambiente (25 °C)
Tampones de ensayo:	100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de $CaCl_2$,150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, ajustados para valores de pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, y 11,0 con HCl o NaOH.

[0316] 20 µl de proteasa (diluidos en 0,01 % de Triton X-100) se mezclaron con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con 0,01 % de Triton X-100). El aumento en OD_{405} se controló como una medida de la actividad de proteasa.

3) Ensayo de Protazyme OL:

[0317]

Sustrato:	comprimido de Protazyme OL (colágeno reticulado y teñido; de Megazyme)
Temperatura:	controlada (temperatura de ensayo).
Tampón de ensayo:	100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de $CaCl_2$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, ajustados para valores de pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0 con HCl o NaOH.

[0318] Un comprimido de Protazyme OL se suspendió en 2,0 ml de 0,01 % de Triton X-100 por agitación suave. 500 µl de esta suspensión y 500 µl del tampón de ensayo se dispensaron en un tubo de Eppendorf y se colocaron en hielo. Se añadieron 20 µl de la muestra de proteasa (diluidos en 0,01 % de Triton X-100). El ensayo se inició transfiriendo el tubo de Eppendorf a un termomezclador de Eppendorf, que se configuró a la temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador de Eppendorf a su índice de agitación máximo (1400 r.p.m.). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. Después se centrifugó el tubo en un centrifugador helado durante unos pocos minutos y 200 µl de sobrenadante se transfirieron a una placa de microtitulación. OD_{650} se leyó como una medida de actividad de proteasa. Un tampón ciego se incluyó en el ensayo (en vez de la enzima).

4) Ensayo de Protazyme AK:

[0319]

Sustrato:	comprimido de Protazyme AK (caseína reticulada y teñida; de Megazyme)
Temperatura:	controlada (temperatura de ensayo).
Tampón de ensayo:	100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de $CaCl_2$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, pH 6,5.

[0320] Un comprimido de Protazyme AK se suspendió en 2,0 ml 0,01 % de Triton X-100 por agitación suave. 500 µl de esta suspensión y 500 µl del tampón de ensayo se dispensaron en un tubo de Eppendorf y se colocaron en hielo. Se añadieron 20 µl de la muestra de proteasa (diluidos en 0,01 % de Triton X-100). El ensayo se inició transfiriendo el tubo de Eppendorf a un termomezclador de Eppendorf, que se configuró a la temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador de Eppendorf a su índice de agitación máximo (1400 r.p.m.). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. Después el tubo se centrifugó en un centrifugador helado durante unos pocos minutos y 200 µl de sobrenadante se transfirieron a una placa de microtitulación. OD_{650} se leyó como una medida de actividad de proteasa. Un tampón ciego se incluyó en el ensayo (en vez de enzima).

5) Ensayo de suc-AAPX-pNA:

[0321]

Sustratos de pNA	: Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775) Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720) Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835) Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790) Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395) Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770) Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390) Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710) Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725) Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)
Temperatura:	temperatura ambiente (25 °C)
Tampón de ensayo:	100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de $CaCl_2$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, pH 4,0 o 9,0.

[0322] 20 µl de proteasa (diluidos en 0,01 % de Triton X-100) se mezclaron con 100 µl del tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con 0,01 % de Triton X-100). El aumento en OD_{405} se controló como una medida de la actividad de proteasa.

[0323] Los resultados se proporcionan en el ejemplo 3 más adelante.

Cepas

[0324] *Bacillus sp*-19138 (19138) se aisló a partir de una muestra de tierra de Australia obtenida en 1990 y proporcionada a Novozymes A/S (anteriormente Novo Nordisk A/S).

Ejemplo 1: Preparación de ADN y secuenciación del genoma de *Bacillus sp*-19138

[0325] El ADN cromosómico de *Bacillus sp*-19138 (19138) se aisló mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). 5 ug de ADN cromosómico de cada cepa se enviaron para secuenciación de

genoma a FASTERIS SA, Suiza. El genoma fue secuenciado por Illumina Sequencing. La secuencia de genoma se analizó para proteasas S53 segregadas y la proteasa S53 (SEQ ID N.º: 1/SEQ ID N.º: 2) se identificó.

Expresión de peptidasa S53 de *Bacillus sp.* 19138

[0326] Un sistema de vectores de integración lineal se usó para la clonación de la expresión del gen de peptidasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 (SEQ ID N.º: 1). El constructo de integración lineal fue un producto de fusión PCR hecho por la fusión del gen entre dos regiones cromosómicas homólogas de *Bacillus subtilis* junto con un promotor fuerte y un marcador de resistencia a cloranfenicol. La fusión se hizo por SOE PCR (Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. y Pease, L.R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes, gene splicing by overlap extension Gene 77: 61-68). El método SOE PCR también se describe en la solicitud de patente WO 2003095658. El gen se expresó bajo el control de un sistema de promotor triple (como se describe en WO 99/43835), que consiste en los promotores de gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), y el promotor de *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensisb* con secuencia estabilizante. El gen que codifica cloranfenicol acetiltransferasa se utilizó como marcador (descrito en, por ejemplo, Diderichsen, B.; Poulsen, G.B.; Joergensen, S.T.; A useful cloning vector for *Bacillus subtilis*. Plasmid 30:312 (1993)). Los constructos de gen finales se integraron en el cromosoma de *Bacillus* por recombinación homóloga en el locus de pectato liasa.

[0327] El fragmento de gen del gen S53 se amplificó a partir de ADN cromosómico de la cepa de *Bacillus sp.* 19138 con cebadores específicos de gen que contienen salientes a los dos fragmentos flanqueantes. Los fragmentos flanqueantes aguas arriba y aguas abajo se amplificaron a partir de ADN genómico de la cepa iMB1361 (descrita en la solicitud de patente WO 2003/095658). La peptidasa S53 se expresó con una señal de secreción de *Bacillus lentus* (con la siguiente secuencia de aminoácidos: MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA) que reemplaza la señal de secreción nativa. Se expresó con una etiqueta HQHQHQH de C-terminal fusionada directamente al C-terminal. La secuencia expresada es la SEQ ID N.º: 3.

[0328] Los dos fragmentos de vectores y el fragmento de gen se sometieron a un empalme por reacción de PCR de extension de superposición (SOE) para ensamblar los tres fragmentos en un constructo de vector lineal. Dos µl del producto de PCR se transformaron en *Bacillus subtilis*. Los transformantes se seleccionaron en placas LB suplementados con 6 µg de cloranfenicol por ml. Un clon de *Bacillus subtilis* recombinante con el constructo de expresión integrado se cultivó en cultivo líquido. El sobrenadante que contenía la enzima se cosechó y se purificó la enzima como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 2: Purificación de la proteasa S53 de *Bacillus sp*-19138

[0329] Una cepa de *Bacillus subtilis* se construyó como se indica en el ejemplo 1 para expresar la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 al medio de cultivo. El producto génico se construye para tener una etiqueta HQHQHQH de C-terminal para facilitar su purificación.

[0330] El caldo de cultivo se centrifugó (20000 x g, 20 min) y el sobrenadante se decantó cuidadosamente a partir del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0,2 µm para eliminar el resto de células huésped de *Bacillus*. La proteasa S53 se precipitó mediante la adición de sulfato de amonio sólido al filtro de 0,2 µm hasta una concentración de sulfato de amonio final de 3,2 M de $(NH_4)_2SO_4$ (80 % de saturación). Después de la centrifugación (20000 x g, 20 min), el precipitado se disolvió mediante adición de aprox. 4 volúmenes de agua desionizada. El pH de la solución enzimática disuelta se ajustó a pH 7,5 con 3 M de Tris-base y se aplicó a una columna de superflujo Ni-NTA (de QIAGEN) equilibrada en 50 mM de HEPES/NaOH, 5 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, pH 7,5. Después del lavado de la columna extensivamente primero con el tampón de equilibrado y luego con tampón de equilibrado con 15 mM de imidazol, la proteasa se eluyó por fases con 50 mM de HEPES/NaOH, 500 mM imidazol, pH 7,5. Se recogieron fracciones durante la elución y el valor máximo de proteasa S53 se transfirió a 20 mM de MES/NaOH, 1 mM de $CaCl_2$, pH 6,5 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). El pH de la enzima transferida de Sephadex G25 se ajustó a pH 7,5 con 3 M de Tris-base y las soluciones se aplicaron a una columna Q-sepharose FF (de GE Healthcare) equilibrada en 20 mM de HEPES/NaOH, 1 mM de $CaCl_2$, pH 7,5. Después de lavar extensivamente la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente de NaCl lineal (0 --> 0,5 M) en el mismo tampón sobre ocho volúmenes de columna. Fracciones de la columna se analizaron para actividad de proteasa (utilizando el ensayo de Protazyme OL a pH 4) y fracciones activas se analizaron adicionalmente por SDS-PAGE. Las fracciones puras se agruparon y el pH en el grupo se ajustó a pH 6,0 con 20 % de CH_3COOH. El grupo con pH ajustado se purificó y se usó para caracterización adicional.

Ejemplo 3: Caracterización de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138

[0331] El ensayo de suc-AAPR-pNA se usó para obtener el perfil de pH-actividad. El ensayo de Protazyme OL se usó para obtener el perfil de pH-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a valores de pH indicados). Para el perfil de pH-estabilidad, la proteasa se diluyó 7x en los diferentes tampones de ensayo de pH 2 a pH 11 para alcanzar los valores de pH de estos tampones y luego se incubó durante 2 horas a 37 °C. Tras la

incubación, el pH de las incubaciones de proteasa se retornó al mismo valor de pH de la muestra antes del ensayo para actividad residual, mediante dilución de la muestra con tampón de ensayo de pH 4,0. El ensayo de Protazyme OL se usó para obtener el perfil de temperatura-actividad a pH 4,0. El ensayo de suc-AAPX-pNA y diez sustratos de suc-AAPX-pNA diferentes se usaron para la obtención de la especificidad P1 de la proteasa S53 a pH 4,0. Los datos para la proteasa 10R se obtuvieron usando condiciones ligeramente diferentes. El perfil de pH-actividad fue sobre suc-AAPF-pNA, el perfil de pH-estabilidad usó suc-AAPF-pNA como sustrato de actividad, el perfil de temperatura fue en Protazyme AK a pH 6,5 y el perfil de especificidad P1 fue a pH 9,0.

[0332] Los resultados se muestran en las tablas 2-5 siguientes. Para la tabla 2, las actividades son relativas al pH óptimo para la enzima. Para la tabla 3, las actividades son actividades residuales relativas a una muestra, que se mantuvo en condiciones estables (5 °C, pH 4,0 o pH 9,0). Para la tabla 4, las actividades son relativas a la temperatura óptima a pH 4,0 (pH 6,5 para la proteasa 10R) para la enzima. Para la tabla 5, las actividades son relativas al mejor sustrato para la enzima.

Tabla 2: perfil de ph-actividad

pH	proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138	Proteasa 10R
2	0,01	-
3	0,16	0,00
4	0,86	0,02
5	1,00	0,07
6	0,14	0,21
7	0,01	0,44
8	0,00	0,67
9	0,00	0,88
10	0,00	1,00
11	0,00	0,93

Tabla 3: Perfil de ph-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a 37 °C)

pH	proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138	Proteasa 10R
2	0,00	0,78
3	0,83	1,03
4	1,16	0,99
5	1,11	1,00
6	1,14	1,03
7	0,94	1,01
8	0,03	0,98
9	0,03	0,99
10	0,05	0,99
11	0,07	0,86
Después de 2 horas a 5 °C	1,00 (a pH 4)	1,00 (a pH 9)

Tabla 4: Perfil de temperatura-actividad a pH 4,0 o pH 6,5

Temp. (°C)	Proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 (pH 4)	Proteasa 10R (pH 6,5)
15	0,08	0,01
25	0,32	0,02
37	0,59	0,06
50	0,91	0,13
60	1,00	0,35
70	0,43	0,96
80	0,17	1,00
90	-	0,18

Tabla 5: Especificidad de P1 en 10 sustratos de suc-AAPX-pNA a pH 4,0 o pH 9,0

Suc-AAPX-pNA	Proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 (pH 4)	Proteasa 10R (pH 9)
Suc-AAPA-pNA	0,07	0,13
Suc-AAPR-pNA	1,00	0,09
Suc-AAPD-pNA	0,00	0,00
Suc-AAPI-pNA	0,00	0,00
Suc-AAPM-pNA	0,08	0,78
Suc-AAPV-pNA	0,00	0,01
Suc-AAPL-pNA	0,06	0,18

Suc-AAPE-pNA	0,01	0,00
Suc-AAPK-pNA	0,12	0,08
Suc-AAPF-pNA	0,01	1,00

[0333] La pH-actividad en el sustrato de Suc-AAPR-pNA, el perfil de pH-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a 37 °C), el perfil de temperatura-actividad en Protazyme OL a pH 4,0 y la especificidad P1 en 10 sustratos de suc-AAPF-pNA a pH 4,0 para la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 también se muestran en las figuras 2-5 en comparación con los datos para la proteasa 10R.

Otras características para la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138

[0334] La determinación de la secuencia del N-terminal fue: VTPNPTG.

[0335] El peso molecular relativo determinado por SDS-PAGE fue aprox. M_r = 52 kDa.

[0336] El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto fue de 46811,5 Da.

[0337] La secuencia madura (de datos MS, datos EDMAN, secuencia traducida de *Bacillus sp.* 19138 más cinco de los siete residuos de aminoácidos de la etiqueta HQ (HQHQH) da):

VTPNPTGRMTNDLVSRYNVQPLYTKGANGSGQTIGIVTLADFNPSDAYSYWQYNNINVNPNRITKI
NVDGGSGLSEDAGSDETSLDVEQSGALAPGANLNVYVGPNTDTGFVDAYAKAINDNVAHQISAS
WGESESLINYYVQQQMETPEYAETFNQLFMQAAAQGTSMFASAGDSGAYDASGDLNTYDLSVDN
PADSPYITAAGGTTVPFTYTSTQYNLSITVPQERAWGWDYLYPLFDARGLNNPTGWAQRYFVGG
GGGFSQLFATPDYQTGVSGVNSYTAVHQWTPSSDFTSVTRDAQPTIVTGTGTGRNLPDLSMNAD
PYTGYSVYFNLPTTNGATTVDSGWATYGGTSFVAPQLAGLSALINSANGSEAGFWNPQLYRFAQS
NHSPLHPLNTAGASNDNVFYSGTPGAIYNQATGLGTPDVTALAQAFGKHQHQH (SEQ ID NO: 6)

[0338] El peso molecular calculado de esta secuencia madura fue de 46810,2 Da.

[0339] Estos datos sugieren que dos residuos de aminoácidos (QH) de la etiqueta -HQHQHQH se escinden del C-terminal del producto génico, posiblemente debido a autoproteólisis.

Ejemplo 4: Ensayo de actividad de harina de soja-maíz

[0340] Un ensayo de punto final que usa harina de soja-maíz como sustrato se utilizó para la obtención del perfil de actividad de las proteasas a pH 3-7.

[0341] Tampones de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CAPS, 1 mM de $CaCl_2$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100 se prepararon y ajustaron usando HCl o NaOH a un valor de pH de manera que, después de que el sustrato de harina de soja-maíz (1 g, proporción 30:70) haya sido mezclado con el tampón de ensayo (10 mL) para dar una lechada, el pH final de la lechada sea uno de los siguientes pH: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0.

[0342] 2 mL de lechada de harina de soja-maíz se mezclaron durante 30 min antes de la adición de proteasa y la incubación durante 3 horas a 40 °C (500 r.p.m.). La proteasa se añadió vía 100 µl 100 mM de tampón de acetato sódico (9,565 g/L de NaOAc, 1,75 g/L de ácido acético, 5 mM de $CaCl_2$, 0,01 % de BSA, 0,01 % de Tween20, pH 6,0). Los sobrenadantes se recogieron después de la centrifugación (10 min, 3000 x g, 0 °C) y se determinó la actividad de proteasa usando un ensayo colorimétrico basado en el método oftaldialdehído (OPA) esencialmente según Nielsen *et al.* (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci, 2001, 66: 642-646). Este ensayo detecta grupos α-amino libres y, por lo tanto, la actividad de proteasa se puede medir como un aumento en la absorbancia. Primero se filtraron 500 µl de cada sobrenadante a través de un filtro Microcon de 100 kDa por centrifugación (60 min, 12.000 x g, 5 °C). Las muestras se diluyeron 10x en agua desionizada y 25 µl de cada muestra se cargaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 repeticiones). Finalmente 200 µl de reactivo OPA se dispensaron en todos los pocillos y la placa se agitó (10 seg, 750 r.p.m.) y la absorbancia se midió a 340 nm. El nivel de actividad de proteasa se calculó como la diferencia entre absorbancia en la muestra tratada enzimática y la muestra de la forma preliminar y se expresó como "OD x factor de dilución".

[0343] Los resultados se muestran en la figura 5 y en la tabla 6 a continuación. La actividad proteolítica de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en la harina de soja-maíz fue alta a pH 3 y disminuyó con pH en aumento. A pH 3 y 4 la actividad fue significativamente superior que para la proteasa 10R lo que indica que la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 podría ser una enzima mucho más eficaz en el intestino superior de monogástricos donde hay un ambiente de pH ácido.

Tabla 6: Actividad de proteasa en harina de soja-maíz a pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0

pH	**Proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138**		**Proteasa 10R**	
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica
3,0	3,95	0,08	0,22	0,06
4,0	1,82	0,03	0,30	0,10
5,0	0,94	0,02	0,71	0,01
6,0	0,46	0,01	1,81	0,14
7,0	0,09	0,02	2,92	0,11

Ejemplo 5: Actividad de degradación de proteínas bajo condiciones de molleja

[0344] El material de digesta de molleja de pollos de engorde de 21 días de edad alimentados con una dieta de maíz-soja fue recogido; liofilizado y molido utilizando un molinillo de café pequeño. La muestra de molleja molida se suspendió (47 % p/v) en tampón (100 mM de ácido succínico, 1 mM de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, ajustados a pH 3 usando HCl) y se dejó a 4 °C durante la noche. La suspensión se calentó a 40 °C y 1 ml se dispensó en tubos mantenidos a 40 °C. Tres tubos que representaban muestras de forma preliminar (0 h) se centrifugaron inmediatamente (3000 x g, 0 °C, 10 min) y los sobrenadantes se congelaron. La enzima se añadió a los tubos restantes vía 50 µL 100 mM de tampón de acetato sódico (9,565 g/l de NaOAc, 1,75 g/L de ácido acético, 5 mM de $CaCl_2$, 0,01 % de BSA, 0,01 % de Tween20, pH 6,0) y las muestras se incubaron durante 1 hora a 40 °C mientras se agitaban (500 r.p.m.). Las muestras se centrifugaron (3000 xg, 0 °C, 10 min) y los sobrenadantes se recuperaron y se congelaron. El efecto de hidrolización de proteína de la proteasa se determinó analizando los grupos α-amino libres en los sobrenadantes utilizando el ensayo descrito bajo "ensayo de actividad de harina de soja-maíz".

[0345] Los resultados (figura 6 y tabla 7) mostraron un aumento significativo en los grupos α-amino libres en las muestras de formas preliminares incubadas durante 1 hora en comparación con las muestras de formas preliminares a las que no se deja incubar. Esto indica que hay proteasa activa en las muestras de digesta lo más probablemente de pepsina, que está presente en la molleja de los pollos de engorde. En la inclusión de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138, el nivel de grupos α-amino libres se aumentó adicionalmente en una manera de respuesta a la dosis. Estos datos sugieren que la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 será capaz de degradar la proteína en la molleja de los pollos de engorde y actuar sobre la actividad de pepsina ya presente en la molleja.

Tabla 7: Grupos α-amino libres tras la incubación de digesta de molleja a pH 3 con dosis en aumento de proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 (1 h, 40 °C) en comparación con una muestra que no se incubó

Tratamiento (periodo de incubación, horas; pH 3)	**Dosis de enzimas (mg/kg dm)**	**Número de repeticiones, n**	**Grupos α-amino libres (media ± DT)**
Forma preliminar (0 h)	0	3	1,20 ± 0,01 [d]
Forma preliminar (1 h)	0	3	1,36 ± 0,02[c]
Proteasa S53 de *Bacillus sp.* (1 h)	100	3	2,31 ± 0,10[b]
Proteasa S53 de *Bacillus sp.* (1 h)	200	3	2,62 ± 0,06[a]
[a, b, c, d] Las diferentes letras en superíndice indican diferencias estadísticas. La comparación de los medios se hizo utilizando la prueba de Tukey (α = 0,05) proporcionada por el procedimiento ANOVA (SAS Institute Inc.).			

Ejemplo 6: Ensayo de digestión *in vitro* simulando digestión intestinal gástrica y del intestino delgado

[0346] Un ensayo de digestión *in vitro* se utilizó para evaluar el efecto de las proteasas en un sustrato de pienso (harina de soja-maíz) en una configuración diseñada para simular la digestión gástrica y del intestino delgado en animales monogástricos.

[0347] El proceso de incubación consistió en una fase de digestión gástrica con pepsina porcina (SP7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a pH 3 seguido de una breve incubación en el duodeno a pH 3,8 y una incubación en el intestino delgado con pancreatina (8xUSB, P-7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a pH 7,0.

[0348] La digestión *in vitro* se realizó utilizando un sistema automatizado basado en un manipulador de líquidos Gilson (Biolab, Dinamarca). Para cada muestra 0,8 g de pienso se pesaron en un tubo y todos los tubos se

colocaron en el manipulador de líquidos (40 °C, 500 r.p.m.). Las adiciones de soluciones al igual que las mediciones de pH se realizaron automáticamente. En tiempo 0 min, 4,1 mL de HCl (24 mM de $CaCl_2$) se añadieron hasta alcanzar pH 3,0 en la solución. En tiempo 30 min, se añadieron 0,5 ml de HCl (24 mM de $CaCl_2$, 3000 U de pepsina/g de pienso) y 100 µL de un tampón de acetato sódico de 100 mM (258,6 g de NaOAc por litro, 0,57 % de ácido acético, pH 6,0). En tiempo 90 min, 900 µL de NaOH se añadieron hasta alcanzar pH -3,8 y en tiempo 120 min 400 µL de un 1 M de solución de $NaHCO_3$ que contiene 6,5 mg de pancreatina/g de pienso se añadieron y llevaron a pH 6,8 en la solución. El pH se midió en tiempo 30, 60, 90, 115, 120 y 180 min. Las proteasas de prueba se añadieron vía los 100 µL de tampón de NaOAc en tiempo 30 min.

[0349] El grado de hidrólisis de proteína (DH) se determinó usando un ensayo colorimétrico basado en el método oftaldialdehído (OPA) esencialmente según Nielsen *et al.* (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci, 2001,66: 642-646). Este ensayo detecta grupos α-amino libres y, por lo tanto, la actividad de proteasa se puede medir como un aumento de la absorbancia. Primero se filtran 500 µL de cada sobrenadante a través de un filtro Microcon de 100 kDa mediante centrifugación (60 min, 11.000 r.p.m., 5 °C). Las muestras se diluyen 100x en agua desionizada y 25 µL de cada muestra se cargan en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 repeticiones). Finalmente 200 µL de reactivo OPA se dispensa en todos los pocillos y la placa se agita (10 seg, 750 r.p.m.) y la absorbancia se mide en 340 nm. El porcentaje de enlaces de péptido escindidos (DH) se calculó como:

$$DH\ (\%) = 100 \times h / h_{tot,}$$

donde h_{tot} es el número total de enlaces de péptido por proteína equivalente, y h es el número de enlaces hidrolizados. El cálculo de h_{tot} se basa en la secuencia de aminoácidos de la materia prima. En este estudio el valor para la soja se usó (7,8 g equivalentes por kg proteína) según Adler-Nissen (J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers. 1986). La expresión de h en el método OPA es:

$$h = (\text{serina-}NH_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv/g de proteína,}$$

donde α = 0,970 y β = 0,342 según Adler-Nissen (Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27: 1256-1262. 1979). Serina-NH_2 se calcula como:

$$\text{Serina-}NH_2 = (OD_{\text{forma preliminar}} - OD_{\text{muestra}}) / (OD_{\text{estándar}} - OD_{\text{forma preliminar}}) \times 0{,}9516 \text{ meqv/L} \times 0{,}1 \times 100 / X \times P,$$

donde serina-NH_2 = meqv serina-NH_2/g proteína; X = g de muestra; P = % de proteína en la muestra y 0,1 es el volumen de muestra en litros (L).

[0350] Estadísticas: se realizó análisis estadístico de los parámetros registrados utilizando un procedimiento de análisis de varianza (ANOVA) y se hizo comparación de medios utilizando la prueba T de estudiante (α = 0,05) proporcionada por el procedimiento ANOVA (SAS, JMP® 5 Administrators Guide to Annually Licensed Windows, Mackintosh, and Linux Versions, versión 5.1. SAS Institute, Cary, NC. (2003)).

[0351] Los resultados (tabla 8 y figura 7) mostraron que mientras que la proteasa 10R no tuvo efecto en el grado de hidrólisis de proteínas (DH) durante la incubación gástrica de la digestión *in vitro*, la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 aumentó significativamente el DH. Después del procedimiento de digestión *in vitro* completo que incluye tanto la incubación gástrica como la intestinal, la proteasa 10R aumentó significativamente el DH mientras que el efecto por la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 era solo numérico. La actividad de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 durante la incubación gástrica presenta una nueva oportunidad para obtener hidrólisis de proteínas pronto en el proceso de digestión y puede también presentar una oportunidad para obtener una digestibilidad de proteínas aumentada mediante la mezcla de proteasas que actúan en los compartimentos gástricos e intestinales respectivamente.

Tabla 8: Grado de hidrólisis (DH, %) en muestras de digestión *in vitro* después del tratamiento con proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 o proteasa 10R y medido después de la incubación gástrica y la incubación completa gástrica + intestinal

Tratamiento	**Número de repeticiones, N**	**DH (%) medido después de la incubación gástrica**		**DH (%) medido después de la incubación completa**	
		Media	DT	Media	DT
Control	5	2,50 [b]	0,09	29,65 [b]	1,25
Proteasa S53 de Proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138	5	5,04 [a]	0,23	30,20 [b]	0,31
Proteasa 10R	5	2,49 [b]	0,09	33,22 [a]	1,20
[a, b] Las letras superíndices diferentes dentro de cada columna indican diferencias estadísticas.					

[0352] La figura 7 muestra el grado de hidrólisis (DH, %) en las muestras de digestión *in vitro* después del tratamiento con proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 o proteasa 10R y medido después de la incubación gástrica y la incubación completa gástrica + intestinal. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Ejemplo 7: Actividad proteolítica en la digesta del cultivo, la molleja y el íleon

[0353] Se recogió material de la digesta del cultivo, la molleja y el íleon de pollos de engorde de 21 días de edad alimentados con una dieta de maíz-soja; se liofilizó y se molió utilizando un molinillo de café pequeño. Las muestras molidas se suspendieron (47 % p/v) en los siguientes tampones y se dejaron hidratar a 4 °C durante la noche (sin agitación):

Tampón del cultivo:	100 mM de HEPES, 1 mM de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, ajustados a pH 5 usando HCl
Tampón de la molleja:	100 mM de ácido succínico, 1 mM de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, ajustados a pH 1,67 usando HCl
Tampón del íleon:	100 mM de HEPES, 1 mM de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton X-100, ajustados a pH 7,2 usando HCl

[0354] El pH resultante fue: pH 5 en las muestras del cultivo; pH 3 en las muestras de la molleja; y pH 7 en las muestras del íleon. Las suspensiones se calentaron a 40 °C y 1 mL se dispensó en tubos mantenidos a 40 °C. Tres tubos que representan formas preliminares (T_0) se centrifugaron inmediatamente (3000 x g, 0 °C, 10 min) y los sobrenadantes se congelaron. Se añadió enzima (200 mg de proteína enzimática/kg de sustrato) a los tubos restantes vía 50 µL de tampón de acetato sódico de 100 mM (9,565 g/l de NaAc, 1,75 g/l de ácido acético, 5 mM de $CaCl_2$, 0,01 % de BSA, 0,01 % de Tween20, pH 6,0) y las muestras del cultivo y del íleon se incubaron durante 3 horas (T_3) mientras que las muestras de la molleja se incubaron durante 1 hora (T_1) a 40 °C mientras se agitaban (500 r.p.m.). Las muestras se centrifugaron (3000 x g, 0 °C, 10 min) y los sobrenadantes se recuperaron y se congelaron. La actividad proteolítica se determinó analizando aminas primarias utilizando el ensayo oftaldialdehído (OPA).

[0355] Los resultados se muestran en la tabla 9. Para cada uno de los tipos de digesta (cultivo, molleja e íleon) hubo una diferencia significativa entre el nivel de aminas primarias en la muestra de la forma preliminar T_0 y las muestras de las formas preliminares incubadas durante 1 o 3 horas. Esta diferencia se puede asignar a la actividad de proteasas presentes en el sustrato y que se origina a partir de las materias primas de la dieta o del animal. Durante la incubación de la digesta del cultivo y de la molleja, la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 aumentó adicionalmente el nivel de aminas primarias en comparación con la muestra preliminar incubada durante 3 horas (cultivo) o 1 hora (molleja), lo que demuestra que la proteasa tenía una actividad proteolítica en este sustrato bajo las condiciones dadas. No fue posible distinguir entre la actividad de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* y la proteasa 10R bajo las condiciones del cultivo o del íleon, mientras que bajo las condiciones de la molleja la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 actuó significativamente mejor que la proteasa 10R. Ambas proteasas aumentaron numéricamente el nivel de aminas primarias bajo las condiciones del íleon. Estos datos indican que la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 tiene el potencial de degradar la proteína del pienso a lo largo del tracto gastrointestinal entero de aves de corral y porcinos, pero en particular en el tracto gastrointestinal superior, donde el pH tiende a ser ligeramente más ácido que en otras partes.

Tabla 9: Actividad proteolítica de la proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138 en comparación con la proteasa 10R cuando se incuba con digesta de pollos de engorde y se expresa como nivel de aminas primarias medido por el ensayo OPA (OD340 x factor de dilución)

Tratamiento	Cultivo (3 horas)	Molleja (1 hora)	Íleon (3 horas)
Forma preliminar (T_0)	$1,78 \pm 0,01^{d}$	$3,15 \pm 0,01^{d}$	$8,55 \pm 0,23^{b}$
Forma preliminar	$2,86 \pm 0,11^{c}$	$3,96 \pm 0,09b^{c}$	$13,94 \pm 0,23^{a}$
Proteasa 10R	$3,21 \pm 0,05^{ab}$	$3,99 \pm 0,06^{b}$	$14,32 \pm 0,18^{a}$
Proteasa S53 de *Bacillus sp.* 19138	$3,25 \pm 0,03^{ab}$	$4,30 \pm 0,02^{a}$	$14,13 \pm 0,23^{a}$
[a, b, c, d] Los valores en una columna que no están conectados por las mismas letras superíndices son estadísticamente diferentes como se determina mediante la prueba de Tukey Kramer (α = 0,05) proporcionadas por el procedimiento ANOVA (SAS Institute Inc.).			

Ejemplo 8: Termoestabilidad

[0356] Una parte alícuota de la muestra de proteína de proteasa (purificada como se describe en el ejemplo 2) o se desala o se cambia de tampón a 20 mM de Na-acetato, pH 4,0 utilizando una columna preempaquetada PD-10 o se dializa contra 2 x 500 ml de 20 mM de Na-acetato, pH 4,0 a 4 °C en un paso de 2-3 h seguido de un paso durante toda la noche. La muestra son 0,45 µm filtrados y diluidos con tampón a aprox. 2 unidades A280. El tampón de diálisis se usa como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras se desgasifican usando succión al vacío y agitando durante aprox. 10 minutos.

[0357] Un barrido de DSC se realiza en un MicroCal VP-DSC a una velocidad de barrido constante de 1,5 °C/min a partir de 20-90 °C. La manipulación de los datos se realiza utilizando el software MicroCal Origin (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización, T_d (también llamada temperatura de fusión, T_m) se define como la temperatura en el ápice del valor máximo del termograma.

Ejemplo 9: Estabilidad al vapor

[0358] La actividad residual de la proteasa después del tratamiento de vapor se puede evaluar utilizando el siguiente ensayo.

[0359] En estos experimentos se usa una configuración modificada en la que el vapor se proporciona a partir de un generador de vapor y se lleva a la caja. Las muestras colocadas en una placa se insertan en la caja a través de un cajón cuando la temperatura ha alcanzado aprox. 93-94 °C. Tras la inserción de las muestras, la temperatura baja 4 °C. La incubación se realiza durante 30 segundos mientras la temperatura permanece constante a aproximadamente 90 °C. Luego la placa se quita rápidamente de la caja, las muestras se colocan en hielo, se vuelven a suspender y se evalúan respecto a la actividad de proteasa utilizando el ensayo de suc-AAPF-pNA u oftaldialdehído (OPA). Cada muestra de enzima se compara con una muestra similar que haya sido tratada con vapor para calcular la actividad residual.

Ejemplo 10: Pruebas de estabilidad de granulación

[0360] La granulación enzimática se realiza de una manera como se describe en la patente de EE.UU. Nº 4.106.991, Ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido a un contenido de agua inferior a 1 % y se tamiza para obtener un producto con el rango de partículas de 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto se recubre con aceite de palma y carbonato cálcico de un modo como se describe en la patente de EE.UU. Nº 4.106.991, Ejemplo 22.

[0361] Aproximadamente 50 g de granulado enzimático se premezclan con 10 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal pequeño. Esta premezcla se mezcla con 90 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal más grande. Desde el mezclador, el pienso se lleva al acondicionador (un mezclador de cascada con inyección de vapor) a razón de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calienta el pienso a 95 °C (medido en la salida) inyectando vapor. El periodo de permanencia en el acondicionador es de 30 segundos. Desde el acondicionador, el pienso se lleva a una prensa Simon Heesen equipada con cuña horizontal de 3,0x35 mm y se comprime en gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm. Después del prensado, los gránulos se colocan en un refrigerador de aire y se enfrían durante 15 minutos.

[0362] La actividad de proteasa se mide utilizando el ensayo suc-AAPF-pNA antes de la granulación y en los gránulos de pienso después de la granulación. La estabilidad de granulación se determina comparando la actividad de proteasa en el pienso granulado con relación a la actividad en el pienso no granulado.

[0363] La invención descrita y reivindicada aquí no se debe limitar en su alcance por los aspectos específicos aquí descritos, ya que estos aspectos se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí se harán aparentes a los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente. En el caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción con definiciones incluidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0364]

```
<110>  Novozymes A/S

<120>  POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA

<130>  12308

<150>  EP 11195932.6
<151>  2011-12-28

<160>  10

<170>  Versión de PatentIn 3.5
```

<210> 1
<211> 1920
<212> ADN
<213> Bacillus sp. 19138

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1917)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(84)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (613)..(1917)

<400> 1

atg aaa aaa tta agt aaa aaa ttg ctt gcc gta gct gcg gca ggt
45
Met Lys Lys Leu Ser Lys Lys Leu Leu Ala Val Ala Ala Ala Gly
-200 -195 -190

acg ctg ttg ctt gca acc gtg cca agc att gcc ttt gca gac act
90
Thr Leu Leu Leu Ala Thr Val Pro Ser Ile Ala Phe Ala Asp Thr
-185 -180 -175

gcg caa gaa atc ccc caa ggc gta ggt tcc ggt gtg ctg tcc aac
135
Ala Gln Glu Ile Pro Gln Gly Val Gly Ser Gly Val Leu Ser Asn
-170 -165 -160

gtc gac tat ttc ggt ggt ctc gat cca agc act gtg gta acg gtt
180
Val Asp Tyr Phe Gly Gly Leu Asp Pro Ser Thr Val Val Thr Val
-155 -150 -145

gat atc gtc atg aaa atc caa aac aaa tac gac ttg gcc aac tac
225
Asp Ile Val Met Lys Ile Gln Asn Lys Tyr Asp Leu Ala Asn Tyr
-140 -135 -130

atc aag gaa acg acc tct ccg ggt agc aac acc tac cat aaa tac
270
Ile Lys Glu Thr Thr Ser Pro Gly Ser Asn Thr Tyr His Lys Tyr
-125 -120 -115

ctg aca ccg acg caa ttc aaa gcc aaa tac gca cct tct cca gcg
315
Leu Thr Pro Thr Gln Phe Lys Ala Lys Tyr Ala Pro Ser Pro Ala
-110 -105 -100

agc gtc aat gcg att act cac tat ctc tcg tcc tat ggc atc acg tct
363

Ser Val Asn Ala Ile Thr His Tyr Leu Ser Ser Tyr Gly Ile Thr Ser
-95 -90 -85

tcc gtt tac ccg gac aac ctg atc atc aca gcg acc ggc acc gtc ggt
411
Ser Val Tyr Pro Asp Asn Leu Ile Ile Thr Ala Thr Gly Thr Val Gly
-80 -75 -70

caa ttc aac aac gcg ttc aac gtc acc att gaa cgt gcc caa tac aaa
459
Gln Phe Asn Asn Ala Phe Asn Val Thr Ile Glu Arg Ala Gln Tyr Lys
-65 -60 -55

ggc aag agc ttc cat gca tcc aaa acc aac cct aaa gca ccg gct gcc
507
Gly Lys Ser Phe His Ala Ser Lys Thr Asn Pro Lys Ala Pro Ala Ala
-50 -45 -40

atc gcc gac tcc atc ctg tgc att ttg ggc atc agc aac tac tcc aac
555
Ile Ala Asp Ser Ile Leu Cys Ile Leu Gly Ile Ser Asn Tyr Ser Asn
-35 -30 -25 -20

ttc act tcg cac att gcg aaa cag cag ccg ctc gac agc agc caa tcc
603
Phe Thr Ser His Ile Ala Lys Gln Gln Pro Leu Asp Ser Ser Gln Ser
-15 -10 -5

aca gcg aac gtc acg ccg aac ccg acc ggc cgc atg acc aac gac ttg
651
Thr Ala Asn Val Thr Pro Asn Pro Thr Gly Arg Met Thr Asn Asp Leu
-1 1 5 10

gtg tcc cgt tac aac gta caa ccc ttg tac acc aaa gga gcc aac ggt
699
Val Ser Arg Tyr Asn Val Gln Pro Leu Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly
15 20 25

tcc ggt caa acg atc ggc atc gtg acg ctg gct gat ttc aac ccg agt
747
Ser Gly Gln Thr Ile Gly Ile Val Thr Leu Ala Asp Phe Asn Pro Ser
30 35 40 45

gat gcc tac tcg tac tgg cag tac aac aac atc aac gtc aac ccg aac
795
Asp Ala Tyr Ser Tyr Trp Gln Tyr Asn Asn Ile Asn Val Asn Pro Asn
50 55 60

cgc atc acc aaa atc aac gtg gac ggt ggt tcc ggc ctg agt gaa gat
843
Arg Ile Thr Lys Ile Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Leu Ser Glu Asp
65 70 75

gcc ggt tca gac gaa aca tcg ctc gac gtg gaa caa tcc gga gct ctg
891
Ala Gly Ser Asp Glu Thr Ser Leu Asp Val Glu Gln Ser Gly Ala Leu
80 85 90

gca ccg ggc gca aac ctc aat gtc tat gtc ggc ccg aac acc gat aca
939
Ala Pro Gly Ala Asn Leu Asn Val Tyr Val Gly Pro Asn Thr Asp Thr
95 100 105

ggg ttt gtg gat gcg tac gca aaa gcg atc aac gac aac gtc gca cac
987
Gly Phe Val Asp Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Asp Asn Val Ala His
110 115 120 125

cag atc tcc gca agc tgg ggc gaa tcc gaa tcg ctg att aat tac tac
1035
Gln Ile Ser Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Ser Leu Ile Asn Tyr Tyr
130 135 140

gtc caa cag caa atg gaa aca cct gag tat gcg gaa aca ttc aac caa
1083
Val Gln Gln Gln Met Glu Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Thr Phe Asn Gln
145 150 155

ctc ttc atg caa gca gcg gca cag gga act tcg atg ttc gcg tcg gct
1131
Leu Phe Met Gln Ala Ala Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Ala Ser Ala
160 165 170

ggt gac tcc ggt gcc tat gat gct tcc ggt gac ctc aac acg tac gat
1179
Gly Asp Ser Gly Ala Tyr Asp Ala Ser Gly Asp Leu Asn Thr Tyr Asp
175 180 185

ctc tcc gtc gac aat ccg gct gac agc ccg tac atc acg gcg gcc ggc
1227
Leu Ser Val Asp Asn Pro Ala Asp Ser Pro Tyr Ile Thr Ala Ala Gly
190 195 200 205

ggc acc acc gtg ccg ttt acc tat acg tcg acg caa tac aac ctg tcg
1275
Gly Thr Thr Val Pro Phe Thr Tyr Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Leu Ser
210 215 220

att acc gta ccg caa gaa cgc gca tgg ggc tgg gat tat ctc tac ccg
1323
Ile Thr Val Pro Gln Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr Leu Tyr Pro
225 230 235

ctg ttt gac gca cgc ggc ttg aac aac ccg acc ggc tgg gca caa cgt
1371
Leu Phe Asp Ala Arg Gly Leu Asn Asn Pro Thr Gly Trp Ala Gln Arg
240 245 250

tac ttt gtc ggc ggc ggc ggc ggt ttc agc caa ctc ttc gca aca cct
1419
Tyr Phe Val Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Gln Leu Phe Ala Thr Pro
255 260 265

gac tac caa acc ggc gta tcc ggc gtg aac agc tac acc gct gtc cac
1467
Asp Tyr Gln Thr Gly Val Ser Gly Val Asn Ser Tyr Thr Ala Val His
270 275 280 285

caa tgg act ccg agt tcc gac ttc acc tcg gtc act cgt gac gca caa
1515
Gln Trp Thr Pro Ser Ser Asp Phe Thr Ser Val Thr Arg Asp Ala Gln
290 295 300

ccg acc atc gtc acc ggc aca ggc acc ggc cgt aac ctg cct gac ctg
1563
Pro Thr Ile Val Thr Gly Thr Gly Thr Gly Arg Asn Leu Pro Asp Leu
305 310 315

tcg atg aac gcc gac ccg tac acc ggc tac tcc gtg tac ttc aac ttg
1611
Ser Met Asn Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr Ser Val Tyr Phe Asn Leu
320 325 330

ccg acc acg aac ggt gcg acg aca gta gac tcc ggc tgg gca acg tac
1659
Pro Thr Thr Asn Gly Ala Thr Thr Val Asp Ser Gly Trp Ala Thr Tyr
335 340 345

ggc ggt act tcc ttt gta gca ccg caa ttg gca ggt ctc agc gcg ttg
1707
Gly Gly Thr Ser Phe Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Ser Ala Leu
350 355 360 365

atc aac agt gca aac ggc agc gaa gca ggc ttc tgg aac cct cag ctc
1755
Ile Asn Ser Ala Asn Gly Ser Glu Ala Gly Phe Trp Asn Pro Gln Leu
370 375 380

tac cgt ttt gca caa agc aat cac tcg ccg ttg cac ccg ctc aac acc
1803
Tyr Arg Phe Ala Gln Ser Asn His Ser Pro Leu His Pro Leu Asn Thr
385 390 395

gca ggc gca tcc aac gac aac gtc ttc tat tcc ggc act ccg ggc gcc
1851
Ala Gly Ala Ser Asn Asp Asn Val Phe Tyr Ser Gly Thr Pro Gly Ala
400 405 410

atc tac aac caa gca acc ggt ctt ggc acg ccc gac gtg acg gca ctt
1899
Ile Tyr Asn Gln Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Val Thr Ala Leu
415 420 425

gca caa gcg ttt ggc aaa taa
1920
Ala Gln Ala Phe Gly Lys
430 435

<210> 2

<211> 639
<212> PRT
<213> Bacillus sp. 19138

<400> 2

Met Lys Lys Leu Ser Lys Lys Leu Leu Ala Val Ala Ala Ala Gly
-200 -195 -190

Thr Leu Leu Leu Ala Thr Val Pro Ser Ile Ala Phe Ala Asp Thr
-185 -180 -175

Ala Gln Glu Ile Pro Gln Gly Val Gly Ser Gly Val Leu Ser Asn
-170 -165 -160

Val Asp Tyr Phe Gly Gly Leu Asp Pro Ser Thr Val Val Thr Val
-155 -150 -145

Asp Ile Val Met Lys Ile Gln Asn Lys Tyr Asp Leu Ala Asn Tyr
-140 -135 -130

Ile Lys Glu Thr Thr Ser Pro Gly Ser Asn Thr Tyr His Lys Tyr
-125 -120 -115

Leu Thr Pro Thr Gln Phe Lys Ala Lys Tyr Ala Pro Ser Pro Ala
-110 -105 -100

Ser Val Asn Ala Ile Thr His Tyr Leu Ser Ser Tyr Gly Ile Thr Ser
-95 -90 -85

Ser Val Tyr Pro Asp Asn Leu Ile Ile Thr Ala Thr Gly Thr Val Gly
-80 -75 -70

Gln Phe Asn Asn Ala Phe Asn Val Thr Ile Glu Arg Ala Gln Tyr Lys
-65 -60 -55

Gly Lys Ser Phe His Ala Ser Lys Thr Asn Pro Lys Ala Pro Ala Ala
-50 -45 -40

Ile Ala Asp Ser Ile Leu Cys Ile Leu Gly Ile Ser Asn Tyr Ser Asn
-35 -30 -25 -20

Phe Thr Ser His Ile Ala Lys Gln Gln Pro Leu Asp Ser Ser Gln Ser
-15 -10 -5

Thr Ala Asn Val Thr Pro Asn Pro Thr Gly Arg Met Thr Asn Asp Leu
-1 1 5 10

Val Ser Arg Tyr Asn Val Gln Pro Leu Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly
15 20 25

Ser Gly Gln Thr Ile Gly Ile Val Thr Leu Ala Asp Phe Asn Pro Ser
30 35 40 45

Asp Ala Tyr Ser Tyr Trp Gln Tyr Asn Asn Ile Asn Val Asn Pro Asn
50 55 60

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

Ala Gly Ser Asp Glu Thr Ser Leu Asp Val Glu Gln Ser Gly Ala Leu
80 85 90

Ala Pro Gly Ala Asn Leu Asn Val Tyr Val Gly Pro Asn Thr Asp Thr
95 100 105

Gly Phe Val Asp Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Asp Asn Val Ala His
110 115 120 125

Gln Ile Ser Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Ser Leu Ile Asn Tyr Tyr
130 135 140

Val Gln Gln Gln Met Glu Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Thr Phe Asn Gln
145 150 155

Leu Phe Met Gln Ala Ala Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Ala Ser Ala
160 165 170

Gly Asp Ser Gly Ala Tyr Asp Ala Ser Gly Asp Leu Asn Thr Tyr Asp
175 180 185

Leu Ser Val Asp Asn Pro Ala Asp Ser Pro Tyr Ile Thr Ala Ala Gly
190 195 200 205

Gly Thr Thr Val Pro Phe Thr Tyr Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Leu Ser
210 215 220

Ile Thr Val Pro Gln Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr Leu Tyr Pro
225 230 235

Leu Phe Asp Ala Arg Gly Leu Asn Asn Pro Thr Gly Trp Ala Gln Arg
240 245 250

Tyr Phe Val Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Gln Leu Phe Ala Thr Pro
255 260 265

Asp Tyr Gln Thr Gly Val Ser Gly Val Asn Ser Tyr Thr Ala Val His
270 275 280 285

Gln Trp Thr Pro Ser Ser Asp Phe Thr Ser Val Thr Arg Asp Ala Gln
290 295 300

Pro Thr Ile Val Thr Gly Thr Gly Thr Gly Arg Asn Leu Pro Asp Leu
305 310 315

Ser Met Asn Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr Ser Val Tyr Phe Asn Leu
320 325 330

Pro Thr Thr Asn Gly Ala Thr Thr Val Asp Ser Gly Trp Ala Thr Tyr
335 340 345

Gly Gly Thr Ser Phe Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Ser Ala Leu
350 355 360 365

Ile Asn Ser Ala Asn Gly Ser Glu Ala Gly Phe Trp Asn Pro Gln Leu
370 375 380

Tyr Arg Phe Ala Gln Ser Asn His Ser Pro Leu His Pro Leu Asn Thr
385 390 395

Ala Gly Ala Ser Asn Asp Asn Val Phe Tyr Ser Gly Thr Pro Gly Ala
400 405 410

Ile Tyr Asn Gln Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Val Thr Ala Leu
415 420 425

Ala Gln Ala Phe Gly Lys
430 435

<210> 3

<211> 1935
<212> ADN
<213> sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1935)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(81)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (610)..(1929)

<400> 3

atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc
45
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
-200 -195 -190

att tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gac act gcg
90
Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Asp Thr Ala
-185 -180 -175

caa gaa atc ccc caa ggc gta ggt tcc ggt gtg ctg tcc aac gtc
135
Gln Glu Ile Pro Gln Gly Val Gly Ser Gly Val Leu Ser Asn Val
-170 -165 -160

gac tat ttc ggt ggt ctc gat cca agc act gtg gta acg gtt gat
180
Asp Tyr Phe Gly Gly Leu Asp Pro Ser Thr Val Val Thr Val Asp
-155 -150 -145

atc gtc atg aaa atc caa aac aaa tac gac ttg gcc aac tac atc
225
Ile Val Met Lys Ile Gln Asn Lys Tyr Asp Leu Ala Asn Tyr Ile
-140 -135 -130

aag gaa acg acc tct ccg ggt agc aac acc tac cat aaa tac ctg
270
Lys Glu Thr Thr Ser Pro Gly Ser Asn Thr Tyr His Lys Tyr Leu
-125 -120 -115

aca ccg acg caa ttc aaa gcc aaa tac gca cct tct cca gcg agc
315
Thr Pro Thr Gln Phe Lys Ala Lys Tyr Ala Pro Ser Pro Ala Ser
-110 -105 -100

gtc aat gcg att act cac tat ctc tcg tcc tat ggc atc acg tct tcc
363
Val Asn Ala Ile Thr His Tyr Leu Ser Ser Tyr Gly Ile Thr Ser Ser

```
                -95                 -90                 -85

gtt tac ccg gac aac ctg atc atc aca gcg acc ggc acc gtc ggt caa
411
Val Tyr Pro Asp Asn Leu Ile Ile Thr Ala Thr Gly Thr Val Gly Gln
        -80                 -75                 -70

ttc aac aac gcg ttc aac gtc acc att gaa cgt gcc caa tac aaa ggc
459
Phe Asn Asn Ala Phe Asn Val Thr Ile Glu Arg Ala Gln Tyr Lys Gly
    -65                 -60                 -55

aag agc ttc cat gca tcc aaa acc aac cct aaa gca ccg gct gcc atc
507
Lys Ser Phe His Ala Ser Lys Thr Asn Pro Lys Ala Pro Ala Ala Ile
-50                 -45                 -40                 -35

gcc gac tcc atc ctg tgc att ttg ggc atc agc aac tac tcc aac ttc
555
Ala Asp Ser Ile Leu Cys Ile Leu Gly Ile Ser Asn Tyr Ser Asn Phe
                -30                 -25                 -20

act tcg cac att gcg aaa cag cag ccg ctc gac agc agc caa tcc aca
603
Thr Ser His Ile Ala Lys Gln Gln Pro Leu Asp Ser Ser Gln Ser Thr
            -15                 -10                 -5

gcg aac gtc acg ccg aac ccg acc ggc cgc atg acc aac gac ttg gtg
651
Ala Asn Val Thr Pro Asn Pro Thr Gly Arg Met Thr Asn Asp Leu Val
    -1  1               5                   10

tcc cgt tac aac gta caa ccc ttg tac acc aaa gga gcc aac ggt tcc
699
Ser Arg Tyr Asn Val Gln Pro Leu Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly Ser
15                  20                  25                  30

ggt caa acg atc ggc atc gtg acg ctg gct gat ttc aac ccg agt gat
747
Gly Gln Thr Ile Gly Ile Val Thr Leu Ala Asp Phe Asn Pro Ser Asp
                35                  40                  45

gcc tac tcg tac tgg cag tac aac aac atc aac gtc aac ccg aac cgc
795
Ala Tyr Ser Tyr Trp Gln Tyr Asn Asn Ile Asn Val Asn Pro Asn Arg
            50                  55                  60

atc acc aaa atc aac gtg gac ggt ggt tcc ggc ctg agt gaa gat gcc
843
Ile Thr Lys Ile Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Leu Ser Glu Asp Ala
        65                  70                  75

ggt tca gac gaa aca tcg ctc gac gtg gaa caa tcc gga gct ctg gca
891
Gly Ser Asp Glu Thr Ser Leu Asp Val Glu Gln Ser Gly Ala Leu Ala
    80                  85                  90
```

ccg ggc gca aac ctc aat gtc tat gtc ggc ccg aac acc gat aca ggg
939
Pro Gly Ala Asn Leu Asn Val Tyr Val Gly Pro Asn Thr Asp Thr Gly
95 100 105 110

ttt gtg gat gcg tac gca aaa gcg atc aac gac aac gtc gca cac cag
987
Phe Val Asp Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Asp Asn Val Ala His Gln
115 120 125

atc tcc gca agc tgg ggc gaa tcc gaa tcg ctg att aat tac tac gtc
1035
Ile Ser Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Ser Leu Ile Asn Tyr Tyr Val
130 135 140

caa cag caa atg gaa aca cct gag tat gcg gaa aca ttc aac caa ctc
1083
Gln Gln Gln Met Glu Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Thr Phe Asn Gln Leu
145 150 155

ttc atg caa gca gcg gca cag gga act tcg atg ttc gcg tcg gct ggt
1131
Phe Met Gln Ala Ala Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Ala Ser Ala Gly
160 165 170

gac tcc ggt gcc tat gat gct tcc ggt gac ctc aac acg tac gat ctc
1179
Asp Ser Gly Ala Tyr Asp Ala Ser Gly Asp Leu Asn Thr Tyr Asp Leu
175 180 185 190

tcc gtc gac aat ccg gct gac agc ccg tac atc acg gcg gcc ggc ggc
1227
Ser Val Asp Asn Pro Ala Asp Ser Pro Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Gly
195 200 205

acc acc gtg ccg ttt acc tat acg tcg acg caa tac aac ctg tcg att
1275
Thr Thr Val Pro Phe Thr Tyr Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Leu Ser Ile
210 215 220

acc gta ccg caa gaa cgc gca tgg ggc tgg gat tat ctc tac ccg ctg
1323
Thr Val Pro Gln Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr Leu Tyr Pro Leu
225 230 235

ttt gac gca cgc ggc ttg aac aac ccg acc ggc tgg gca caa cgt tac
1371
Phe Asp Ala Arg Gly Leu Asn Asn Pro Thr Gly Trp Ala Gln Arg Tyr
240 245 250

ttt gtc ggc ggc ggc ggc ggt ttc agc caa ctc ttc gca aca cct gac
1419
Phe Val Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Gln Leu Phe Ala Thr Pro Asp
255 260 265 270

tac caa acc ggc gta tcc ggc gtg aac agc tac acc gct gtc cac caa
1467

Tyr Gln Thr Gly Val Ser Gly Val Asn Ser Tyr Thr Ala Val His Gln
275 280 285

tgg act ccg agt tcc gac ttc acc tcg gtc act cgt gac gca caa ccg
1515
Trp Thr Pro Ser Ser Asp Phe Thr Ser Val Thr Arg Asp Ala Gln Pro
290 295 300

acc atc gtc acc ggc aca ggc acc ggc cgt aac ctg cct gac ctg tcg
1563
Thr Ile Val Thr Gly Thr Gly Thr Gly Arg Asn Leu Pro Asp Leu Ser
305 310 315

atg aac gcc gac ccg tac acc ggc tac tcc gtg tac ttc aac ttg ccg
1611
Met Asn Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr Ser Val Tyr Phe Asn Leu Pro
320 325 330

acc acg aac ggt gcg acg aca gta gac tcc ggc tgg gca acg tac ggc
1659
Thr Thr Asn Gly Ala Thr Thr Val Asp Ser Gly Trp Ala Thr Tyr Gly
335 340 345 350

ggt act tcc ttt gta gca ccg caa ttg gca ggt ctc agc gcg ttg atc
1707
Gly Thr Ser Phe Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Ser Ala Leu Ile
355 360 365

aac agt gca aac ggc agc gaa gca ggc ttc tgg aac cct cag ctc tac
1755
Asn Ser Ala Asn Gly Ser Glu Ala Gly Phe Trp Asn Pro Gln Leu Tyr
370 375 380

cgt ttt gca caa agc aat cac tcg ccg ttg cac ccg ctc aac acc gca
1803
Arg Phe Ala Gln Ser Asn His Ser Pro Leu His Pro Leu Asn Thr Ala
385 390 395

ggc gca tcc aac gac aac gtc ttc tat tcc ggc act ccg ggc gcc atc
1851
Gly Ala Ser Asn Asp Asn Val Phe Tyr Ser Gly Thr Pro Gly Ala Ile
400 405 410

tac aac caa gca acc ggt ctt ggc acg ccc gac gtg acg gca ctt gca
1899
Tyr Asn Gln Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Val Thr Ala Leu Ala
415 420 425 430

caa gcg ttt ggc aaa cat cag cac caa cac cag cat
1935
Gln Ala Phe Gly Lys His Gln His Gln His Gln His
435 440

<210> 4
<211> 645
<212> PRT

<213> sintética

<400> 4

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
-200 -195 -190

Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Asp Thr Ala
-185 -180 -175

Gln Glu Ile Pro Gln Gly Val Gly Ser Gly Val Leu Ser Asn Val
-170 -165 -160

Asp Tyr Phe Gly Gly Leu Asp Pro Ser Thr Val Val Thr Val Asp
-155 -150 -145

Ile Val Met Lys Ile Gln Asn Lys Tyr Asp Leu Ala Asn Tyr Ile
-140 -135 -130

Lys Glu Thr Thr Ser Pro Gly Ser Asn Thr Tyr His Lys Tyr Leu
-125 -120 -115

Thr Pro Thr Gln Phe Lys Ala Lys Tyr Ala Pro Ser Pro Ala Ser
-110 -105 -100

Val Asn Ala Ile Thr His Tyr Leu Ser Ser Tyr Gly Ile Thr Ser Ser
-95 -90 -85

Val Tyr Pro Asp Asn Leu Ile Ile Thr Ala Thr Gly Thr Val Gly Gln
-80 -75 -70

Phe Asn Asn Ala Phe Asn Val Thr Ile Glu Arg Ala Gln Tyr Lys Gly
-65 -60 -55

Lys Ser Phe His Ala Ser Lys Thr Asn Pro Lys Ala Pro Ala Ala Ile
-50 -45 -40 -35

Ala Asp Ser Ile Leu Cys Ile Leu Gly Ile Ser Asn Tyr Ser Asn Phe
-30 -25 -20

Thr Ser His Ile Ala Lys Gln Gln Pro Leu Asp Ser Ser Gln Ser Thr
-15 -10 -5

Ala Asn Val Thr Pro Asn Pro Thr Gly Arg Met Thr Asn Asp Leu Val

-1 1 5 10

Ser Arg Tyr Asn Val Gln Pro Leu Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly Ser
15 20 25 30

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

Ala Tyr Ser Tyr Trp Gln Tyr Asn Asn Ile Asn Val Asn Pro Asn Arg
50 55 60

Ile Thr Lys Ile Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Leu Ser Glu Asp Ala
65 70 75

Gly Ser Asp Glu Thr Ser Leu Asp Val Glu Gln Ser Gly Ala Leu Ala
80 85 90

Pro Gly Ala Asn Leu Asn Val Tyr Val Gly Pro Asn Thr Asp Thr Gly
95 100 105 110

Phe Val Asp Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Asp Asn Val Ala His Gln
115 120 125

Ile Ser Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Ser Leu Ile Asn Tyr Tyr Val
130 135 140

Gln Gln Gln Met Glu Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Thr Phe Asn Gln Leu
145 150 155

Phe Met Gln Ala Ala Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Ala Ser Ala Gly
160 165 170

Asp Ser Gly Ala Tyr Asp Ala Ser Gly Asp Leu Asn Thr Tyr Asp Leu
175 180 185 190

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

Thr Thr Val Pro Phe Thr Tyr Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Leu Ser Ile
210 215 220

Thr Val Pro Gln Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr Leu Tyr Pro Leu
225 230 235

Phe Asp Ala Arg Gly Leu Asn Asn Pro Thr Gly Trp Ala Gln Arg Tyr
240 245 250

Phe Val Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Gln Leu Phe Ala Thr Pro Asp
255 260 265 270

Tyr Gln Thr Gly Val Ser Gly Val Asn Ser Tyr Thr Ala Val His Gln
275 280 285

Trp Thr Pro Ser Ser Asp Phe Thr Ser Val Thr Arg Asp Ala Gln Pro
290 295 300

Thr Ile Val Thr Gly Thr Gly Thr Gly Arg Asn Leu Pro Asp Leu Ser
305 310 315

Met Asn Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr Ser Val Tyr Phe Asn Leu Pro
320 325 330

Thr Thr Asn Gly Ala Thr Thr Val Asp Ser Gly Trp Ala Thr Tyr Gly
335 340 345 350

Gly Thr Ser Phe Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Ser Ala Leu Ile
355 360 365

Asn Ser Ala Asn Gly Ser Glu Ala Gly Phe Trp Asn Pro Gln Leu Tyr
370 375 380

Arg Phe Ala Gln Ser Asn His Ser Pro Leu His Pro Leu Asn Thr Ala
385 390 395

Gly Ala Ser Asn Asp Asn Val Phe Tyr Ser Gly Thr Pro Gly Ala Ile
400 405 410

Tyr Asn Gln Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Val Thr Ala Leu Ala
415 420 425 430

Gln Ala Phe Gly Lys His Gln His Gln His Gln His
435 440

<210> 5
<211> 435
<212> PRT

<213> polipéptido de Bacillus sp 19138 maduro

<400> 5

Val Thr Pro Asn Pro Thr Gly Arg Met Thr Asn Asp Leu Val Ser Arg
1 5 10 15

Tyr Asn Val Gln Pro Leu Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly Ser Gly Gln
20 25 30

Thr Ile Gly Ile Val Thr Leu Ala Asp Phe Asn Pro Ser Asp Ala Tyr
35 40 45

Ser Tyr Trp Gln Tyr Asn Asn Ile Asn Val Asn Pro Asn Arg Ile Thr
50 55 60

Lys Ile Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Leu Ser Glu Asp Ala Gly Ser
65 70 75 80

Asp Glu Thr Ser Leu Asp Val Glu Gln Ser Gly Ala Leu Ala Pro Gly
85 90 95

Ala Asn Leu Asn Val Tyr Val Gly Pro Asn Thr Asp Thr Gly Phe Val
100 105 110

Asp Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Asp Asn Val Ala His Gln Ile Ser
115 120 125

Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Ser Leu Ile Asn Tyr Tyr Val Gln Gln
130 135 140

Gln Met Glu Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Thr Phe Asn Gln Leu Phe Met
145 150 155 160

Gln Ala Ala Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Ala Ser Ala Gly Asp Ser
165 170 175

Gly Ala Tyr Asp Ala Ser Gly Asp Leu Asn Thr Tyr Asp Leu Ser Val
180 185 190

Asp Asn Pro Ala Asp Ser Pro Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Thr
195 200 205

Val Pro Phe Thr Tyr Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Leu Ser Ile Thr Val

210 215 220

Pro Gln Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr Leu Tyr Pro Leu Phe Asp
225 230 235 240

Ala Arg Gly Leu Asn Asn Pro Thr Gly Trp Ala Gln Arg Tyr Phe Val
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Gln Leu Phe Ala Thr Pro Asp Tyr Gln
260 265 270

Thr Gly Val Ser Gly Val Asn Ser Tyr Thr Ala Val His Gln Trp Thr
275 280 285

Pro Ser Ser Asp Phe Thr Ser Val Thr Arg Asp Ala Gln Pro Thr Ile
290 295 300

Val Thr Gly Thr Gly Thr Gly Arg Asn Leu Pro Asp Leu Ser Met Asn
305 310 315 320

Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr Ser Val Tyr Phe Asn Leu Pro Thr Thr
325 330 335

Asn Gly Ala Thr Thr Val Asp Ser Gly Trp Ala Thr Tyr Gly Gly Thr
340 345 350

Ser Phe Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Ser Ala Leu Ile Asn Ser
355 360 365

Ala Asn Gly Ser Glu Ala Gly Phe Trp Asn Pro Gln Leu Tyr Arg Phe
370 375 380

Ala Gln Ser Asn His Ser Pro Leu His Pro Leu Asn Thr Ala Gly Ala
385 390 395 400

Ser Asn Asp Asn Val Phe Tyr Ser Gly Thr Pro Gly Ala Ile Tyr Asn
405 410 415

Gln Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Val Thr Ala Leu Ala Gln Ala
420 425 430

Phe Gly Lys
435

<210> 6
<211> 440
<212> PRT
<213> proteasa sintética madura

<400> 6

Val Thr Pro Asn Pro Thr Gly Arg Met Thr Asn Asp Leu Val Ser Arg
1 5 10 15

Tyr Asn Val Gln Pro Leu Tyr Thr Lys Gly Ala Asn Gly Ser Gly Gln
20 25 30

Thr Ile Gly Ile Val Thr Leu Ala Asp Phe Asn Pro Ser Asp Ala Tyr
35 40 45

Ser Tyr Trp Gln Tyr Asn Asn Ile Asn Val Asn Pro Asn Arg Ile Thr
50 55 60

Lys Ile Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Leu Ser Glu Asp Ala Gly Ser
65 70 75 80

Asp Glu Thr Ser Leu Asp Val Glu Gln Ser Gly Ala Leu Ala Pro Gly
85 90 95

Ala Asn Leu Asn Val Tyr Val Gly Pro Asn Thr Asp Thr Gly Phe Val
100 105 110

Asp Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Asn Asp Asn Val Ala His Gln Ile Ser
115 120 125

Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Ser Leu Ile Asn Tyr Tyr Val Gln Gln
130 135 140

Gln Met Glu Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Thr Phe Asn Gln Leu Phe Met
145 150 155 160

Gln Ala Ala Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Ala Ser Ala Gly Asp Ser
165 170 175

Gly Ala Tyr Asp Ala Ser Gly Asp Leu Asn Thr Tyr Asp Leu Ser Val
180 185 190

Asp Asn Pro Ala Asp Ser Pro Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Thr
195 200 205

Val Pro Phe Thr Tyr Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Leu Ser Ile Thr Val
210 215 220

Pro Gln Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr Leu Tyr Pro Leu Phe Asp
225 230 235 240

Ala Arg Gly Leu Asn Asn Pro Thr Gly Trp Ala Gln Arg Tyr Phe Val
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Gln Leu Phe Ala Thr Pro Asp Tyr Gln
260 265 270

Thr Gly Val Ser Gly Val Asn Ser Tyr Thr Ala Val His Gln Trp Thr
275 280 285

Pro Ser Ser Asp Phe Thr Ser Val Thr Arg Asp Ala Gln Pro Thr Ile
290 295 300

Val Thr Gly Thr Gly Thr Gly Arg Asn Leu Pro Asp Leu Ser Met Asn
305 310 315 320

Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr Ser Val Tyr Phe Asn Leu Pro Thr Thr
325 330 335

Asn Gly Ala Thr Thr Val Asp Ser Gly Trp Ala Thr Tyr Gly Gly Thr
340 345 350

Ser Phe Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Ser Ala Leu Ile Asn Ser
355 360 365

Ala Asn Gly Ser Glu Ala Gly Phe Trp Asn Pro Gln Leu Tyr Arg Phe
370 375 380

Ala Gln Ser Asn His Ser Pro Leu His Pro Leu Asn Thr Ala Gly Ala
385 390 395 400

Ser Asn Asp Asn Val Phe Tyr Ser Gly Thr Pro Gly Ala Ile Tyr Asn
405 410 415

Gln Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Val Thr Ala Leu Ala Gln Ala

420 425 430

Phe Gly Lys His Gln His Gln His
435 440

<210> 7
<211> 1596
<212> ADN
<213> ADN de Nocardiopsis sp.

<220>
<221> CDS
<222> (318)..(1463)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (318)..(404)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (900)..(1463)

<400> 7

acgtttggta cgggtaccgg tgtccgcatg tggccagaat gccccttgc gacagggaac
60

ggattcggtc ggtagcgcat cgactccgac aaccgcgagg tggccgttcg cgtcgccacg
120

ttctgcgacc gtcatgcgac ccatcatcgg gtgaccccac cgagctctga atggtccacc
180

gttctgacgg tctttccctc accaaaacgt gcacctatgg ttaggacgtt gtttaccgaa
240

tgtctcggtg aacgacaggg gccggacggt attcggcccc gatcccccgt tgatcccccc
300

aggagagtag ggacccc atg cga ccc tcc ccc gtt gtc tcc gcc atc ggt
350
Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly
-190 -185

acg gga gcg ctg gcc ttc ggt ctg gcg ctg tcc ggt acc ccg ggt
395
Thr Gly Ala Leu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly
-180 -175 -170

gcc ctc gcg gcc acc gga gcg ctc ccc cag tca ccc acc ccg gag
440
Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu
-165 -160 -155

```
gcc gac gcg gtc  tcc atg cag gag gcg  ctc cag cgc gac ctc  gac
485
Ala Asp Ala Val  Ser Met Gln Glu Ala  Leu Gln Arg Asp Leu  Asp
            -150                 -145                 -140

ctg acc tcc gcc  gag gcc gag gag ctg  ctg gcc gcc cag gac  acc
530
Leu Thr Ser Ala  Glu Ala Glu Glu Leu  Leu Ala Ala Gln Asp  Thr
            -135                 -130                 -125

gcc ttc gag gtc  gac gag gcc gcg gcc  gag gcc gcc ggg gac  gcc
575
Ala Phe Glu Val  Asp Glu Ala Ala Ala  Glu Ala Ala Gly Asp  Ala
            -120                 -115                 -110

tac ggc ggc tcc  gtc ttc gac acc gag  agc ctg gaa ctg acc gtc ctg
623
Tyr Gly Gly Ser  Val Phe Asp Thr Glu  Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu
            -105                 -100                 -95

gtc acc gat gcc gcc gcg gtc gag gcc gtg gag gcc acc ggc gcc ggg
671
Val Thr Asp Ala Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly
        -90                 -85                 -80

acc gag ctg gtc tcc tac ggc atc gac ggt ctc gac gag atc gtc cag
719
Thr Glu Leu Val Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln
    -75                 -70                 -65

gag ctc aac gcc gcc gac gcc gtt ccc ggt gtg gtc ggc tgg tac ccg
767
Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro
-60                 -55                 -50                 -45

gac gtg gcg ggt gac acc gtc gtc ctg gag gtc ctg gag ggt tcc gga
815
Asp Val Ala Gly Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly
                -40                 -35                 -30

gcc gac gtc agc ggc ctg ctc gcg gac gcc ggc gtg gac gcc tcg gcc
863
Ala Asp Val Ser Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala
            -25                 -20                 -15

gtc gag gtg acc acg agc gac cag ccc gag ctc tac gcc gac atc atc
911
Val Glu Val Thr Thr Ser Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile
        -10                 -5              -1  1

ggt ggt ctg gcc tac acc atg ggc ggc cgc tgt tcg gtc ggc ttc gcg
959
Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala
5                   10                  15                  20

gcc acc aac gcc gcc ggt cag ccc ggg ttc gtc acc gcc ggt cac tgc
1007
```

```
Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys
                25                  30                  35

ggc cgc gtg ggc acc cag gtg acc atc ggc aac ggc agg ggc gtc ttc
1055
Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe
            40                  45                  50

gag cag tcc gtc ttc ccc ggc aac gac gcg gcc ttc gtc cgc ggt acg
1103
Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr
        55                  60                  65

tcc aac ttc acg ctg acc aac ctg gtc agc cgc tac aac acc ggc ggg
1151
Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly
    70                  75                  80

tac gcc acg gtc gcc ggt cac aac cag gcc ccc atc ggc tcc tcc gtc
1199
Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val
85                  90                  95                  100

tgc cgc tcc ggc tcc acc acc ggt tgg cac tgc ggc acc atc cag gcc
1247
Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala
                105                 110                 115

cgc ggc cag tcg gtg agc tac ccc gag ggc acc gtc acc aac atg acc
1295
Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr
            120                 125                 130

cgg acc acc gtg tgc gcc gag ccc ggc gac tcc ggc ggc tcc tac atc
1343
Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile
        135                 140                 145

tcc ggc acc cag gcc cag ggc gtg acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc
1391
Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys
    150                 155                 160

cgc acc ggc ggg acc acc ttc tac cag gag gtc acc ccc atg gtg aac
1439
Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn
165                 170                 175                 180

tcc tgg ggc gtc cgt ctc cgg acc tgatccccgc ggttccaggc ggaccgacgg
1493
Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
                185

tcgtgacctg agtaccaggc gtccccgccg cttccagcgg cgtccgcacc ggggtgggac
1553
```

cgggcgtggc cacggcccca cccgtgaccg gaccgcccgg cta
1596

<210> 8
<211> 382
<212> PRT
<213> ADN de Nocardiopsis sp.

<400> 8

Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu
-190 -185 -180

Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ala Ala
-175 -170 -165

Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu Ala Asp Ala Val
-160 -155 -150

Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser Ala
-145 -140 -135

Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu Val
-130 -125 -120

Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Ser
-115 -110 -105

Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ala
-100 -95 -90

Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Leu Val
-85 -80 -75

Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln Glu Leu Asn Ala
-70 -65 -60

Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala Gly
-55 -50 -45

Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp Val Ser
-40 -35 -30 -25

Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala Val Glu Val Thr
-20 -15 -10

Thr Ser Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala
-5 -1 1 5

Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala
10 15 20

Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly
25 30 35 40

Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val
45 50 55

Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr
60 65 70

Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val
75 80 85

Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly
90 95 100

Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser
105 110 115 120

Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val
125 130 135

Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln
140 145 150

Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly
155 160 165

Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val
170 175 180

Arg Leu Arg Thr
185

<210> 9
<211> 625
<212> PRT

<213> Clostridium-acetobutylicum

<400> 9

Met Asn Ser Tyr Val Lys Arg Met Leu Thr Ile Ser Thr Ala Val Phe
1 5 10 15

Ile Thr Met Gly Ser Phe Ala Ser Ile Val His Ala Glu Pro Gln Gly
20 25 30

Asp Val Gly Val Thr Glu Gly Val Gly Asp Thr Ile Ala Asn Lys Ala
35 40 45

Ser Phe Leu Gly Asp Leu Asp Pro Asn Thr Gln Val Thr Ile Asp Ile
50 55 60

Val Ile Lys Leu Gln Asn Lys Ser Glu Leu Gln Gln Tyr Ile Asn Asp
65 70 75 80

Thr Val Thr Pro Lys Ser Ser Asn Tyr Arg Arg Tyr Leu Ser Val Ala
85 90 95

Glu Phe Lys Lys Ser Phe Ala Pro Lys Ser Lys Gln Ile Asn Glu Leu
100 105 110

Thr Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Gly Ile Lys Ser Glu Val Tyr Gln Asp
115 120 125

Asn Leu Ile Val Thr Ala Thr Gly Thr Ala Asp Gln Ile Asn Lys Ala
130 135 140

Phe Asn Val Glu Leu Lys His Ala Ser Tyr Lys Gly Lys Asn Phe His
145 150 155 160

Ala Ser Lys Lys Gln Pro Lys Leu Pro Lys Lys Ile Ala Asp Asn Ile
165 170 175

Leu Cys Ile Leu Gly Leu Ser Ser Tyr Ser Ser Tyr Thr Thr Lys Thr
180 185 190

Val Lys Val Pro Asn Glu Phe Lys Pro Ser Asn Ser Asn Gly Pro Leu
195 200 205

Ser Leu Asn Pro Ser Asp Leu Ile Lys His Tyr Asn Val Gln Pro Leu

210 215 220

Tyr Lys Asn Gly Ala Ser Gly Lys Asn Glu Ser Ile Gly Ile Val Thr
225 230 235 240

Leu Ala Glu Phe Asn Pro Asn Asp Ala Tyr Ser Phe Trp Lys Gln Glu
245 250 255

Gly Ile Lys Thr Asp Lys Arg Arg Ile Lys Val Ile Asn Val Asp Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asn Asp Gly Ala Asp Glu Thr Thr Leu Asp Val Glu Gln
275 280 285

Ser Gly Ala Leu Ala Pro Lys Ala Glu Val Asn Val Tyr Val Ala Pro
290 295 300

Asn Thr Asp Pro Gly Phe Val Asp Ala Phe Ala Asn Val Ile Asn Glu
305 310 315 320

Asn Lys Cys His Gln Ile Ser Ala Ser Trp Gly Glu Ser Glu Asp Leu
325 330 335

Ile Ser Tyr Leu Val Ser Gln Gly Gln Glu Thr Lys Gly Tyr Ala Glu
340 345 350

Ala Phe Asn Gln Leu Phe Met Gln Ala Ala Ala Gln Gly Ile Ser Met
355 360 365

Phe Ala Ala Ala Gly Asp Ser Gly Ala Tyr Asp Ser Lys Glu Asn Thr
370 375 380

Pro Pro Ser Tyr Glu Leu Ser Val Asp Asn Pro Ala Asp Ser Pro Tyr
385 390 395 400

Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Thr Leu Ala Trp Gln Gly Thr Val Lys
405 410 415

Glu Thr Ser Val Lys Val Asp Lys Glu Arg Ala Trp Gly Trp Asp Tyr
420 425 430

Leu Tyr Pro Ala Phe Asp Ala Asp Gly Leu Tyr Ser Ser Gly Lys Leu
435 440 445

Asp Lys Tyr Phe Val Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Lys Ile Phe Asp
450 455 460

Thr Pro Asp Tyr Gln Lys Gly Ile Ser Gly Val Asn Arg Phe Thr Gly
465 470 475 480

Val Lys Gln Trp Thr Ala Ser Asn Pro Gln Gly Pro Leu Leu Leu Asn
485 490 495

Val Thr Arg Asp Ala Ala Gln Gln Ile Val Thr Gly Lys Asp Thr Gly
500 505 510

Arg Asn Val Pro Asp Ile Ser Met Asp Ala Asp Pro Tyr Thr Gly Tyr
515 520 525

Asn Val Tyr Met Asn Gly Glu Met Ser Ser Ile Gly Gly Thr Ser Ile
530 535 540

Val Ala Pro Gln Leu Ala Gly Leu Cys Ala Leu Ile Asn Asp Asn Asn
545 550 555 560

Asn Thr Gln Val Gly Phe Trp Asn Pro Gln Ile Tyr Lys Phe Ala Gln
565 570 575

Ser Ser Asn Ser Pro Leu Asn Pro Leu Asn Asp Thr Gly Ser Ser Asn
580 585 590

Asp Asn Ile Phe Tyr Thr Ala Thr Lys Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Ala
595 600 605

Thr Gly Leu Gly Ile Pro Asp Ile Ala Lys Leu Asn Ala Ser Phe Gly
610 615 620

Arg
625

<210> 10
<211> 27
<212> PRT
<213> señal de secreción de Bacillus lentus

<400> 10

```
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1               5                   10                  15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala
            20                  25
```

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de proteasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos el 80 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 3;
(c) una variante que comprende una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6, donde el número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos no es mayor que 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50; y
(d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c), que tiene actividad de proteasa, donde el fragmento comprende al menos 415 residuos de aminoácidos;

donde el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 5 a 25 °C en comparación con la proteasa 10R expuesta en la SEQ ID N.º: 8.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consistente en el polipéptido de la SEQ ID N.º: 5 o la SEQ ID N.º: 6.

3. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

4. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

5. Constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 4 operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped de expresión.

6. Célula huésped de expresión recombinante que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

7. Método de producción del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende:

(a) el cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
(b) la recuperación del polipéptido.

8. Método de producción del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende:

(a) el cultivo de la célula huésped según la reivindicación 6 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
(b) la recuperación del polipéptido.

9. Uso de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2

(i) en pienso para animales;
(ii) en aditivos para pienso para animales;
(iii) en la preparación de una composición para el uso en pienso para animales;
(iv) para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales;
(v) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en pienso para animales;
(vi) para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas para animales; y/o
(vii) para el tratamiento de proteínas.

10. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 se añade al pienso.

11. Aditivo para pienso para animales que comprende

(i) al menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2; y
(ii) al menos una vitamina liposoluble, y/o
(iii) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o
(iv) al menos un oligoelemento.

12. Aditivo para pienso para aninales según la reivindicación 11, que comprende además amilasa; fitasa; xilanasa; galactanasa; alfa-galactosidasa; proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa.

13. Pienso para animales con un contenido bruto de proteínas de 50 a 800 g/kg y que comprende al menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

14. Método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de añadir al menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 a al menos una proteína o fuente de proteína.

15. Método según la reivindicación 14, donde se incluye la soja entre la al menos una fuente de proteína.

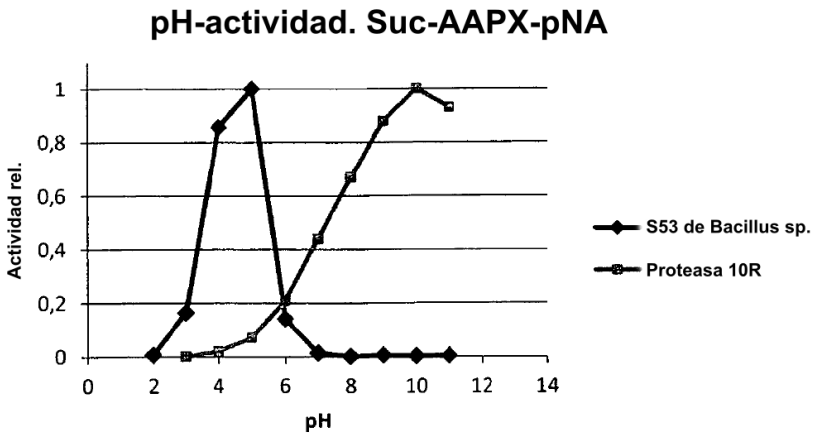
pH-actividad. Suc-AAPX-pNA
Actividad rel.
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
pH
S53 de Bacillus sp.
Proteasa 10R

Fig. 1

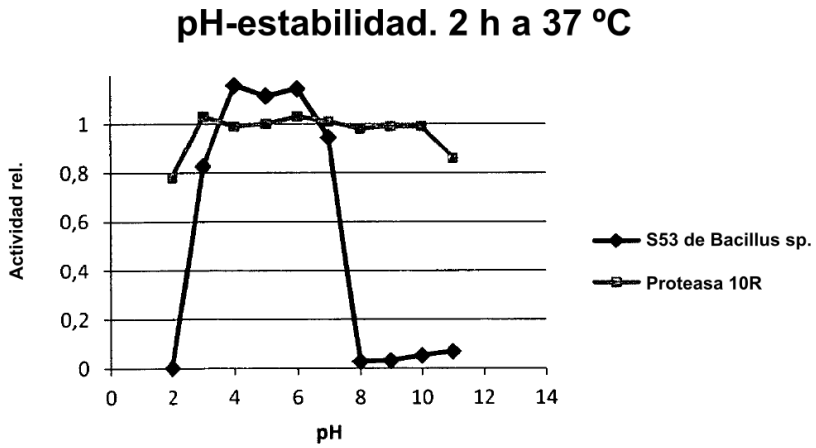
pH-estabilidad. 2 h a 37 ºC
Actividad rel.
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
pH
S53 de Bacillus sp.
Proteasa 10R

Fig. 2

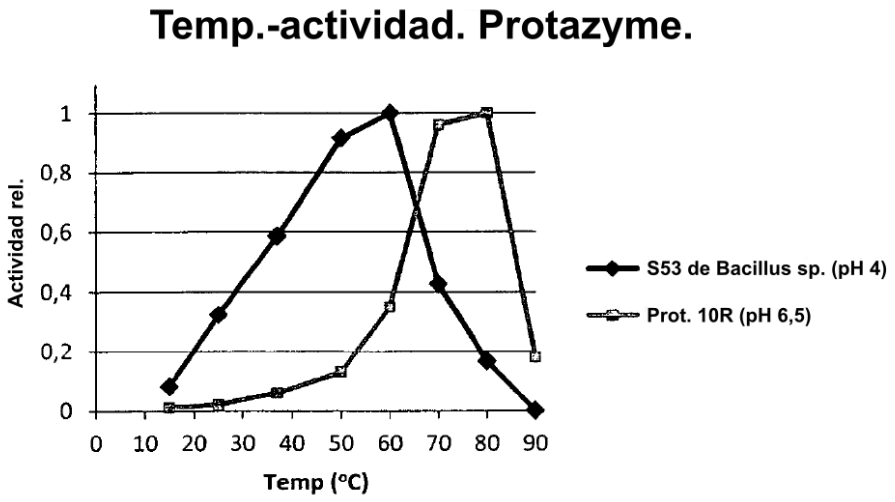
Temp.-actividad. Protazyme.
Actividad rel.
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
Temp (°C)
S53 de Bacillus sp. (pH 4)
Prot. 10R (pH 6,5)

Fig. 3

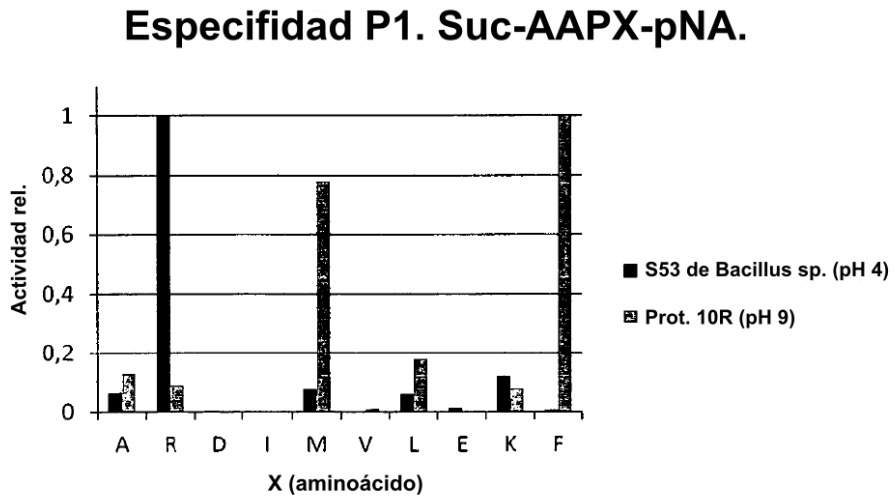
Especifidad P1. Suc-AAPX-pNA.
Actividad rel.
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
A R D I M V L E K F
X (aminoácido)
S53 de Bacillus sp. (pH 4)
Prot. 10R (pH 9)

Fig. 4

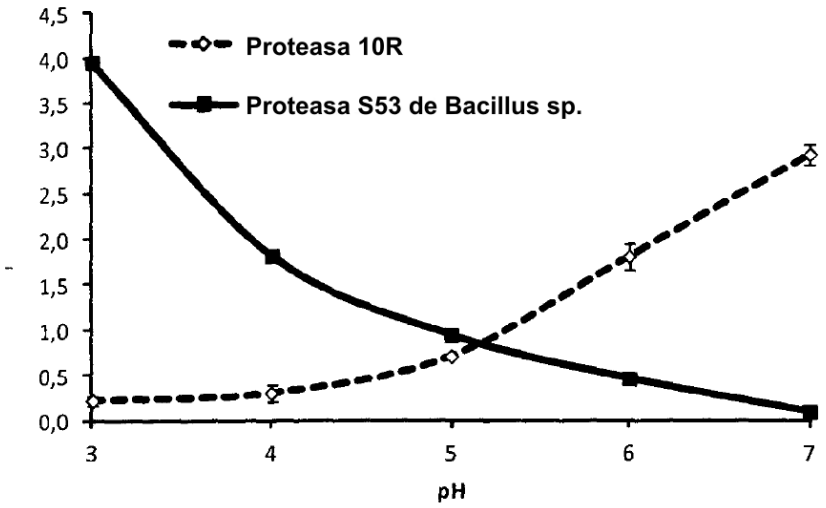
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Proteasa 10R
Proteasa S53 de Bacillus sp.
3
4
5
6
7
pH

Fig. 5

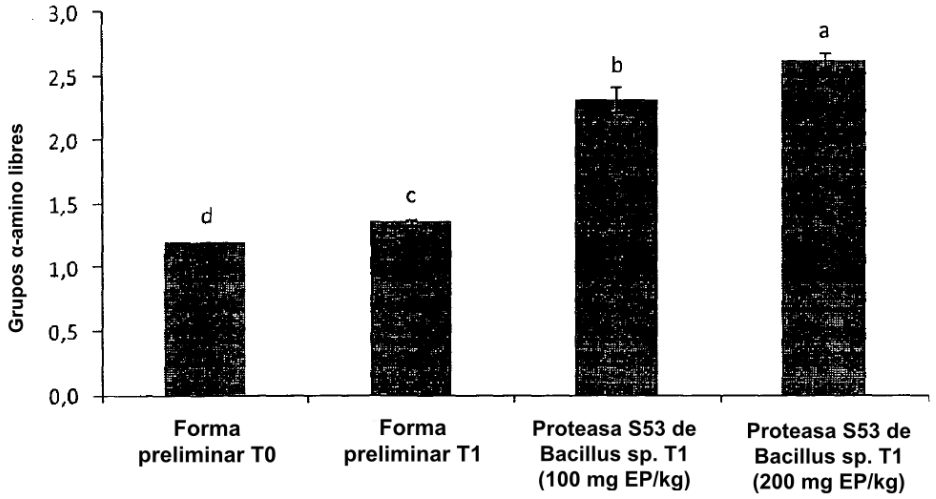
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Grupos α-amino libres
d
c
b
a
Forma preliminar T0
Forma preliminar T1
Proteasa S53 de Bacillus sp. T1 (100 mg EP/kg)
Proteasa S53 de Bacillus sp. T1 (200 mg EP/kg)

Fig. 6

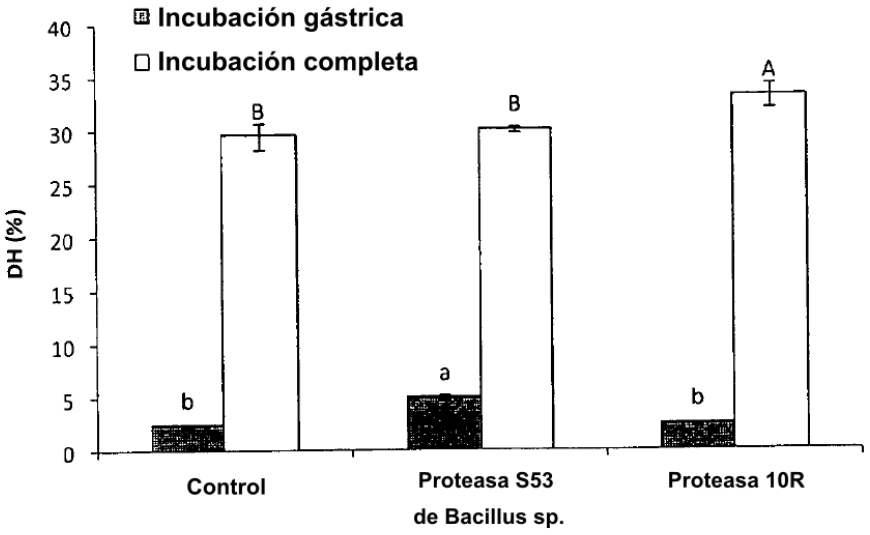
Incubación gástrica
Incubación completa
DH (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
B
B
A
b
a
b
Control
Proteasa S53
de Bacillus sp.
Proteasa 10R

Fig. 7