

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 753**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/EP2013/051656**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113689**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13703546 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2809816**

54 Título: **Procedimiento de expresión**

30 Prioridad:

31.01.2012 DE 102012201297

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KÜPPERS, TOBIAS;
 STEFFEN, VICTORIA;
 EICHSTÄDT, RENÉE, CHARLOTT;
 EVERS, STEFAN;
 MAURER, KARL-HEINZ;
 BONGAERTS, JOHANNES;
 HELLMUTH, HENDRIK;
 WEBER, THOMAS y
 O'CONNELL, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 703 753 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de expresión

La invención se encuentra en el campo de la biotecnología, principalmente la síntesis microbiana de proteínas. La invención se refiere principalmente a un procedimiento para la preparación de proteínas por microorganismos genéticamente modificados y propone, además, microorganismos que se usan en procedimientos de este tipo. La invención se refiere además a usos de microorganismos de este tipo para la preparación de proteínas.

Para la preparación de sustancias valiosas pueden emplearse microorganismos. Sustancias valiosas son, por ejemplo, compuestos con bajo peso molecular, por ejemplo, complementos alimenticios o compuestos con efecto farmacéutico, o proteínas para las cuales existe a su vez un gran campo industrial debido a su diversidad. En el primer caso, las propiedades metabólicas de los microorganismos en cuestión se aprovechan y/o se modifican para la preparación de sustancias valiosas; en el segundo caso preferentemente se emplean microorganismos que expresan los genes de las proteínas interesantes.

Para la producción biotecnológica a escala industrial, los microorganismos en cuestión se cultivan en fermentadores que están equipados de manera correspondiente a las propiedades metabólicas de los microorganismos. Durante el cultivo, los microorganismos metabolizan el sustrato ofrecido y forman el producto deseado que se separa habitualmente de los organismos de producción después de finalizada la fermentación y se aíslan del caldo de fermentación y/o del medio de fermentación y/o se concentran. Durante la producción fermentativa de proteínas, normalmente en calidad de sustrato se emplean materias primas ricas en proteína, junto con una fuente de carbono (normalmente glucosa). La producción de proteínas corresponde, por lo tanto, a una transformación biológica de proteína sustrato en proteína objetivo. Esto requiere la hidrólisis completa de la proteína sustrato en los aminoácidos individuales que luego se encuentran disponibles para la biosíntesis de la proteína objetivo.

Para la fermentación de microorganismos existe, por lo tanto, un estado de la técnica abundante el cual va desde la optimización de las cepas en cuestión, por ejemplo, con respecto a la velocidad de formación y a el uso de nutrientes, por medio de la configuración industrial de los fermentadores, hasta la obtención de las sustancias valiosas desde los microorganismos en cuestión y/o del medio de fermentación.

El empleo de bacterias en fermentaciones microbianas es fundamentalmente deseado. Las bacterias se distinguen por tiempos de generación breves y por bajas demandas en las condiciones de cultivo. De esta manera pueden establecerse procedimientos de cultivo o procedimientos de preparación económicos. Además, en el caso de bacterias, el especialista dispone de un rico bagaje de experiencia en la tecnología de fermentación. De preferencia se emplean bacterias gram-positivas, ya que secretan la proteína que va a producirse (proteína objetivo) en el medio que la rodea.

Habitualmente, en la fermentación microbiana son deseables los rendimientos más altos posibles de productos. Por ejemplo, la solicitud internacional de patente WO 91/02792 divulga la producción fermentativa mejorada de una proteasa alcalina a partir de *Bacillus lentus* en una cepa optimizada de *Bacillus licheniformis* controlando las secuencias reguladoras de gen de *Bacillus licheniformis*, principalmente del promotor de *Bacillus licheniformis*.

Feng Y. et al. ("Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain", *Applied Microbiol. Biotechnol.*, Volumen 57, No. 1-2, páginas 153-160) divulgan una cepa genéticamente modificadas de *B. pumilus* la cual expresa amilasa.

Los organismos de producción alternativos a *Bacillus licheniformis*, con los cuales pueden lograrse rendimientos de producto comparativamente altos o incluso mejorados, no se encuentran disponibles en el estado de la técnica de manera satisfactoria. Además, existe una alta demanda de procedimientos de fermentación microbiana que hacen posible un alto rendimiento del producto.

El objetivo fundamental de la invención es lograr un alto rendimiento de producto, principalmente de una proteína, en una fermentación microbiana.

Es objeto de la invención un procedimiento para la preparación de una proteína mediante un microorganismo, el cual comprende las etapas procedimentales

(a) introducir un constructo de expresión a un microorganismo que comprende un promotor y un ácido nucleico que codifica para la proteína;

(b) expresar la proteína en el microorganismo, en cuyo caso el microorganismo corresponde a la especie *Bacillus pumilus* y el microorganismo está impedido para la esporulación, de preferencia gracias a una modificación del gen *spoVI* (*yqfD*), principalmente gracias a una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo.

Un procedimiento según la invención comprende opcionalmente, además, la etapa procedimental adicional de

(c) cultivar el microorganismo.

En formas preferidas de realización según la invención, un procedimiento según la invención es, por consiguiente, un procedimiento de fermentación.

5 De manera sorprendente se ha establecido que el empleo de una bacteria de la especie *Bacillus pumilus* en un procedimiento de este tipo hace posible un alto rendimiento de producto y, por lo tanto, es ventajoso. Usando *Bacillus pumilus* como organismo de producción es posible lograr un rendimiento de producto ventajoso, principalmente mejorado. Como referencia, a este respecto, sirve *Bacillus licheniformis* que es un organismo de producción establecido en el estado de la técnica que se usa industrialmente en una gran cantidad de fermentaciones microbianas.

10 En una configuración preferida, el procedimiento según la invención es, por lo tanto, un procedimiento para aumentar la expresión de una proteína en un microorganismo. Una expresión mejorada de la proteína se presenta si mediante un procedimiento según la invención se obtiene una cantidad más grande de proteína en comparación con un procedimiento similar que se distingue de un procedimiento según la invención solamente en que se usan bacterias de la especie *Bacillus licheniformis*, preferentemente del tipo silvestre. Ambos procedimientos que pueden compararse se realizan a este respecto en condiciones iguales, tan óptimas como sean posibles, para los microorganismos y durante el mismo tiempo.

15 Un constructo de expresión es una secuencia de ácido nucleico que provoca que la proteína pueda expresarse en el microorganismo. Comprende la información genética, es decir aquella secuencia de ácidos nucleicos (gen) que codifica para la proteína. La expresión de una secuencia de ácido nucleico es su traducción a su producto génico o sus productos génicos codificado(s) por esta secuencia, es decir en un polipéptido (proteína) o en varios polipéptidos (proteínas). Los términos polipéptido y proteína se usan como sinónimos en la presente solicitud. En el contexto de la presente invención, por lo tanto, expresión designa la biosíntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas a partir de las informaciones genéticas. Por lo regular, la expresión comprende la transcripción, es decir la síntesis, de un ácido ribonucleico mensajero ("messenger") (ARNm) por medio de la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) del gen y su traducción a la cadena correspondiente de polipéptido la cual puede modificarse opcionalmente todavía después de la traducción. Por lo tanto, la expresión de una proteína describe la biosíntesis de la misma a partir de informaciones genéticas que de acuerdo con la invención se encuentran presentes en el microorganismo.

20 Un constructo de expresión comprende, además, al menos una secuencia de ácido nucleico, de preferencia ADN, con una función de control para la expresión de la secuencia de ácido nucleico (llamada secuencia reguladora de gen) que codifica para la proteína o para la proteasa auxiliar. Una secuencia reguladora de gen es en este caso cualquier secuencia de ácido nucleico cuya presencia en el microorganismo influye en, de preferencia incrementa, la frecuencia de transcripción de aquella secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína. De preferencia se trata de una secuencia promotora, ya que una secuencia de este tipo es esencial para la expresión de una secuencia de ácido nucleico. Sin embargo, un constructo de expresión según la invención también puede comprender otras secuencias reguladoras de gen, por ejemplo, una o varias secuencias potenciadoras. Por consiguiente, un constructo de expresión en el contexto de la invención comprende al menos una unidad funcional de gen y promotor. Sin embargo, esta puede, aunque obligatoriamente no tiene que, presentarse como unidad física.

25 La presencia de al menos un promotor es esencial para un constructo de expresión según la invención. Por consiguiente, por un promotor se entiende una secuencia de ADN que hace posible la expresión regulada de un gen. De manera natural, una secuencia promotora es un componente de un gen y con frecuencia está situado en su extremo 5', y, por lo tanto, antes de la región de ARN codificante. La secuencia promotora se encuentra preferentemente en un constructo de expresión según la invención en dirección 5' antes de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína. La propiedad más importante de un promotor es la interacción específica con al menos una proteína o un polipéptido que enlaza ADN, el cual facilita el inicio de la transcripción del gen por medio de una polimerasa ARN y se designa como factor de transcripción. Con frecuencia participan varios factores de transcripción y/u otras proteínas en el inicio de la transcripción por medio de una polimerasa ARN. Por consiguiente, un promotor es preferentemente una secuencia de ADN con actividad promotora, es decir, una secuencia de ADN a la cual se enlaza al menos un factor de transcripción para la iniciación de la transcripción de un gen de forma al menos transitoria. La fuerza de un promotor es medible por medio de la frecuencia de la transcripción del gen expresado, es decir, por medio de la cantidad de moléculas de ARN generadas por unidad de tiempo, principalmente moléculas de ARNm. Un promotor de un constructo de expresión según la invención puede ser un promotor propio del microorganismo. Por consiguiente, una secuencia promotora de este tipo se encuentra presente de forma natural en el microorganismo. Como alternativa, un promotor de un constructo de expresión según la invención también puede haber sido introducido de manera recombinante en el microorganismo. Lo correspondiente también aplica para todas las otras secuencias reguladoras de gen que puede presentar un constructo de expresión según la invención. El promotor en un constructo de expresión, tal como se usa en un procedimiento según la invención, causa la expresión de la secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína (proteína objetivo) en el constructo de expresión.

30 En una forma preferida de realización, un procedimiento según la invención se caracteriza porque el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de

- (a) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 1 en al menos 80 % y de manera crecientemente preferible en al menos 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo particularmente preferido en 100 %;
- 5 (b) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 2 en al menos 80 % y de manera crecientemente preferida en al menos 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;
- 10 (c) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 3 en al menos 80 % y de manera crecientemente preferida en al menos 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;
- 15 (d) secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 4 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %.

En una configuración alternativa, el promotor presenta una secuencia de ácido nucleico tal como se ha descrito antes.

20 Se ha mostrado que con secuencias promotoras de este tipo en un procedimiento según la invención pueden lograrse rendimientos de producto particularmente altos de proteína.

De preferencia, el promotor se caracteriza porque comprende una secuencia de ácido nucleico, la cual es idéntica a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 1 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %, y el promotor causa una frecuencia de transcripción del gen expresado por este, la cual corresponde al menos a aquella de un promotor según SEQ ID NO: 1. Como alternativa, el promotor se caracteriza porque comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 2 en al menos 80 % y de manera crecientemente preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %, y el promotor causa una frecuencia de transcripción del gen expresado por este que corresponde al menos a aquella de un promotor según SEQ ID NO: 2.

35 Según otra forma alternativa de realización, el promotor se caracteriza porque comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 3 en al menos 80 % y cada vez más preferible en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferible en 100 %, y el promotor causa una frecuencia de transcripción del gen expresado por este que corresponde a aquella de un promotor según SEQ ID NO: 3. Según otra forma alternativa de realización, el promotor se caracteriza porque comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 4 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %, y el promotor causa una frecuencia de transcripción del gen expresado por este que corresponde al menos a aquella de un promotor según SEQ ID NO: 4.

45 En otra configuración alternativa, el promotor presenta una secuencia de ácido nucleico, tal como se ha descrito anteriormente.

La determinación de la entidad de secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos se efectúa por medio de una comparación de secuencias. Una comparación así se efectúa asignando entre sí sucesiones similares en las secuencias de nucleótidos o secuencia de aminoácidos. Esta comparación de secuencias se efectúa preferentemente con base en el algoritmo BLAST establecido y usado habitualmente en el estado de la técnica (cf., por ejemplo, Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) y ocurre en principio asignando entre sí sucesiones similares de nucleótidos o de aminoácidos en las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos. Una asignación de tabla de las posiciones en cuestión se denomina alignment (alineación). Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencias (alineaciones), principalmente comparaciones múltiples de secuencias, se producen habitualmente mediante programas de ordenador. Con frecuencia se usa, por ejemplo, la serie Clustal (cf., por ejemplo, Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment

with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (cf., por ejemplo, Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En el contexto de la presente invención, las comparaciones de secuencias y alineaciones se crean preferiblemente con el programa de ordenador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, Estados Unidos de América) con los parámetros estándar predefinidos (default).

Una comparación así permite hacer una declaración sobre la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Habitualmente, esta se indica en identidad porcentual, es decir la fracción de los nucleótidos o restos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones o posiciones correspondientes entre sí en una alineación. El término ampliamente definido de homología, en el caso de secuencia de aminoácidos, toma en consideración intercambios de aminoácidos conservados, es decir aminoácidos con propiedades similares, ya que estos generalmente ejercen actividades o funciones similares dentro de la proteína.

Por lo tanto, la similitud de las secuencias comparadas también puede estar indicada como homología porcentual o similitud porcentual. Las indicaciones de identidad y/o de homología pueden darse por polipéptidos o genes completos o solamente por zonas individuales. Zonas de homología o zonas idénticas de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos son, por lo tanto, definidos mediante coincidencias en las secuencias. Generalmente presentan funciones iguales o similares. Pueden ser pequeñas o comprender sólo pocos nucleótidos o aminoácidos. Frecuentemente, tales zonas pequeñas ejercen funciones esenciales para la actividad total de la proteína. Por lo tanto, puede ser práctico indicar coincidencias de secuencias solamente en zonas individuales, opcionalmente pequeñas. Pero, si no se indica algo diferente, los datos de identidad y de homología en la presente solicitud se refieren a la longitud total de la secuencia de ácido nucleico o aminoácido respectivamente indicada. En el caso de proteínas, principalmente en el caso de enzimas y entrevistas particularmente en caso de proteasas, los datos se refieren además a la proteína respectivamente madura, sino se indica algo diferente. Por consiguiente, sin datos diferentes, un análisis de secuencia para una proteína se dirige siempre a la proteína madura, de tratamiento terminado, incluso si el gen correspondiente codifica una forma inmadura la cual es tratada para obtener la forma madura después de la traducción.

El constructo de expresión que va a introducirse en el microorganismo en un procedimiento según la invención codifica, además, para una proteína. Por lo tanto, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para esta proteína. Para esto se puede usar fundamentalmente una secuencia cualquiera de ácido nucleico que pueda traducirse a una proteína. En este caso se trata de la proteína (proteína objetivo) que debe prepararse con ayuda de un procedimiento según la invención. De preferencia se trata de una enzima, más preferiblemente de una enzima como se describe a continuación.

Los ácidos nucleicos y constructos de expresión según la invención pueden generarse mediante procedimientos conocidos per se para la modificación de ácidos nucleicos. Tales procedimientos se encuentran, por ejemplo, en manuales pertinentes, como el de Fritsch, Sambrook y Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, y conocidos por el especialista en el campo de la biotecnología. Ejemplos de tales procedimientos son la síntesis química o la reacción en cadena de polimerasa (PCR), opcionalmente en combinación con otros procedimientos estándar de la biología molecular y/o química o bioquímica.

La presente invención es adecuada principalmente para la preparación recombinante de proteínas, principalmente enzimas. Para esto, el constructo de expresión se introduce en el microorganismo, preferentemente mediante transformación. A este respecto, la introducción del constructo de expresión respectivo, o de partes del mismo, se efectúa preferentemente por medio de vectores, principalmente vectores de expresión. Pero también es posible que solamente partes del constructo de expresión, de preferencia al menos el ácido nucleico que codifica para la proteína se introduzca en el microorganismo de manera que el constructo de expresión terminado se forme sólo en el microorganismo. Esto puede efectuarse, por ejemplo, mediante un vector que causa que el gen para la proteína en la célula anfitriona sea insertado en un elemento genético ya presente como el cromosoma, el ADN cromosómico u otros vectores de modo que, por ejemplo, se use un promotor endógeno para la expresión del gen para la proteína. El término introducir comprende, por lo tanto, la posibilidad de que un constructo de expresión se introduzca completamente en el microorganismo, de preferencia que se transforme, pero también la posibilidad de que sólo una parte del constructo de expresión, de modo particularmente preferible el ácido nucleico que codifica para la proteína, se introduzca en el microorganismo, de preferencia se transforme, y el constructo de expresión completo surja solamente en el microorganismo. Pero en el contexto de la invención, al menos una parte del constructo de expresión se introduce siempre en el microorganismo.

Los vectores son conocidos por el especialista en el campo de la biotecnología. Principalmente al usar en bacterias son plásmidos especiales, es decir elementos genéticos circulares. En el contexto de la presente invención el constructo de expresión es clonado preferentemente en un vector. A los vectores pueden pertenecer, por ejemplo, aquellos que se derivan de plásmidos bacterianos, de virus o de bacteriófagos, o preponderantemente plásmidos o vectores sintéticos con elementos de la más diferente procedencia. Con los otros elementos genéticos respectivamente presentes, los vectores están en capacidad de establecerse en los microorganismos por varias generaciones como unidades estables. En el sentido de la invención no es relevante si se establecen de modo

extracromosómico como unidades propias, o se integran al ADN cromosómico. Cuál de los numerosos sistemas se selecciona depende del caso individual. Los factores decisivos pueden ser, por ejemplo, la cantidad de copias que pueden lograrse, los sistemas de selección disponibles, entre ellos, ante todo, resistencias a antibióticos, o la capacidad de cultivo de los microorganismos capaces de asimilar los vectores.

- 5 Los vectores de expresión pueden ser regulables, además, mediante modificaciones de las condiciones de cultivo como, por ejemplo, la densidad celular o la adición de determinados compuestos. Un ejemplo de un compuesto tal es el derivado de galactosa isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), el cual se usa como activador del operón de lactosa bacteriana (operón lac).

- 10 En otra forma de realización de la invención, un procedimiento según la invención se caracteriza porque la proteína no está presente de manera natural en el microorganismo.

- 15 Una presencia no natural significa en este contexto que la proteína no es una proteína o enzima propia del microorganismo. Por consiguiente, la proteína puede no expresarse por una secuencia de ácido nucleico que es parte del ADN cromosómico del microorganismo en su forma de tipo silvestre. La proteína y/o la secuencia de ácido nucleico que la codifica respectivamente no están presentes, por lo tanto, en la forma de tipo silvestre del microorganismo y/o no pueden aislarse de la misma a partir de la forma de tipo silvestre del microorganismo. Preferentemente, una proteína no presente en el microorganismo de una manera natural, o bien la secuencia de ácido nucleico que la codifica, han sido introducidas de manera dirigida al microorganismo con ayuda de procedimientos de ingeniería genética, de modo que el microorganismo ha sido enriquecido con la proteína o la secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma. Sin embargo, una proteína puede estar presente absolutamente de manera natural en otro microorganismo; para consideración es relevante exclusivamente el microorganismo empleado en el procedimiento.

- 20 En otra forma de realización de la invención, el procedimiento se caracteriza porque la proteína es una enzima, principalmente una celulasa ácida, alfa-amilasa, alfa-acetodecarboxilasa, aminopetidasa, amilasa, arabanasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, beta-manosidasa, carragenasa, carbohidrasa, catalasa, celobiosa-oxidasa, celulasa, quimosina, endo-1,3-beta-glucanasa, endo-1,3(4)-beta-glucanasa, endo-1,4-beta-xilanas, endopeptidasa, esterasa, exopeptidasa, G4-amilasa, glucoamilasa, glucosidasa, glicolipasa, hemicelulasa, lacasa, lipasa, lisofosfolipasa, amilasa maltogénica, mananasa, proteasa neutra, nucleasa, oxidasa, oxidoreductasa, peptato liasa, pectinasa, pectina esterasa, pentosanasa, perhidrolasa, fosfolipasa, fitasa, poligalacturonasa, proteasa, proteinasa, pululanasa, enzima de Rennet (del cuajo), rhamnogalacturonasa, subtilisina, tanasa, transferasa, transglutaminasa, xantanas, xilanas, xiloglucanasa o mezclas de las mismas. De manera muy particularmente preferida, la proteína es una proteasa. En configuraciones particularmente ventajosas de un procedimiento según la invención, la proteasa que va a producirse (= proteína objetivo) simultáneamente también participa en la hidrólisis del sustrato proteína para el microorganismo y puede causar ventajosamente una disgregación otra vez mejorada de la proteína sustrato. Por lo tanto, el microorganismo tiene condiciones nutricionales mejoradas a su disposición.

- 35 Por ejemplo, con un procedimiento según la invención pueden prepararse ventajosamente las enzimas mencionadas a continuación.

- 40 Entre las proteasas se prefieren subtilisinas. Ejemplos de estas son la subtilisina BPN' y Carlsberg, la proteasa pB92, las subtilisinas 147 y 309, las proteasas alcalinas de Bacillus lentus, subtilisina DY y las enzimas termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7 que, no obstante, ya no corresponden a la subtilisinas en el sentido más estrecho. La subtilisina Carlsberg, en forma evolucionada, puede obtenerse bajo el nombre comercial Alcalase® de la compañía Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca. Las subtilisinas 147 y 309 se venden bajo el nombre comercial Esperase®, o Savinase® de la compañía Novozymes. De la proteasa de Bacillus lentus DSM 5483 se derivan variantes de proteasa segregadas bajo la denominación BLAP®. Otras proteasas preferidas son, además, por ejemplo, las enzimas segregadas bajo la denominación PUR. Otras proteasas también son enzimas que pueden obtenerse bajo los nombres comerciales Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym®, Natalase®, Kannase® y Ovozyme® de la compañía Novozymes, bajo los nombres comerciales Purafect®, Purafect® OxP, Purafect® Prime, Excellase® y Properase® de la compañía Genencor/Danisco, bajo el nombre comercial Protosol® de la compañía Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, bajo el nombre comercial Wuxi® de la compañía Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, bajo los nombres comerciales proleather® y Protease P® de la compañía Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japón, y bajo la denominación Proteinase K-16 de la compañía Kao Corp., Tokio, Japón. Además, también se prefieren las proteasas de Bacillus gibsonii y Bacillus pumilus que se divulgan en las solicitudes internacionales de patentes WO2008/086916 y WO2007/131656.

- 55 Ejemplos de amilasas son las α-amilasas de Bacillus licheniformis, de Bacillus amiloliquefaciens o de Bacillus stearothermophilus, así como principalmente también sus desarrollos mejorados para el empleo en productos de lavado o de limpieza. La enzima de Bacillus licheniformis puede obtenerse de la compañía Novozymes bajo el nombre Termamil® y de la compañía Danisco/Genencor bajo el nombre Purastar®ST. Los productos de evolución de estas α-amilasas son de la compañía Novozymes bajo los nombres comerciales Duramyl® y Termamyl® ultra, de la compañía Danisco/Genencor bajo el nombre Purastar® OxAm y de la compañía Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón, como Keistase®. La α-amilasa de Bacillus amiloliquefaciens es vendida por la compañía Novozymes bajo el nombre BAN®, y las variantes derivadas de la α-amilasa de Bacillus stearothermophilus bajo los nombres BSG® y

Novamyl®, igualmente de la compañía Novozymes. Además, pueden mencionarse la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrina-glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus agaradherens* (DSM 9948). Igualmente pueden emplearse productos de fusión de todas las moléculas mencionadas. Además, son adecuados los desarrollos de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae* que pueden obtenerse bajo los nombres comerciales Fungamil® de la compañía Novozymes. Otros productos comerciales ventajosos son, por ejemplo, la amilasa Powerase® de la compañía Danisco/Genencor y las amilasas Amilase-LT®, Stainzyme® y Stainzyme Plus®, estas últimas de la compañía Novozymes. También pueden prepararse según la invención variantes de estas enzimas que pueden obtenerse mediante mutaciones puntuales. Otras amilasas preferidas se divulgan en las publicaciones de las memorias de presentación de solicitudes internacionales WO 00/60060, WO 03/002711, WO 03/054177 y WO07/079938, a cuya divulgación, por lo tanto, se hace referencia de manera expresa. Las amilasas que van a prepararse según la invención son, además, preferentemente α -amilasas.

Ejemplos de lipasas o cutinasas son las lipasas que pueden obtenerse o desarrollarse originalmente de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), principalmente aquellas con el intercambio de aminoácidos D96L. Estas son vendidas, por ejemplo, por la compañía Novozymes bajo los nombres comerciales Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®. Además, pueden prepararse las cortinas as que han sido aisladas originalmente de *Fusarium solani* pisi y *Humicola insolens*. De la compañía Danisco/Genencor, por ejemplo, pueden prepararse lipasas o cutinasas cuyas enzimas de partida hayan sido aisladas originalmente de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como otros productos comerciales importantes pueden mencionarse las preparaciones vendidas originalmente por la compañía Gist-Brocades (entretanto Danisco/Genencor) M1 Lipase® y Lipomax® y las enzimas vendidas por la compañía Meito Sangyo KK, Japón, bajo los nombres Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase pL®, también el producto Lumafast® de la compañía Danisco/Genencor.

Ejemplos de celulasas (endoglucanasas, EG) comprende secuencias de la preparación de celulasa, originaria de hongos, rica en endoglucanasa (EG)-o sus desarrollos que son ofrecidos por la compañía Novozymes bajo el nombre comercial Celuzyme®. Los productos Endolase® y Carezyme® que pueden obtenerse igualmente en la compañía Novozymes se basan en la 50 kD-EG, o en la 43 kD-EG de *Humicola insolens* DSM 1800. Otros productos comerciales de esta compañía que pueden prepararse son Cellusoft®, Renozyme® y Celluclean®. También pueden prepararse, por ejemplo, celulasas que pueden obtenerse en la compañía AB Enzymes, Finlandia, bajo los nombres comerciales Ecostone® y Biotouch® y que se basan, al menos parcialmente, en la 20 kD-EG de *Melanocarpus*. Otras celulasas de la compañía AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Otras celulasas adecuadas son de *Bacillus* sp. CBS 670.93 y CBS 669.93, en cuyo caso aquellas de *Bacillus* sp. CBS 670.93 pueden obtenerse en la compañía Danisco/Genencor bajo el nombre comercial Puradax®. Otros productos comerciales de la compañía Danisco/Genencor que pueden prepararse son "celulasa detergente L de Genencor" e IndiAge®Neutra.

Las variantes de estas enzimas que pueden obtenerse mediante mutaciones puntuales también pueden prepararse según la invención. Celulasas particularmente preferidas son variantes de celulasa de *Thielavia terrestris*, las cuales se divulgan en la memoria de presentación internacional de patente WO 98/12307, celulasas de *Melanocarpus*, principalmente *Melanocarpus albomyces*, las cuales se divulgan en la memoria de presentación internacional de patente WO 97/14804, celulasas del tipo EGIII de *Trichoderma reesei*, las cuales se divulgan en la solicitud de patente europea EP 1305432, o las variantes que pueden obtenerse a partir de estas, principalmente aquellas que se divulgan en las solicitudes de patente europea EP 1240525 y EP 1305432, así como celulasas que se divulgan en las memorias de presentación internacional de patente WO 1992006165, WO 96/29397 y WO 02/099091, a cuya divulgación respectiva, por lo tanto, se hace referencia expresamente.

Además, pueden prepararse otras enzimas que se recopilan bajo el término hemicelulasas. A estos pertenecen, por ejemplo, mananasas, xantanlianas, xantananas, pectinaliasas (= pectinasas), pectina esteranas, pectato lianas, xiloglucanasas, xilanasas, pululanasas y β -glucanasas. Enzimas que son adecuadas con respecto a esto pueden obtenerse, por ejemplo, bajo los nombres Gamanase®, Pektinex AR® y Pectaway® de la compañía Novozymes, bajo el nombre Rohapec® B1L de la compañía AB Enzymes y bajo el nombre Pyrolase® de la compañía Diversa Corp., San Diego, CA, Estados Unidos de América. La β -glucanasa puede ser obtenida de *Bacillus subtilis* bajo el nombre Cereflo® de la compañía Novozymes. Hemicelulasas particularmente preferidas según la invención se venden, por ejemplo, bajo los nombres comerciales Mannaway® de la compañía Novozymes o Purabrite® de la compañía Genencor.

Además también pueden prepararse oxidoreductasas, por ejemplo, oxidasas, oxigenasas, catalasas, peroxidadas, tales como halo-, cloro-, bromo-, lignina-, glucosa- o manganeso-peroxidadas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). Como productos comerciales adecuados pueden nombrarse Denilite® 1 y 2 de la compañía Novozymes. Otras enzimas se divulgan en las solicitudes internacionales de patente WO 98/45398, WO 2005/056782, WO 2004/058961 y WO 2005/124012.

En otra forma de realización de la invención, el procedimiento se caracteriza porque el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395. Esta cepa fue depositada el 1 de marzo de 2001 en la DSMZ (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares], Inhoffenstraße 7 B, 38124 Brunswick, Alemania) y se identifica como una cepa de *Bacillus pumilus* por la DSMZ (DSM ID 01-197). Tal como muestran los ejemplos en la presente solicitud de patente, con esta cepa se obtienen muy buenos rendimientos del producto en fermentaciones celulares.

En otra forma de realización de la invención, la cepa que va a emplearse en un procedimiento según la invención está modificada genéticamente. Mediante la modificación genética de manera ventajosa se incrementa aún más el rendimiento de producto o se modifica ventajosamente una propiedad del producto. Como producto aquí debe entenderse la proteína expresada que se encuentra presente en el medio de fermentación. Por ejemplo, se disminuye su olor, se atenúa su color y/o se clarifica el producto (es decir, se vuelve menos turbio) o se reduce su densidad. Con respecto a esto, la modificación genética no significa la introducción del constructo de expresión según la etapa procedimental (a). Más bien, el microorganismo que va a emplearse en el procedimiento según la invención de la especie *Bacillus pumilus* ya ha sido modificado genéticamente, o sea que antes de que el constructo de expresión según la etapa procedimental (a) ha sido introducido en el microorganismo. La existencia de la modificación genética preferiblemente se determina en comparación con el tipo silvestre de *Bacillus pumilus*, principalmente *Bacillus pumilus* DSM 14395. Como modificación genética se toman en consideración a este respecto sustituciones, inserciones y/o supresiones. De manera ventajosa, la modificación genética provoca el cambio funcional, por ejemplo, la desactivación funcional, de un gen en el microorganismo. El cambio funcional, por ejemplo, la desactivación funcional, del gen causa a su vez una producción incrementada y/o mejorada de la proteína y, por lo tanto, un rendimiento de producto mejorado y/o la obtención de un producto con una o varias propiedades mejoradas. Por desactivación funcional ha de entenderse que ya no se forma(n) el o los productos génicos codificados por este gen, o se forma(n) en una forma biológicamente inactiva, de modo que ya no puede(n) ejercer su función o sus funciones en el microorganismo. Con respecto a esto también puede efectuarse una desactivación funcional de un gen principalmente reemplazándolo completa o parcialmente por un gen alternativo. Este gen alternativo puede expresarse entonces en lugar del gen originalmente presente. En consecuencia, el gen originalmente presente se desactiva funcionalmente y en lugar de este se expresa el gen alternativo y de esta manera causa el cambio funcional. El gen alternativo puede ser un gen relacionado con el gen original (más de 50 % de identidad con el gen original) o un gen no relacionado con el gen original (50 % o menos de identidad con el gen original). Por ejemplo, el gen alternativo puede insertarse mediante inserción en la secuencia codificante del gen original. De esta manera, el gen original se desactiva funcionalmente en lugar de éste se expresa el gen alternativo. La modificación genética puede presentarse tanto en la secuencia codificante para el producto génico, como también en una secuencia reguladora de gen que pertenece al gen.

Los microorganismos que van a emplearse según la invención pueden ser cambiados, por ejemplo, con respecto a sus requisitos para las condiciones de cultivo, ser cambiados con respecto a su comportamiento de movimiento, ser cambiados con respecto a su capacidad de esporulación, ser cambiado con respecto a una ruta metabólica determinada, por ejemplo, para suprimir la formación de malos olores durante la fermentación, o incluso otros marcadores de selección o marcadores de selección adicionales.

Genéticamente modificables a este respecto son todos los genes en la cepa de *Bacillus pumilus* que puede emplearse en un procedimiento según la invención, para los cuales existe una correspondencia en el genoma de *Bacillus pumilus* que se divulga en la publicación de Gioia et al., PLoS ONE, 9: e928 (2007). Esta publicación describe el primer genoma de *Bacillus pumilus* completamente secuenciado. Se señala esta referencia de manera expresa.

Además, todos los genes en la cepa de *Bacillus pumilus* que va a emplearse en un procedimiento según la invención son modificables genéticamente, para los cuales existe una correspondencia en uno o varios de los genomas de los microorganismos indicados a continuación:

Agrobacterium radiobacter K84, *Agrobacterium tumefaciens* str. C58, *Agrobacterium vitis* S4,

Arcobacter butzleri ED-1, *Arcobacter nitrofigilis* DSM 7299, *Arcobacter* sp. L, *Aromatoleum aromaticum* EbN1, *Arthrobacter aurescens* TC1, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, *Arthrobacter* sp. FB24, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, *Bacillus anthracis* str. Ames, *Bacillus atrophaeus* 1942, *Bacillus cellulosilyticus* DSM 2522, *Bacillus cereus* ATCC 10987, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus cereus* B4264, *Bacillus clausii* KSM-K16, *Bacillus coagulans* 36D1, *Bacillus cytotoxicus* NVH 391-98, *Bacillus halodurans* C-125, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus megaterium* DSM 319, *Bacillus pseudofirmus* OF4, *Bacillus pseudomycooides* DSM 12442 (305 partes en un registro CON),

Bacillus pumilus SAFR-032, *Bacillus selenitireducens* MLS10, *Bacillus subtilis* BSn5, *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii str. W23, *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii TU-B-10), *Bacillus subtilis* subsp. subtilis RO-NN-1, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis str. 168, *Bacillus thuringiensis* BMB1713,

Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27T, *Bacillus thuringiensis* serovar thuringiensis str. T01001, *Bacillus tusciae* DSM 2912, *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis V9, *Bifidobacterium bifidum* PRL2010, *Bifidobacterium breve* UCC2003, *Bifidobacterium dentium* Bd1, *Bifidobacterium longum* DJO10A, *Bifidobacterium longum* NCC27051, *Bifidobacterium longum* subsp. infantis ATCC 15697, *Bradyrhizobium* sp. ORS 278, *Brevibacillus brevis* NBRC 100599, *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129, *Corynebacterium efficiens* YS-314, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium jeikeium* K411, *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM

44385, *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41, *Corynebacterium resistens* DSM 45100, *Corynebacterium ulcerans* BR-AD22, *Corynebacterium urealyticum* DSM 7109, *Corynebacterium variabile* DSM 44702,

5 *Desulfovibrio aespoensis* Aspo-2, *Desulfovibrio alaskensis* G20, *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. ATCC 27774, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638, *Desulfovibrio vulgaris* RCH1, *Desulfovibrio vulgaris* str. Miyazaki F, *Desulfurobacterium thermolithotrophum* DSM 11699, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Enterobacter asburiae* LF7a, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 *Enterobacter* sp. 638, *Escherichia coli* 536, *Escherichia coli* APEC O1, *Escherichia coli* CFT073, *Escherichia coli* O103:H2 str. 12009, *Escherichia coli* SE11, *Escherichia coli* SE15-,
10 *Escherichia fergusonii* ATCC 35469T chromosome, *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3, *Eubacterium cylindroides* T2-87 draft, *Eubacterium eligens* ATCC 27750, *Eubacterium limosum* KIST612, *Eubacterium rectale* M104/1 draft, *Eubacterium siraeum* 70/3 draft, *Exiguobacterium sibiricum* 255-15, *Exiguobacterium* sp. AT1b,

15 *Flavobacteriaceae* bacterium 3519-10, *Flavobacterium branchiophilum* FL-15, *Flavobacterium johnsoniae* UW101, *Flavobacterium psychrophilum* JIP02/86, *Geobacillus kaustophilus* HTA426,

Geobacillus sp. C56-T3, *Geobacillus* sp. WCH70, *Geobacillus* sp. Y4.1MC1, *Geobacillus* sp. Y412MC52, *Geobacillus* sp. Y412MC61, plasmid pGYMC6101, *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, *Geobacter bemidjensis* Bem *Geobacter lovleyi* SZ, *Geobacter metallireducens* GS-15, *Geobacter* sp. FRC-32, *Geobacter* sp. M18,

20 *Geobacter* sp. M21, *Geobacter sulfurreducens* PCA, *Geobacter uraniireducens* Rf4, *Gloeobacter violaceus* PCC 74212, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 ATCC 49037, *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288, *Gluconobacter oxydans* 621H, *Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1,

25 *Lactobacillus acidophilus* 30SC, *Lactobacillus amylovorus* GRL 1112, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929, *Lactobacillus casei* ATCC 334, *Lactobacillus casei* BD-II, *Lactobacillus casei* BL23, *Lactobacillus casei* LC2W, *Lactobacillus crispatus* ST10,

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* ND02, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716,

Lactobacillus gasseri ATCC 33323, *Lactobacillus helveticus* H10, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533,

Lactobacillus kefiranofaciens ZW3, *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus reuteri* SD2112,

30 *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus ruminis* ATCC 27782, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K, *Lactobacillus salivarius* CECT 5713),

Lactobacillus sanfranciscensis TMW 1.1304, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E,

Mycobacterium abscessus chromosome, *Mycobacterium africanum* GM041182, *Mycobacterium avium* 104, *Mycobacterium bovis* BCG str. Tokyo 172, *Mycobacterium canettii* CIPT 140010059,

35 *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK, *Mycobacterium marinum* M, *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155, *Mycobacterium* sp. JDM601, *Mycobacterium* sp. JLS, *Mycobacterium* sp. KMS,

Mycobacterium sp. MCS, *Mycobacterium* sp. Spyr1, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1,

Pseudomonas aeruginosa NCGM2.S17, *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421, *Pseudomonas entomophila* L48 chromosome, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5,

Pseudomonas fulva 12-X, *Pseudomonas mendocina* NK-01, *Pseudomonas putida* KT2440+,

40 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *Pseudomonas stutzeri* DSM 4166, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a+, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000/,

Stenotrophomonas maltophilia K279a strain K279a, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112,

Streptomyces avermitilis MA-4680, *Streptomyces bingchenggensis* BCW-1, *Streptomyces cattleya* NRRL 8057 main chromosome, *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *Streptomyces coelicolor*,

45 *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331, *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350,

Streptomyces scabiei 87.22, *Streptomyces* sp. SirexAA-E, *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712,

Streptomyces violaceusniger Tu 4113, *Sulfobacillus acidophilus* TPY, *Thermobifida fusca* YX,

Thermotoga lettingae TMO, *Thermotoga maritima* MSB8, *Thermotoga naphthophila* RKU-10,

Thermotoga neapolitana DSM 4359, *Thermotoga petrophila* RKU-1, *Thermotoga* sp. RQ2,
Thermovibrio ammonificans HB-1, *Thermus thermophilus* HB27, *Xanthomonas albilineans*,
Xanthomonas axonopodis pv. *citrumelo* F1, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306/
5 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Además de la publicación mencionada, los genes modificables, principalmente las secuencias de los mismos, también se encuentran disponibles en bancos de datos de acceso público, por ejemplo, en el KEGG (banco de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes en <http://www.genome.jp/kegg> o en el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville pike, Bethesda, MD 20894, Estados Unidos de América) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. El banco de datos de KEGG fue desarrollado desde 1995 por los laboratorios de Kanehisa et al. del "Kyoto University Bioinformatics Center" y del "Human Genome Center of the University of Tokyo". Además de los genes individuales, estos bancos de datos también contienen informaciones y secuencias de genomas completos o grandes partes del genoma de diferentes microorganismos.

15 En el contexto de la presente solicitud de patente, una correspondencia genética se caracteriza, por un lado, por una homología de secuencia tan alta como sea posible entre el gen de la cepa de *Bacillus pumilus* que va a usarse según la invención y el gen de la cepa de *Bacillus pumilus* publicada por Gioia et al. y/o el gen del microorganismo indicado anteriormente. Por otro lado, una correspondencia genética se caracteriza por una función similar, es decir que los genes correspondientes entre sí de la cepa de *Bacillus pumilus* que van emplearse según la invención y de la cepa de *Bacillus pumilus* divulgada por Gioia et al. y/o del microorganismo indicado anteriormente poseen una función similar en el microorganismo respectivo.

20 Con estas informaciones del gen y/o del genoma es posible identificar el gen respectivo en la cepa de *Bacillus pumilus* que va a emplearse en un procedimiento según la invención. Con base en la información genética, principalmente la información de secuencia, a partir del genoma de la cepa de *Bacillus pumilus*, publicado por Gioia et al. y/o del genoma de un microorganismo indicado anteriormente, mediante comparación de secuencias y/o metodología estándar de biología molecular el especialista puede determinar la secuencia de ácido nucleico con la más alta coincidencia de secuencia en el genoma de la cepa de *Bacillus pumilus*, el cual se modifica genéticamente y luego ha de ser empleado en el procedimiento según la invención. La confirmación de una función similar, es decir de una correspondencia funcional, puede suministrarse mediante experimentos de comparación con los respectivos microorganismos en los cuales el gen comparado respectivamente con base en la comparación de secuencias se modifica de la misma manera (de preferencia se desactiva funcionalmente) y se observa si en ambos microorganismos aparecen modificaciones similares, principalmente modificaciones fenotípicas. Si, por ejemplo, la modificación, principalmente la desactivación funcional, del gen en cuestión en la cepa de *Bacillus pumilus* divulgada por Gioia et al. y/o en el microorganismo indicado anteriormente va acompañada con una modificación de la actividad metabólica, del movimiento o del comportamiento de esporulación, entonces puede verse aquí una confirmación de la clasificación correcta. Los procedimientos correspondientes son estándar en el campo de la genética, principalmente la genética de los microorganismos y son conocidos ampliamente por el especialista en este campo.

35 El microorganismo según la invención se encuentra impedido para esporulación. Esto se logra preferentemente desactivando funcionalmente su gen *spoIV* (*yqfD*) o su correspondencia genética, principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o su correspondencia genética o partes del mismo. Se ha establecido que con una cepa de *Bacillus pumilus* inhibida para esporulación de este tipo se logra un rendimiento particularmente alto de producto en un procedimiento según la invención.

40 Los microorganismos que se emplean en el procedimiento según la invención pueden cultivarse y fermentarse de manera habitual, por ejemplo, en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso, se inocula un medio nutriente adecuado con los microorganismos y la proteína se cosecha del medio después de un lapso de tiempo que puede determinarse experimentalmente. Las fermentaciones continuas se caracterizan por lograr un equilibrio de flujo en el cual durante un lapso de tiempo comparativamente largo mueren parcialmente células, pero también vuelven a crecer y, simultáneamente, la proteína formada puede tomarse del medio.

45 Los procedimientos según la invención son preferentemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación son conocidos per se del estado de la técnica y representan la propia etapa de producción a escala industrial, por lo regular seguida por un procedimiento de purificación adecuado de la proteína preparada. Todos los procedimientos de fermentación que se basan en un procedimiento según la invención para la preparación de una proteína representan configuraciones de un procedimiento según la invención.

50 Se toman en consideración principalmente procedimientos de fermentación que se caracterizan porque la fermentación se realiza mediante una estrategia de alimentación. En tal caso se alimentan componentes del medio que se consumen por el cultivo continuo. De esta manera pueden lograrse incrementos considerables, tanto en la densidad celular, como también en la masa celular o masa seca. Además, la fermentación también puede

configurarse de modo que se eliminen por filtración los productos metabólicos no deseados o se neutralicen adicionando reguladores de pH o contra-iones respectivamente adecuados.

La proteína preparada puede cosecharse del medio de fermentación. Un procedimiento de fermentación así es preferido frente a un aislamiento de la proteína del microorganismo, es decir un tratamiento del producto proveniente de la masa celular (masa seca). Esto puede lograrse, por ejemplo, poniendo a disposición marcadores o mecanismos de secreción y/o sistemas de transporte adecuados para que los microorganismos secreten la proteína en el medio de fermentación. Sin secreción, puede efectuarse alternativamente el aislamiento de la proteína desde la célula anfitriona, es decir una purificación de la misma de la masa celular, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato de amonio o etanol o mediante purificación cromatográfica.

- 5
- 10 Otro objeto de la invención es un microorganismo que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas procedimentales:

(a) introducir un constructo de expresión en un microorganismo que comprende un promotor y un ácido nucleico que codifica para la proteína;

(b) expresar la proteína en el microorganismo,

- 15 en cuyo caso el microorganismo pertenece a la especie *Bacillus pumilus*.

En consecuencia, estos son todos los microorganismos que pueden ser objeto de un procedimiento según la invención. Todos los hechos, objetos y formas de realización que se describen para los procedimientos según la invención también pueden aplicarse a este objeto de la invención. Por lo tanto, en este sitio se hace referencia expresamente a la divulgación, con la indicación de que esta divulgación también se aplica para los microorganismos según la invención.

- 20

Formas particularmente preferidas de realización de microorganismos según la invención se caracterizan porque

(a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de

(i) secuencia de ácido nucleico, la cual es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 1 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

- 25

(ii) secuencia de ácido nucleico, la cual es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 2 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %,

- 30

(iii) secuencia de ácido nucleico, la cual es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 3 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

- 35

(iv) secuencia de ácido nucleico, la cual es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 4 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %,

- 40

y/o

(b) la proteína no está presente de manera natural en el organismo, y/o

- 45
- 50 (c) la proteína es una enzima, principalmente una celulasa ácida, alfa-amilasa, alfa-acetodecarboxilasa, aminopetidasa, amilasa, arabanasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, beta-manosidasa, carragenasa, carbohidrasa, catalasa, celobiosa-oxidasa, celulasa, quimosina, endo-1,3-beta-glucanasa, endo-1,3(4)-beta-glucanasa, endo-1,4-beta-xilanasasa, endopeptidasa, esterasa, exopeptidasa, G4-amilasa, glucoamilasa, glucoseoxidasa, glucosidasa, glicolipasa, hemicelulasa, lacasa, lipasa, lisofosfolipasa, amilasa maltogénica, mananasa, proteasa neutra, nucleasa, oxidasa, oxidoreductasa, pectato liasa, pectinasa, pectina esterasa, pentosanasa, perhidrolasa, fosfolipasa, fitasa, poligalacturonasa, proteasa, proteinasa, pululanasa, enzima de Rennet (cuajo), rhamnogalacturonasa, subtilisina, tanasa, transferasa, transglutaminasa, xantanasa, xilanasasa, xiloglucanasa, preferiblemente proteasa o alfa-amilasa, o mezclas de las mismas, y/o

(d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

(e) el microorganismo se inhibe para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo, y/o

(f) el microorganismo está genéticamente modificado.

5 Una forma muy particularmente preferida de microorganismos según la invención se caracteriza porque

(a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de

10 (i) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 1 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

15 (ii) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 2 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %,

y/o

(b) la proteína no está presente de manera natural en el microorganismo, y/o

(c) la proteína es una proteasa, preferiblemente una subtilisina, o una alfa-amilasa y/o

(d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

20 (e) el microorganismo está inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo, y/o

(f) el microorganismo está genéticamente modificado.

Otra forma muy particularmente preferida de realización de los microorganismos según la invención se caracteriza porque

25 (a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de

30 (i) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 1 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

(ii) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 2 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %,

35 (iii) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 3 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

40 (iv) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 4 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %,

45 y/o

(b) la proteína no se encuentra presente de manera natural en el microorganismo, y/o

(c) la proteína es una alfa-amilasa

y/o

(d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

(e) el microorganismo está inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo, y/o

(f) el microorganismo está genéticamente modificado.

5 Una forma particularmente preferida en la más alta medida de realización de los microorganismos según la invención se caracteriza porque

10 (a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 3 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

y/o

(b) la proteína no se encuentra presente de manera natural microorganismo, y/o

(c) la proteína es una alfa-amilasa

15 y/o

(d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

(e) el microorganismo es inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo, y/o

(f) el microorganismo está genéticamente modificado.

20 Otra forma particularmente preferida en la más alta medida de realización de los microorganismos según la invención se caracteriza porque

25 (a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 1 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

y/o

(b) la proteína no se encuentra de manera natural en el microorganismo, y/o

(c) la proteína es una alfa-amilasa

30 y/o

(d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

(e) el microorganismo está inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo, y/o

(f) el microorganismo está genéticamente modificado.

35 Una forma de realización particularmente preferida en la más alta medida de los microorganismos según la invención se caracteriza porque

40 (a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO: 2 en al menos 80 % y de manera cada vez más preferida en al menos 81,0 %, 82,0 %, 83,0 %, 84,0 %, 85,0 %, 86,0 %, 87,0 %, 88,0 %, 89,0 %, 90,0 %, 91,0 %, 92,0 %, 93,0 %, 94,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 %, 98,0 %, 99,0 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 % y de modo muy particularmente preferido en 100 %;

y/o

(b) la proteína no se encuentra de manera natural este microorganismo, y/o

(c) la proteína es una alfa-amilasa

45 y/o

(d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

(e) el microorganismo está inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo, y/o

(f) el microorganismo está genéticamente modificado.

5 En procedimientos según la invención se usan ventajosamente microorganismos según la invención para preparar una proteína. Por consiguiente, de manera consecuente otro objeto de la invención es el uso de un microorganismo según la invención para la preparación de una proteína, principalmente una enzima.

10 Todos los hechos, objetos y formas de realización que se describen para procedimientos y microorganismo según la invención también son aplicables a este objeto de la invención. Por lo tanto, en este sitio se hace referencia expresamente a la divulgación en el sitio correspondiente con la indicación de que esta divulgación también aplica para los usos según la invención.

Ejemplos

15 Todas las etapas de operación de biología molecular siguen los procedimientos estándar como se indican, por ejemplo, en el Manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, u obras especializadas comparables. Las enzimas, los kits y los aparatos fueron empleados según las indicaciones del fabricante respectivo.

Ejemplo 1:

Comparación de la producción fermentativa de una proteasa (proteína objetivo) con *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis*

20 Tres plásmidos de expresión diferentes como se indican a continuación, que comprenden respectivamente un gen que codifica para una proteasa (proteína objetivo), así como un promotor funcional, fueron transformados tanto en una cepa de *Bacillus licheniformis*, como también en una cepa de *Bacillus pumilus*. Las cepas transformadas fueron usadas para la producción fermentativa de proteasa. La cepa usada de *Bacillus licheniformis* se divulga en la solicitud internacional de patente WO 91/02792. Como cepa de *Bacillus pumilus* fue usado *Bacillus pumilus* DSM 14395 en el cual el gen *spoIV* (*yqfD*) fue desactivado funcionalmente mediante una delección. Como promotores sirvieron las secuencias de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. El promotor se encuentra dispuesto en los plásmidos respectivo de expresión, respectivamente en dirección 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteasa. Fueron usados los siguientes plásmidos (tabla 1):

Tabla 1:

Plásmido No.	Promotor	Gen-proteasa
1	SEQ ID NO: 1	que codifica para la variante F49 según WO 95/23221
2	SEQ ID NO: 1	que codifica para la variante F49 según WO 95/23221
3	SEQ ID NO: 2	que codifica para la variante F49 según WO 95/23221

30 Después de la transformación de los plásmidos de expresión en los microorganismos respectivos fueron usadas las cepas de producción resultantes en un procedimiento de fermentación estándar en un fermentador de laboratorio de 2 l (48 horas de duración del cultivo) y las actividades de proteasa obtenidas fueron determinadas por la liberación del cromóforo de para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Fe-p nitroanilida (AAPF). La proteasa disocia el sustrato y libera pNA. La liberación del pNA causa un aumento de la extinción a 410 nm, cuyo transcurso en el tiempo es una medida de la actividad enzimática (cf. Del Mar et al., 1979). La medición se efectúa a una temperatura de 25°C, a pH 8,6, y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición es de 5 minutos y el intervalo de medición es de 20 segundos a 60 segundos.

40 Comparado con *Bacillus licheniformis*, el rendimiento se incrementa ostensiblemente con *Bacillus pumilus* como organismo de producción (cf. Tabla 2). Se indican las actividades de proteasa medidas relativas para *Bacillus pumilus*, las cuales son referidas a la actividad respectivamente obtenida de proteasa para *Bacillus licheniformis* la cual fue definida como 100 %.

Tabla 2:

Plásmido No.	Actividad relativa de proteasa (%)
1	114

(continuación)

Plásmido No.	Actividad relativa de proteasa (%)
2	134
3	150

Ejemplo 2:

En este ejemplo fue investigada la producción fermentativa de una proteasa (proteína objetivo) en *Bacillus pumilus* con constructos de expresión que comprendían diferentes promotores. Fueron usados los plásmidos de expresión 1 y 3 con promotores según SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2, tal como se describe en el ejemplo 1. Como otro plásmido de expresión (control) fue usado un plásmido de expresión que se diferencia de los plásmidos 1 y 3 en que en lugar de un promotor de *Bacillus pumilus* fue usado un promotor de *Bacillus licheniformis*, el cual se divulga en la solicitud internacional de patente WO 91/02792 ("promotor of the ATCC 53926 alkaline protease gene"; cf. ejemplos 5, 6 y la figura 27 de WO 91/02792). Como cepa de *Bacillus pumilus*, tal como en el ejemplo 1 fue usado *Bacillus pumilus* DSM 14395, en el cual fue desactivado funcionalmente el gen *spoIV* (*yqfD*) mediante una delección.

Esta cepa fue transformada con los plásmidos de expresión mencionados. Las cepas de producción resultantes fueron empleadas en un procedimiento de fermentación estándar en un fermentador de laboratorio de 2 l y las actividades de proteasa obtenidas fueron determinadas mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-LAla-L-Ala-L-Pro-L-Fe-p-nitroanilida (AAPF), tal como se describe en el ejemplo 1. Comparado con la cepa de control, el rendimiento con los plásmidos 1 y 3 aumentó ostensiblemente (cf. tabla 3). Se indican las actividades de proteasa medidas relativas para las cepas que contenían los plásmidos 1 y 3, las cuales se refieren a la actividad de proteasa para la cepa de control, que fue definida como 100 %.

Tabla 3:

Plásmido No.	Actividad relativa de proteasa (%)
Control	100
1	133
3	131

Ejemplo 3:

Dos plásmidos de expresión diferentes, como se indican más adelante, que comprenden respectivamente un gen que codifica para una amilasa (proteína objetivo), así como un promotor funcional, fueron transformados tanto en una cepa de *Bacillus licheniformis*, como también en una cepa de *Bacillus pumilus*. Las cepas transformadas fueron usadas para la producción fermentativa de amilasa. La cepa de *Bacillus licheniformis* que fue usada se divulga en la solicitud internacional de patente WO 91/02792. Como cepa de *Bacillus pumilus* fue usado *Bacillus pumilus* DSM 14395, en la cual fue desactivado funcionalmente el gen *spoIV* (*yqfD*) mediante una delección. Como promotores sirvieron secuencias de ácido nucleico según SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (promotor de amilasa de *Bacillus amiloliquefaciens*, tal como se divulga en Palva, I., Pettersson, R.F., Kalkkinen, N., Lehtovaara, P., Sarvas, M., Soly, H., Takkinen, K. and Kaariainen, L. "Nucleotide sequence of the promoter and NH2-terminal signal peptide region of the alpha-amylase gene from *Bacillus amiloliquefaciens*"; Gene 15 (1), 43-51 (1981)). El promotor se encuentra dispuesto en los respectivos plásmidos de expresión respectivamente en la dirección 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la amilasa. Fueron usados los siguientes plásmidos (tabla 4):

Tabla 4:

Plásmido No.	Promotor	Gen-amilasa
4	SEQ ID NO. 3	Que codifica para la proteína según Seq ID No: 2 de EP1307547 A2
5	SEQ ID NO. 4	Que codifica para la proteína según Seq ID No: 2 de EP1307547 A2
6	SEQ ID NO. 1	Que codifica para la proteína según Seq ID No: 2 de EP1307547 A2
7	SEQ ID NO. 2	Que codifica para la proteína según Seq ID No: 2 de EP1307547 A2

Después de la transformación de los plásmidos de expresión en los respectivos microorganismos, las cepas de producción resultantes se emplearon en un procedimiento de fermentación estándar en un fermentador de laboratorio de 2 l (duración de 48 horas del cultivo) y las actividades de amilasa obtenidas fueron determinadas.

5 Para la determinación de la actividad amilolítica en TAU se usa un p-nitrofenilmaltoheptaosido modificado, cuya
 unidad de glucosa extrema se bloquea por medio de un grupo de bencilideno; éste se disocia por amilasa para
 obtener oligosacárido libre de p- nitrofenilo, el cual por su parte es convertido en glucosa y p-nitrofenol por medio de
 la enzima auxiliar glucoamilasa y alfa-glucosidasa. Por lo tanto, la cantidad de p-nitrofenol liberado es proporcional a
 la actividad de amilasa. La medición se efectúa, por ejemplo, con el kit de ensayo Quick-Start® de la compañía
 10 Abbott, Abott Park, Illinois, Estados Unidos de América. El aumento de absorción (405 nm) en el lote de prueba se
 detecta por medio de un fotómetro a 37 °C durante 3 minutos frente a un valor blanco. La calibración se efectúa por
 medio de un estándar de enzima de actividad conocida (por ejemplo, Maxamil®/Purastar® 2900 de la compañía
 Genencor con 2900 TAU/g). La evaluación se efectúa por medio de trazado de la diferencia de absorción dE (405
 nm) por minuto frente a la concentración de la enzima del estándar.

En la tabla 5 se indican las actividades de amilasa medidas relativas para *Bacillus pumilus*, las cuales están referidas
 a la actividad de amilasa para *Bacillus licheniformis*, obtenida con el plásmido 4 (promotor según SEQ ID NO: 3), la
 cual fue definida como 100 %.

Tabla 5:

Plásmido No.	Actividad relativa de amilasa (%) en <i>B. licheniformis</i>	Actividad relativa de amilasa (%) en <i>B. pumilus</i>
4	100 %	376 %
5	No determinada	212 %

15 De manera sorprendente se encontró que el promotor según SEQ ID NO: 3 en *B. pumilus* (que de manera natural no
 produce amilasa propia) es particularmente adecuado para lograr un rendimiento muy alto de amilasa expresada de
 manera heteróloga.

Ejemplo 4:

20 En este ejemplo fue estudiada la producción fermentativa de una amilasa (proteína objetivo) en *Bacillus pumilus* con
 constructos de expresión que comprendían diferentes promotores. Fueron usados los plásmidos de expresión 4, 6 y
 7 con promotores según SEQ ID NO. 3, 1 y SEQ ID NO: 2, tal como se describen en el ejemplo 3. Como cepa de
Bacillus pumilus, tal como en el ejemplo 1, fue usado *Bacillus pumilus* DSM 14395, en el cual fue desactivado
 funcionalmente el gen *spoV* (*yqfD*) mediante una delección. Esta cepa fue transformada con los plásmidos de
 25 expresión mencionados. Las cepas de producción resultantes fueron empleadas en un procedimiento de
 fermentación estándar en un fermentador de laboratorio de 2 l y fueron determinadas las actividades de amilasa, tal
 como se describe en el ejemplo 3.

En la tabla 6 se indican las actividades de amilasa medidas relativas para las cepas antes mencionadas de *B.*
pumilus que contenían los plásmidos 4, 6 y 7, las cuales son referidas a la actividad de amilasa para la cepa de *B.*
pumilus que contenía plásmido 4, la cual fue definida como 100 %.

30 Comparado con el plásmido 4 (véase tabla 5), ya particularmente adecuado para la expresión heteróloga de amilasa
 en *B. pumilus*, con el plásmido 7 pudo lograrse un rendimiento similarmente alto y con el plásmido 6 pudo lograrse
 un rendimiento de amilasa incluso todavía ostensiblemente mejorada (véase tabla 6).

Tabla 6:

Plásmido No.	Actividad relativa de amilasa (%)
4	100
6	112
7	101

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de una proteína por parte de un microorganismo, el cual comprende las etapas procedimentales de
- 5 (a) introducir un constructo de expresión en un microorganismo, que comprende un promotor y un ácido nucleico que codifica para la proteína;
- (b) expresar la proteína en el microorganismo,
- en donde el microorganismo pertenece a la especie *Bacillus pumilus* y el microorganismo es inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se secreta la proteína.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de
- (a) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 1 en al menos un 80 %;
- 15 (b) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 2 en al menos un 80 %;
- (c) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 3 en al menos un 80 %;
- 20 (d) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 4 en al menos un 80 %.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la proteína no está presente de manera natural en el microorganismo.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la proteína es una enzima, principalmente una celulasa ácida, alfa-amilasa, alfa-acetodecarboxilasa, aminopetidasa, amilasa, arabanasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, beta-manosidasa, carragenasa, carbohidrasa, catalasa, celobiosa-oxidasa, celulasa, quimosina, endo-1,3-beta-glucanasa, endo-1,3(4)-beta-glucanasa, endo-1,4-beta-xilanasa, endopeptidasa, esterasa, exopeptidasa, G4-amilasa, glucoamilasa, glucooxidasa, glucosidasa, glicolipasa, hemicelulasa, lacasa, lipasa, lisfosfolipasa, amilasa maltogénica, mananasa, proteasa neutra, nucleasa, oxidasa, oxidorreductasa, pectato liasa, pectinasa, pectina esterasa, pentosanasa, perhidrolasa, fosfolipasa, fitasa, poligalacturonasa, proteasa, proteínaasa, pululanasa, enzima de Rennet, rhamnogalacturonasa, subtilisina, tanasa, transferasa, transglutaminasa, xantanasa, xilanasa, xiloglucanasa o mezclas de las mismas, de modo particularmente preferido alfa-amilasa y/o proteasa.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el microorganismo está genéticamente modificado.
- 35 8. Microorganismo que contiene un constructo de expresión que comprende un promotor y un ácido nucleico que codifica para la proteína; en donde el microorganismo pertenece a la especie *Bacillus pumilus* y el microorganismo es inhibido para esporulación, de preferencia mediante una modificación del gen *spoIV* (*yqfD*), principalmente mediante una delección del gen *spoIV* (*yqfD*) o partes del mismo y en donde el microorganismo expresa la proteína.
- 40 9. Microorganismo según la reivindicación 8, **caracterizado porque** la proteína se secreta.
10. Microorganismo según las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado porque**
- (a) el promotor comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de
- (i) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 1 en al menos un 80 %;
- 45 (ii) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 2 en al menos un 80 %;
- (iii) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 3 en al menos un 80 %;

(iv) secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO. 4 en al menos un 80 %;

y/o

(b) la proteína no se encuentra presente de manera natural en el microorganismo, y/o

- 5 (c) la proteína es una enzima, principalmente una celulasa ácida, alfa-amilasa, alfa-acetodecarboxilasa, aminopetidasa, amilasa, arabanasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, beta-Mannosidasa, carragenasa, carbohidrasa, catalasa, celobiosa-oxidasa, celulasa, quimosina, endo-1,3-beta-glucanasa, endo-1,3(4)-beta-glucanasa, endo-1,4-beta-xilanasasa, endopeptidasa, esterasa, exopeptidasa, G4-amilasa, glucoamilasa, glucooxidasa, glucosidasa, glicolipasa, hemicelulasa, lacasa, lipasa, lisfosfolipasa, amilasa maltogénica, mananasa, proteasa neutra, nucleasa, oxidasa, oxidorreductasa, pectato liasa, pectinasa, pectinesterasa, pentosanasa, perhidrolasa, fosfolipasa, fitasa, poligalacturonasa, proteasa, proteinasa, pululanasa, enzima de Rennet, rhamnogalacturonasa, subtilisina, tanasa, transferasa, transglutaminasa, xantanasa, xilanasasa, xiloglucanasa, principalmente proteasa o alfa-amilasa, o mezclas de estas
- 10

y/o

- 15 (d) el microorganismo es *Bacillus pumilus* DSM 14395, y/o

(e) el microorganismo está genéticamente modificado.

11. Uso de un microorganismo según una de las reivindicaciones 8 a 10 para la producción de una proteína, principalmente una enzima.