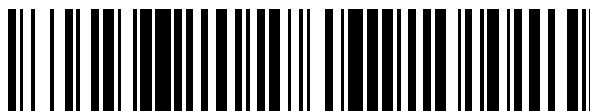


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 648**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2016 PCT/EP2016/080261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17102543**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2016 E 16819009 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3390628**

54 Título: **Pectinasas independientes del calcio con termoestabilidad mejorada**

30 Prioridad:

15.12.2015 EP 15200249

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

27.04.2021

73 Titular/es:

**METGEN OY (100.0%)
Rakentajantie 26
20780 Kaarina, FI**

72 Inventor/es:

**BIRIKH, KLARA y
SUONPÄÄ, ANU MINNA MAARET**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 821 648 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

Pectinasas independientes del calcio con termoestabilidad mejorada

Campo de la invención

- 5 La invención está en el campo de la química de las proteínas, en particular en el campo de la enzimología. Proporciona pectinasas, es decir, polipéptidos con propiedades de degradación de pectinas. En particular, la invención proporciona polipéptidos con actividad de pectato liasa (EC 4.2.2.2). Las enzimas según la invención tienen propiedades mejoradas, tales como termoestabilidad mejorada y reducida dependencia del calcio.

Antecedentes de la invención

- 10 Las enzimas de degradación de la pared celular de las plantas son enzimas activas para hidratos de carbono que se han clasificado en diferentes familias basándose en criterios de homología [http:// www.cazy.org/, Cantarel et al., 2009, Nucleic Acids Res 37: D233-D238].

- 15 Las pectato liasas (EC 4.2.2.2) son un grupo importante de enzimas de degradación de la pared celular de las plantas. Escinden pectina usando una escisión eliminativa de (1->4)-alfa-D-galacturonano dando oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. Se producen principalmente por patógenos de las plantas y organismos asociados a las plantas, y solo raramente por los animales. Las pectato liasas también se producen comúnmente en bacterias, ya sea por bacterias que viven en estrecha proximidad con las plantas o por bacterias intestinales que encuentran el material de planta en el tubo digestivo de sus hospedadores. [Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., Environmental Microbiology reports (2014) doi 10, 1111/1758-2229, 12166].

- 20 Las pectato liasas favorecen el pectado, el anión, con respecto a la pectina, el éster metilado, que es el sustrato preferido de la pectina liasa EC 4.2.2.10. Las pectato liasas también se conocen con diferentes nombres, tales como ácido alfa-1,4-D-endopoligalacturónico liasa, ácido endo-alfa-1,4-poligalacturónico liasa, endogalacturonato transeliminasa, endopectina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, ácido péptico liasa, ácido péptico transeliminasa, liasa péptica, pectina trans-eliminasa, PGA liasa, poligalacturonato liasa, ácido poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico trans-eliminasa, transeliminasa poligalacturónica y PPasa-N.

- 25 Cuando las pectato liasas se usan en procesos industriales es frecuentemente ventajoso que sean estables a temperaturas más altas (termoestables) y resistentes a condiciones alcalinas. Las pectato liasas alcalinas termostables tienen, por ejemplo, posibles aplicaciones en la industria textil como alternativa a los procesos de desengomado de ramio basado en productos químicos. Dichas enzimas se han descrito, y han sido aisladas y caracterizadas, de fuentes bacterianas, principalmente *Bacillus* [Swarupa Rani Chiliveri et al., Carbohydrate Polymers (2014), 111: 264-272, Zhou et al., Appl Environ Microbiol (2015) 81: 5714-5723].

- 30 La escisión por pectato liasas requiere la presencia de cationes, tales como iones manganeso, níquel, hierro, cobalto o calcio [Celia Marin-Rodriguez et al., J. Exp. Bot. (2002) 53: 2115-2119, Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., Environmental Microbiology reports (2014) doi 10, 1111/1758-2229, 12166], con solo raras excepciones [Kazemi-Pour et al., Proteomics (2004) 10: 3177-3186].

- 35 Recientemente, se aisló otra pectato liasa termostable dependiente del calcio de *Bacillus*, se clonó, se secuenció y se caracterizó [Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000) 64: 2360-2367, Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2001) 65: 322-329].

- 40 Aunque estas enzimas son útiles en una amplia variedad de procesos industriales, pueden ser menos aptas para procesos multienzimáticos, debido a su dependencia del calcio, puesto que los iones calcio pueden interferir con el mecanismo de trabajo de otras enzimas. Lo más en particular, en un proceso en donde se degrada biomasa a glucosa mediante una variedad de enzimas hidrolíticas que incluyen pectato liasa, los iones calcio tendrían que ser completamente retirados antes de que la glucosa se pudiera convertir en fructosa por la glucosa isomerasa, puesto que esta última enzima se inhibe por el calcio [Food Biotechnology, Segunda Edición, Food Science and Technology, Ed. Anthony Pometto, Kalidas Shetty, Gopinadhan Paliyath, Robert E. Levin, ISBN 1420027972, 9781420027976].

- 45 Además, los iones calcio pueden formar sales insolubles con diversos aniones, que pueden provocar problemas con procesos industriales, tales como ultrafiltración y acumulación sobre herramientas.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de polipéptidos mejorados con actividad de pectato liasa.

Sumario de la invención

- 50 La presente invención trata esta necesidad proporcionando una pectato liasa independiente del calcio como se define en las reivindicaciones.

La invención también se refiere a una composición que comprende un polipéptido como se ha descrito anteriormente, un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se ha descrito anteriormente, un vector que comprende dicho ácido nucleico y una composición que comprende dicho ácido nucleico o un vector.

5 La invención también proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico, o un vector como se ha descrito anteriormente.

Además, la invención se refiere a un método de producción de un polipéptido como se ha descrito anteriormente, que comprende las etapas de: cultivar una célula hospedadora recombinante como se ha descrito anteriormente, en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido, y recuperar el polipéptido obtenido, y opcionalmente purificar el polipéptido.

10 Además, la invención se refiere a un polipéptido como se ha descrito anteriormente en una aplicación seleccionada del grupo que consiste en deslignificación de pulpa, degradación o disminución de la integridad estructural de material lignocelulósico, blanqueo de colorantes textiles, desintoxicación de aguas residuales, desintoxicación xenobiótica, producción de un azúcar de un material lignocelulósico y recuperación de celulosa de una biomasa.

15 La invención también se refiere a un método de mejora de la termoestabilidad de un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica al aminoácido según SEQ ID NO: 1, comprendiendo el método la etapa de cambiar el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina.

20 La invención también se refiere a un método de disminución, supresión o retirada de la dependencia del calcio de un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica al aminoácido según SEQ ID NO: 1, comprendiendo el método la etapa de cambiar el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina.

Leyenda de las figuras

25 Figura 1: Diagrama que muestra la actividad relativa de la pectato liasa de polipéptidos según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Se determinó la actividad de pectato liasa en presencia y ausencia de iones calcio según el método descrito en el Ejemplo 7. Mientras que la secuencia no mutante según SEQ ID NO: 1 era dependiente del calcio, los polipéptidos mutados que llevan la mutación A231L (SEQ ID NOs: 4 - 6) fueron independientes del calcio.

30 Figura 2: Termoestabilidad de polipéptidos según SEQ ID NO: 1 - 6. Diagrama que muestra la actividad relativa de la pectato liasa de los polipéptidos sin la mutación A231L (SEQ ID NO: 1, 2 y 3) y la actividad relativa de la pectato liasa de polipéptidos con la mutación A231L (SEQ ID NOs: 4, 5 y 6) después de una pre-incubación de 10 minutos a temperaturas elevadas. TA = Temperatura ambiente, 70 °C es 70 grados Celsius.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se basa en la observación de los presentes inventores de que una sustitución de un único aminoácido en una posición correspondiente a la posición de aminoácido 231 en SEQ ID NO: 1 (variante A231L) en diferentes pectato liasas disminuye o suprime la dependencia del calcio de la enzima. Los presentes inventores también encontraron que la variante A231L retuvo su actividad de pectato liasa.

Como se usa en el presente documento, el término "variante A231L" indica que el aminoácido correspondiente al resto de alanina en la posición 231 de SEQ ID NO: 1 está sustituido por un resto de leucina.

40 El término "sustitución de aminoácidos" se usa en el presente documento de la misma forma que se usa comúnmente, es decir, el término se refiere a una sustitución de uno o más aminoácidos en una proteína con uno o varios de otros aminoácidos. Dicha sustitución de aminoácidos también se puede denominar una mutación, una variante o una variación.

45 Los presentes inventores observaron el mismo fenómeno en pectato liasas que eran homólogas al polipéptido con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1. Cuando se introdujo una variación de aminoácido A231L en polipéptidos que eran 93 % y 89 % idénticos al polipéptido según SEQ ID NO: 1, esto también disminuyó o suprimió la dependencia del calcio de ambas de estas enzimas.

50 La descripción proporciona un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica al aminoácido según SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un resto de leucina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1. Esto se denomina en el presente documento una variante A231L de SEQ ID NO: 1.

La base de datos UniProt [en línea] con el número de acceso UNIPROT:A0A0C2RPE1 desvela una pectato liasa que tiene 62,8 % de identidad a lo largo de la longitud entera de SEQ ID NO: 1. Tiene un resto de leucina en la posición 231.

5 El documento de patente WO 2008/138109 A1 desvela una pectato liasa de *Bacillus sp.* TS-47, que es idéntica a lo largo de la longitud entera con SEQ ID NO: 1, sin embargo, esta secuencia no tiene un resto de leucina en la posición 235.

Los polipéptidos con actividad de pectato liasa también se denominan en el presente documento pectato liasas, o enzimas pectato liasa.

10 El término "actividad de pectato liasa" se usa en el presente documento para indicar la capacidad de un polipéptido para escindir pectina usando una escisión eliminativa de (1->4)-alfa-D-galacturonano dando oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. Los métodos de medición de esta actividad se conocen bien en la técnica.

15 El término "al menos 70 %" se usa en el presente documento para incluir al menos 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 88 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 % o más, tal como 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 99 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso 100 %.

20 Como se usa en el presente documento, el grado de identidad entre dos o más secuencias de aminoácidos es equivalente a una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias; es decir, el % de identidad = número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones alineadas x 100, excluyendo huecos, que se necesitan introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias, y nucleótidos protuberantes. El alineamiento de dos secuencias se va a realizar a lo largo de la longitud completa de los polipéptidos.

25 La comparación (alineamiento) de secuencias es una tarea rutinaria para el experto y se puede llevar a cabo usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, un software gratuito convencionalmente usado para este fin es la herramienta "Align" en el recurso de NCBI http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TIPO=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2_seq&LINK_LOC=align2seq, También son adecuados para este fin otro software comercial y abierto, tal como Vector NTI,

30 La introducción de una mutación específica en un gen recombinante también está entre las habilidades rutinarias de un biólogo molecular. Se puede obtener orientación específica de Methods in Molecular Biology Vol 182, "In vitro mutagenesis protocols", Eds Jeff Braman, Humana Press 2002. Están comercialmente disponibles kits para realizar mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II XL de N° de catálogo de Agilent Technologies 200521).

35 SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de aminoácidos de un polipéptido conocido [Takao et al, Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000) 64: 2360-2367, Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2001) 65: 322-329] con actividad de pectato liasa. Los presentes inventores sustituyeron el resto de alanina en la posición 231 de SEQ ID NO: 1 con un resto de leucina, obteniendo así un polipéptido según SEQ ID NO: 4. Los presentes inventores encontraron que así aumentaba, disminuía o se suprimía la dependencia del calcio de la actividad de pectato liasa. Esto se denomina adicionalmente en el presente documento "independencia del calcio".

La "independencia del calcio" de una enzima se puede medir según los procedimientos desvelados en los Ejemplos 5 y 7. En ellos se mide la actividad de la pectato liasa en presencia y ausencia de CaCl₂.

40 Se considera que una pectato liasa es independiente del calcio si la actividad de la enzima en ausencia de CaCl₂ no disminuye en más de 20 % en comparación con su actividad en presencia de CaCl₂ 0,5 mM, en las condiciones ejemplificadas en el Ejemplo 5. En una realización preferida, la actividad de la enzima no se reduce en ausencia de CaCl₂. Se considera que la enzima es dependiente del calcio si no es independiente del calcio. Los presentes inventores también encontraron que la posición de aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 se podría cambiar en polipéptidos con una secuencia de aminoácidos homóloga a la secuencia según SEQ ID NO: 1 con el mismo efecto. Los presentes inventores construyeron dos pectato liasas que fueron 93 % (SEQ ID NO: 2) y 89 % (SEQ ID NO: 3) idénticas con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1. También se encontró que estos péptidos homólogos eran dependientes del calcio porque su actividad de pectato liasa disminuyó hasta solo 60 % cuando el calcio se omitió del tampón de reacción (Figura 1).

50 Los presentes inventores observaron que estas dos pectato liasas homólogas se volvieron independientes del calcio cuando el aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 se cambió a un resto de leucina para obtener polipéptidos que comprendían una secuencias de aminoácidos según SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente.

La secuencia no mutada y los polipéptidos homólogos según SEQ ID NO: 2 y SQ ID NO: 3 solo presentaron 60 % de su actividad en ausencia de calcio, es decir, cuando el calcio se omitió del ensayo de actividad. Sin embargo, el polipéptido según SEQ ID NO: 4 y sus polipéptidos homólogos según SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 (los tres que

llevan la mutación A231L) mostraron actividad de pectato liasa plena en ausencia de calcio (100, 105 y 102 %, respectivamente, Figura 1). Se llega a la conclusión de que la actividad de pectato liasa de la mutante depende del calcio, mientras que la actividad de la variante A231Ls no depende del calcio.

La expresión "el aminoácido correspondientes a posición 231 en SEQ ID NO: 1" se debe entender del siguiente modo.

- 5 Si se determina que dicha posición en una secuencia de aminoácidos dada es al menos 70 % idéntica con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, entonces se deben alinear primero las dos secuencias. Esto se puede hacer por métodos rutinarios y software disponible en la técnica. El aminoácido en la secuencia de aminoácidos dada correspondiente al aminoácido 231 en SEQ ID NO: 1 es entonces el aminoácido que se alinea con el resto de alanina en la posición 231 en SEQ ID NO: 1.

- 10 Los presentes inventores realizaron una búsqueda de homología de proteínas homólogas a SEQ ID NO: 1 usando SEQ ID NO: 1 como la secuencia de búsqueda en el software "Standard protein BLAST", disponible en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE-TYPE=BlastSearch&LI_NK_LOC=blasthome. Más información sobre el software y las versiones de la base de datos está disponible en el Centro Nacional para Información Biotecnológica en la Biblioteca Nacional de Medicina en el sitio de internet del Instituto Nacional de Salud
- 15 www.ncbi.nlm.nih.gov. Allí se pueden encontrar varias herramientas de biología molecular que incluyen BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool). BLAST hace uso de las siguientes bases de datos: Todas las traducciones no redundantes de CDS de GenBank + PDB + SwissProt + PIR + PRF excluyendo muestras medioambientales de proyectos de WGS.

- 20 El término "variante de aminoácido", "variante", "mutante" o "variante de secuencia" o equivalente tiene un significado bien reconocido en la técnica y se usa, por consiguiente, en el presente documento para indicar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una diferencia de aminoácidos en comparación con otra secuencia de aminoácidos, tal como la secuencia de aminoácidos de la que se obtuvo.

Sorprendentemente, los presentes inventores también encontraron que la mutación A231L provocó que los polipéptidos tuvieran una termoestabilidad mejorada.

- 25 El término "proteína mutante" o "mutación" también se usa en el presente documento para referirse a un polipéptido con actividad de pectato liasa como se describe en el presente documento, que comprende un resto de leucina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1.

- El término "proteína natural" también se usa en el presente documento para indicar un polipéptido idéntico a la proteína mutante, con la excepción de que no comprende un resto de leucina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1.
- 30

El término "termoestabilidad mejorada" en referencia a un polipéptido mutante, como se usa en el presente documento, significa que el polipéptido mutante tiene una actividad residual de pectato liasa más alta que la proteína natural correspondiente, después de la incubación durante 10 minutos en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 a una temperatura adecuada.

- 35 El término "temperatura adecuada", como se usa en este contexto, se refiere a una temperatura a la que la proteína natural pierde parte de su actividad de pectato liasa después de 10 minutos de incubación en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0. En otras palabras, el término "temperatura adecuada" se refiere a una temperatura elegida de un intervalo de temperatura entre las temperaturas X e Y, en donde X es la temperatura más baja a la que un polipéptido no mutante muestra una pérdida detectable de actividad después de 10 minutos de incubación en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 y en
- 40 donde la temperatura Y es la temperatura más baja a la que un polipéptido no mutante pierde toda la actividad después de 10 minutos de incubación en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0.

- En un ejemplo más concreto, el término "termoestabilidad mejorada" se ejemplifica en que el polipéptido de variante A231L según SEQ ID NO: 4 presentó más actividad de pectato liasa después de la preincubación a temperaturas elevadas que el polipéptido no mutante (SEQ ID NO: 1). Lo mismo se encontró para el polipéptido homólogo según
- 45 SEQ ID NO: 5 en comparación con el mismo polipéptido sin la variante A231L (SEQ ID NO: 2). Por tanto, el polipéptido de variante A231L según SEQ ID NO: 6 era más termotable que su homólogo no variante según SEQ ID NO: 3.

- Con más detalle, los presentes inventores midieron la actividad relativa residual de pectato liasa después del tratamiento térmico de los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y compararon esta actividad con la de un polipéptido pretratado con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. Más específicamente, los polipéptidos se calentaron hasta 70, 75 o 80 grados Celsius durante 10 minutos en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0. La actividad residual se midió a 60 grados Celsius a pH 8,0 como se describe en el Ejemplo 5 y se comparó con la actividad residual de los mismos polipéptidos después de la preincubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.
- 50

Tabla 1: Actividad relativa de la pectato liasa después de la preincubación a temperaturas elevadas.

Temp.	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
TA	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
70 °C	60 %	70 %	50 %	105 %	110 %	100 %
75 °C	1 %	5 %	1 %	20 %	25 %	18 %
80 °C	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %

Los presentes inventores observaron que la actividad de pectato liasa del polipéptido no mutado según SEQ ID NO: 1 disminuyó al 60 % después de la preincubación a 70 grados Celsius durante 10 minutos. Lo mismo se encontró para los polipéptidos homólogos con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 y 3 (70 y 50 %, respectivamente) A diferencia, no se afectó la actividad de las variantes A231L según SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o fue incluso más que para los mismos polipéptidos preincubados a temperatura ambiente.

Los presentes inventores también observaron que, a diferencia de la secuencia no mutada (SEQ ID NO: 1) y sus homólogos según SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, los polipéptidos de variante A231L (SEQ ID NOs: 4 - 6) mostraron todos actividad considerable de pectato liasa después de la preincubación a 75 °C, mientras que la enzima no mutante según SEQ ID NO: 1 y sus homólogos según SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 no mostraron actividad significativa en estas condiciones (5 % o menos).

La enzima no mutante según SEQ ID NO: 1, ni sus homólogos según SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, ni las variantes sobrevivieron al pretratamiento a 80 grados Celsius durante 10 minutos. Esto se representa gráficamente en la Figura 2.

Se ha descrito que las pectato liasas termoestables se producen por bacterias del género *Bacillus* [Takao et al, Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000) 64: 2360-2367, Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2001) 65: 322-329, Swarupa Rani Chiliveri et al., Carbohydrate Polymers (2014), 111: 264-272, Zhou et al., Appl Environ Microbiol (2015) 81: 5714-5723], por tanto, la descripción proporciona un polipéptido como se describe en el presente documento en donde el polipéptido es capaz de ser expresado en una especie de *Bacillus*, más preferentemente *Bacillus subtilis*.

Los presentes inventores han mostrado que se pueden producir varios polipéptidos que son homólogos a la secuencia no mutante según SEQ ID NO: 1 y todavía retener su actividad de pectato liasa. Una búsqueda de BLAST reveló que las pectato liasas están disponibles de origen bacteriano, en particular de especies de *Bacillus*, con una identidad de tan solo 52 % o menos en comparación con SEQ ID NO: 1. Por tanto, el experto no tendrá dificultad en construir un polipéptido con actividad de pectato liasa que sea al menos 70 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 1 siguiendo los procedimientos y la orientación proporcionada en el presente documento. También será capaz de preparar las variantes A231L como se describe en el presente documento, obteniendo así una pectato liasa independiente del calcio con una termoestabilidad mejorada.

En el presente documento se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica al aminoácido según SEQ ID NO: 1, tal como 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 %.

La recuperación de un polipéptido como se produjo por una célula hospedadora como se describe en el presente documento se puede realizar por cualquier técnica conocida para los expertos en la técnica. Las posibles técnicas incluyen, pero no se limitan a, secreción de la proteína en el medio de expresión y purificación de la proteína de biomasa celular. El método de producción puede comprender además una etapa de purificar el polipéptido obtenido. Para polipéptidos termoestables, los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen calentar las células disgregadas y retirar las proteínas termolábiles coaguladas de la disolución. Para proteínas secretadas, los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración del medio de expresión. Se prefiere que el método de purificación de elección sea tal que la proteína purificada retenga su actividad.

Por consiguiente, la descripción proporciona además un polipéptido en donde el polipéptido es un polipéptido aislado.

Los presentes inventores han mostrado en el presente documento que las variantes A231L como se describen son independientes del calcio y tienen una termoestabilidad mejorada.

Los polipéptidos como se describe en el presente documento se pueden usar en composiciones que contienen varios componentes adicionales, tales como estabilizadores, cargas, residuo celular, medio de cultivo, etcétera. Por tanto, la divulgación proporciona una composición que comprende un polipéptido como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos como se describe en el presente documento se pueden obtener expresando un ADN recombinante en un sistema de expresión heterólogo. El término "sistema de expresión heterólogo" o equivalente significa un sistema para expresar una secuencia de ADN de un organismo hospedador en un organismo receptor de una especie diferente o género del organismo hospedador. Los receptores más predominantes, conocidos como sistemas de expresión heterólogos, se eligen normalmente debido a que es fácil transferir ADN dentro de ellos o debido a que permiten una evaluación más simple de la función de las proteínas. Los sistemas de expresión heterólogos también se usan preferentemente debido a que permiten el aumento de escala de la producción de una proteína codificada por la secuencia de ADN en un proceso industrial. Los organismos receptores preferidos para su uso como sistemas de expresión heterólogos incluyen organismos bacterianos, fúngicos y de levadura, tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, hongos filamentosos y muchos más sistemas bien conocidos en la técnica.

Los polipéptidos o proteínas presentemente desvelados se pueden fusionar con secuencias adicionales, por unión o inserción, que incluyen, pero no se limitan a, marcas de afinidad, que facilitan la purificación de proteínas (marca S, dominio de unión a maltosa, dominio de unión a quitina), dominios o secuencias que ayudan en el plegamiento (tales como dominio de tiorredoxina, proteína SUMO), secuencias que afectan la localización de proteínas (señales de localización periplásmica, etc.), proteínas que llevan función adicional, tales como proteína verde fluorescente (GFP), o secuencias que representan otra actividad enzimática. Los expertos en la técnica conocen otros componentes de fusión adecuados para los polipéptidos presentemente desvelados.

La presente descripción proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de las variantes de pectato liasa desveladas en el presente documento. Se conocen bien en la técnica los medios y métodos para la clonación y el aislamiento de dichos polinucleótidos.

Además, la presente divulgación se refiere a un vector que comprende un polinucleótido como se describe en el presente documento, opcionalmente operativamente unido a una o más secuencias de control. Las secuencias de control adecuadas están fácilmente disponibles en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, conductoras, de poliadenilación y señal.

Las variantes de pectato liasa como se describen en el presente documento se pueden obtener por métodos recombinantes convencionales conocidos en la técnica. Brevemente, dicho método puede comprender las etapas de: cultivar una célula hospedadora recombinante como se ha descrito anteriormente en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido, y recuperar el polipéptido obtenido. Opcionalmente, el polipéptido se puede purificar adicionalmente.

Se puede usar un gran número de sistemas vector-hospedador conocidos en la técnica para la producción recombinante de las pectato liasas que se describen en el presente documento. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados que se mantienen en la célula hospedadora como molécula de ADN autónoma o integrada en ADN genómico. El sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada como se conoce bien en la técnica. Los ejemplos no limitantes de células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias (por ejemplo, *E. coli*, bacilos), levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*), hongos (por ejemplo, hongos filamentosos), células de insecto (por ejemplo, Sf9).

En aún otros términos, la descripción proporciona un método de mejora de la termoestabilidad de un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica al aminoácido según SEQ ID NO: 1, comprendiendo el método la etapa de cambiar el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina.

La descripción proporciona además un método de disminución, supresión o retirada de la dependencia del calcio de un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica al aminoácido según SEQ ID NO: 1, comprendiendo el método la etapa de cambiar el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina.

Los polipéptidos con actividad de pectato liasa como se describen en el presente documento se pueden usar en una amplia variedad de procesos y aplicaciones industrial diferentes, tales como recuperación de celulosa de biomasa lignocelulósica, disminución de la energía requerida para el refinado de la madera y la producción de un azúcar a partir de un material lignocelulósico. También se puede usar en la preparación de pulpa de madera, en la designificación de pulpa, el blanqueo de colorantes textiles, la desintoxicación de aguas residuales, la desintoxicación xenobiótica, la degradación o disminución de la integridad estructural del material lignocelulósico y la fabricación de detergentes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un polipéptido según SEQ ID NO: 1.

Se optimizó la construcción de ADN desvelada en Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2001) 65: 322-329 que codifica el polipéptido según SEQ ID NO: 1 para la expresión en *E. coli* y se sintetizó comercialmente y se clonó en un vector plasmídico convencional pET28a+ bajo el control del promotor de la ARN-polimerasa T7 para la expresión en *Escherichia coli* BL21(DE3). La secuencia de nucleótidos de la construcción se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 7

Ejemplo 2: Preparación de variantes de un polipéptido según SEQ ID NO: 1 con actividad de pectato liasa.

Se generaron secuencias de proteínas homólogas (según SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3) por mutagénesis al azar de SEQ ID NOs: 7 y SEQ ID NO: 8 usando PCR propensa a error esencialmente como se describe (Curr Protoc Mol Biol. mayo de 2001; Capítulo 8: Unidad 8.3. doi: 10.1002/0471142727.mb0803s51, Random mutagenesis by PCR. Wilson DS1, Keefe AD) usando un kit de mutagénesis por PCR al azar comercial (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® II XL por Agilent Technologies). Más en particular, la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 8 se obtuvo de SEQ ID NO: 7 que codifica el polipéptido según SEQ ID NO: 1. La secuencia de ADN de SEQ ID NO: 9 se obtuvo por mutagénesis al azar de SEQ ID NO: 8 que codifica el polipéptido según SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 9 es la secuencia de ADN que codifica el polipéptido según SEQ ID NO: 3.

Se clonaron fragmentos de PCR resultantes de PCR propensa a error con el vector plasmídico pET28a+ bajo el control del promotor de la ARN-polimerasa T7 para la expresión en *Escherichia coli* BL21(DE3), y se cribaron para la actividad de pectato liasa de las proteínas recombinantes.

Se sometieron clones activos a rondas de aleatorización adicionales usando el mismo protocolo. El polipéptido según SEQ ID NO: 2 presentó actividad de pectato liasa y se encontró que era 93 % idéntico a SEQ ID NO: 1. El polipéptido según SEQ ID NO: 3 también presentó actividad de pectato liasa y se encontró que era 89 % idéntico a SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 3: Preparación de polipéptidos de variante A231L según SEQ ID NO: 4 - 6.

Para preparar un polipéptido según SEQ ID NO: 4, se introdujo una mutación en el polipéptido según SEQ ID NO: 1 en la posición 231. Se sustituyó el resto de alanina de esa posición en SEQ ID NO: 1 por un resto de leucina. Este cambio se denomina en el presente documento A231L.

Esto se logró por mutagénesis dirigida al sitio convencional esencialmente como se describe en el documento de patente WO 2013/038062. Con más detalle: Para introducir la mutación A231L en el gen que codifica SEQ ID NO: 1, los presentes inventores llevaron a cabo dos reacciones de PCR separadas:

(1) con cebadores Cebador 1 gaaattaatacgcactactatagg (SEQ ID NO: 13) y Cebador 2(A231L) GCCATCATGCTGCTGAAACGGACGACCAAAATAGGTG (SEQ ID NO: 14),

(2) con Cebador 3(A231L) GGTCGTCCGTTTCAGCAGCATGATGGCctgCTGGATATC (SEQ ID NO: 15) y Cebador 4 ggttatgctagtattgctcagcggtg (SEQ ID NO: 16).

En ambas reacciones, se usó como molde el gen recombinante sin la mutación. Los cebadores 1 y 4 se unen dentro de la secuencia del vector y no son específicos del gen recombinante. Los cebadores 2 y 3 se unen dentro del gen recombinante y superponen sus sitios de unión. El sitio de unión del cebador 3 contiene el sitio de mutación. El cebador 3 representa la secuencia mutada (deseada), que no se corresponde al 100 % con el molde (la letra minúscula en la primera secuencia indica los nucleótidos erróneamente apareados). Sin embargo, el cebador tiene afinidad y especificidad suficientes por el sitio de unión para producir el producto de PCR deseado. Se combinaron los productos de PCR purificados de las reacciones (1) y (2) y se usaron como molde para la reacción de PCR con el cebador 1 y el cebador 4. El producto de esta reacción, que contiene la secuencia de variante del gen que codifica el polipéptido según SEQ ID NO: 4, se clonó en un vector plasmídico para la expresión en *E. coli*.

Se usaron el mismo protocolo y los mismos cebadores para introducir la mutación A231L en los genes que codifican el polipéptido según SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, dando así polipéptidos según SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Ejemplo 4: Expresión heteróloga de polipéptidos con actividad de pectato liasa.

Para la expresión recombinante en *E. coli*, se clonaron genes recombinantes en el vector de expresión pET-28 comercial bajo el control del promotor de bacteriófago T7.

Se llevó a cabo la producción de proteínas en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) según el protocolo de plásmidos del fabricante disponible en <http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>. La temperatura de incubación para la producción de proteínas fue 30 °C, que se encontró óptima para el rendimiento máximo de la

proteína activa. Las células se lisaron usando tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, 1 % de Triton X100, CaCl 0,5 mM) y se calentaron a 60 °C durante 20 minutos. Se retiró el residuo celular coagulado por centrifugación. Se detectaron las pectato liasas recombinantes termoestables en la fracción soluble solo, de acuerdo con la noción de que eran enzimas termoestables.

5 **Ejemplo 5: Ensayo de actividad de pectato liasa**

Se llevó a cabo el ensayo de actividad de pectato liasa esencialmente como se describe en Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T., "Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47". Biosci Biotechnol Biochem. 2000 64:2360-7. Con más detalle, se ensayó la actividad de pectato liasa midiendo el aumento en la absorbancia a 235 nm de la mezcla de reacción. Se usó sal de sodio de ácido poligalacturónico (PGA) de la pectina cítrica desmetilada (comprada de MegaZyme) como sustrato. Se incubó una mezcla de reacción que contenía 1 mL de 0,1 % de PGA en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y CaCl₂ 0,5 mM, y una cantidad apropiada de disolución de enzima durante 30 minutos a 60 °C.

La reacción se detuvo disponiendo la mezcla a 100 °C (baño de agua hirviendo) durante 5 min. Se calculó la actividad relativa de la pectato liasa a partir de la diferencia en la absorción de la mezcla de reacción a 235 nm al principio y al final de la reacción.

15 **Ejemplo 6: Termoestabilidad de polipéptidos con actividad de pectato liasa.**

Se determinó la termoestabilidad de los polipéptidos con actividad de pectato liasa por preincubación durante 10 minutos en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, ya fuera a temperatura ambiente (control) o a 70 °C, 75 °C y 80 °C antes de medir su actividad según el Ejemplo 5.

Después de la preincubación, las muestras se llevaron hasta 60 °C, se añadió sustrato (PGA) y las muestras se ensayaron para actividad como se describe en el Ejemplo 5 a 60 °C a pH 8,0. Se calcularon las actividades residuales para cada muestra como el % de la actividad de la muestra preincubada a temperatura ambiente (muestra de control).

20 **Ejemplo 7: Dependencia del calcio de polipéptidos con actividad de pectato liasa.**

Se determinó la dependencia del calcio de los polipéptidos con actividad de pectato liasa según el método descrito en el Ejemplo 5, excepto que se omitió el calcio de la mezcla de reacción, es decir, con y sin CaCl₂ 0,5 mM.

25 **Ejemplo 8: Secuencias proporcionadas en el presente documento**

Se proporcionan con el presente documento la secuencia de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos en la norma WIPO ST_25. Por comodidad, las secuencias también se proporcionan en la Tabla 2.

SEQ ID NO: 1 deriva del estado de la técnica y se ha desvelado en Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000) 64: 2360-2367 y en Takao et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2001) 65: 322-329.

SEQ ID NO: 2 se obtuvo por mutagénesis al azar del ADN que codifica SEQ ID NO: 1 (mostrada en el presente documento como SEQ ID NO: 7) como se describe en Ejemplo 2, SEQ ID NO: 3 se obtuvo por mutagénesis al azar del ADN que codifica SEQ ID NO: 2 (mostrada en el presente documento como SEQ ID NO: 8). El ADN que codifica el polipéptido según SEQ ID NO: 3 se muestra en el presente documento como SEQ ID NO: 9. Los aminoácidos que se desvían de la secuencia no mutada de SEQ ID NO: 1 se muestran en letras mayúsculas.

El polipéptido con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 es un homólogo del polipéptido según SEQ ID NO: 1. Estos dos polipéptidos tienen 385 de los 416 aminoácidos en común, en otras palabras, son 93 % idénticos.

El polipéptido según SEQ ID NO: 3 también es un homólogo del polipéptido según SEQ ID NO: 1. Estos dos polipéptidos tienen 369 de los 416 aminoácidos en común, en otras palabras son 89 % idénticos.

Los polipéptidos según SEQ ID NOs: 4, 5 y 6 se pueden obtener de los polipéptidos según SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, cambiando el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina. El aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 se indica en **letra negrita y subrayada** en la Tabla 2.

Las secuencias de nucleótidos según SEQ ID NOs: 10, 11 y 12 codifican los polipéptidos con la variante A231L según SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos según SEQ ID NOs: 13 - 16 corresponden a los cebadores usados para producir las variantes A231L de los polipéptidos con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1 - 3, como se detalló en el Ejemplo 3.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos desveladas en el presente documento.

SEQ ID NO:	Secuencia
1	1 kelghevlpk ydgwaaygeg ttggamaspq nvfvtnrte liqalggnnh tnqynsvpki 61 iyvkgtiElN vddnnqpvgp dfykdpHdf eaylreydpa twgkvevgp leearvrsqk 121 kqkdrimvvv gsntsiigvg kdakikgggf liknvdnvii rniefiapld yfpewdptdg 181 tlgewnseyd sisiegsshi widhntftdg dhpdrslgty fgrpfqqhdg <u>a</u> ldiknssdf 241 itisynvftn hdkvtligas dsrmadsghl rvtlhnnyk nvtqrlprvr fgqvhynny 301 yefsnladyd fgyawgvvfv sqiyagynyf sdfwdidpsl iikvsknee smyetgtivd 361 lpngrryidl vasyesnt1 qlkkevtwkp mfyhvihtp svpalvkaka gagnlh
2	1 kelghDvlkp ydgwaSygeg ttggSmaspq nvYtvtNKte lVqalggnnh tnqynsvpki 61 iyvkgtiElN vddnnqpvgp EfykdphYdf eaylKeydpK KwgkkevSgp leearArsqk 121 kqkEriVvNv gsntsiigvg kdakiVgggf liknvdnvii rniefiapVd yfpewdptdg 181 tlgewnseyd siTiegsHhi widhntftdg dhpdkSlgty fgrpfqqhdg <u>a</u> ldiknssdf 241 itisynvfkD hdkvtligas dsrmadEghl rvtlhnnyk nvtqrlprvr fgqvhynny 301 yefsnladyd fgyawgvvE sKiyaqynyf sdfwdidpsK iikvsknee smyeSgtivd 361 lpngrryidl vasyesnt1 qlkkevGwkp mfyhvihtp svpalvkaka gagnlh
3	1 kelghDvlkp NdgwaSygeg ttggEaspD nvYtvtNKSe lVqalggnnh tnqynsTpki 61 iyvkgtiElN vddnnqpvgp EYyDdpHYdf eaylKeydpK KwgkkevSgp leearArsqk 121 kqkEriVvNv gsntsiigvg kdakiVgggf liknvdnvii rniefiapVd Ffpewdptdg 181 EYgewnseyd siTieSsHhi widhntftdg dhpdkSlgty fgrpfqqhdg <u>a</u> ldiknssdf 241 itisynvfkD hdkvSligSs dsrKTdEghl Kvtlhnnyk nvtqrlprvr fgqvhynny 301 yefsnladyd fgyawgvvE sKiyaqynyf sdfwdidpsK iikvsknee smyeSgtivd 361 lpngrryidl vasyesnt1 qlkkevGwkp mfyhvihtp svpalvkaka gagnlh
4	1 kelghevlpk ydgwaaygeg ttggamaspq nvfvtnrte liqalggnnh tnqynsvpki 61 iyvkgtiElN vddnnqpvgp dfykdpHdf eaylreydpa twgkvevgp leearvrsqk 121 kqkdrimvvv gsntsiigvg kdakikgggf liknvdnvii rniefiapld yfpewdptdg 181 tlgewnseyd sisiegsshi widhntftdg dhpdrslgty fgrpfqqhdg <u>l</u> ldiknssdf 241 itisynvftn hdkvtligas dsrmadsghl rvtlhnnyk nvtqrlprvr fgqvhynny 301 yefsnladyd fgyawgvvfv sqiyagynyf sdfwdidpsl iikvsknee smyetgtivd 361 lpngrryidl vasyesnt1 qlkkevtwkp mfyhvihtp svpalvkaka gagnlh

SEQ ID NO:	Secuencia
5	1 kelghDvlkp ydgwaSygeg ttggSmaspq nvYTvtnKte lVqalggnnh tnqynsvpki 61 iyvkgtiElN vddnnqpvgp EfykdphYdf eaylKeydpK KwgkkesVgpp leearArsqk 121 kqkEriVvNv gsntsiilvgv kdakiVgggf liknvdnviI rniefepVd yfpewdptdg 181 tlgewnseyd siTiegsHhi widhntftdg dhpdKslgty fgrpfqghdg lldiknssdf 241 itisynvFKD hdkvtligas dsrmaDEghl rvtllhnyyk nvtqlprvr fgqvhynny 301 yefsnladyd fgyawgvge sKiyagqnyf sfwdidpsK iikvsknee smyeSgtivd 361 lpngrryidl vasyesnt1 qlkkevGwkp mfyhvihtp svpalvkaka gagnlh
6	1 kelghDvlkp NdgwaSygeg ttggSEaspD nvYTvtnKSe lVqalggnnh tnqynsTpki 61 iyvkgtiElN vddnnqpvgp EYyDdphYdf eaylKeydpK KwgkkesVgpp leearArsqk 121 kqkEriVvNv gsntsiilvgv kdakiVgggf liknvdnviI rniefepVd Ffpewdptdg 181 EYgewnseyd siTiesSHhi widhntftdg dhpdKslgty fgrpfqghdg lldiknssdf 241 itisynvFKD hdkvSligSS dsrKTdEghl Kvtllhnyyk nvtqlprvr fgqvhynny 301 yefsnladyd fgyawgvge sKiyagqnyf sfwdidpsK iikvsknee smyeSgtivd 361 lpngrryidl vasyesnt1 qlkkevGwkp mfyhvihtp svpalvkaka gagnlh
7	aaagaactgg gtcataagt tctgaaacgg tatgatggtt gggcagcgta tggtagaagt 60 acaacgggtg gtgcaatggc aagtcgcgag aatgtttttg ttgttaccaa tcgtaccgaa 120 ctgattcagg cactgggttg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaatc 180 atctatgtga aaggcaacat tgatctgaac ctgcatgata ataatacagc ggttggtccg 240 gatttctata aagatccgca ttttgatttt gaggcctatc tgcgtgaata tgatccggca 300 acctggggta aaaaagaagt tgaaggtccg ctggaagaag cagcgttccg tagccagaaa 360 aaacagaaag atcgtatcat ggtttatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgt 420 aaagacgga aatcaaaagg tgggtgtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcacc 480 cgcaacatcg aatttgaagc accgctggat tattttccgg aatgggatac gaccgatggc 540 acctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattagca ttgaaggcag cagccatatt 600 tggattgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg atcgtagcct gggcacctat 660 tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc gcaatggata tcaaaaaatag cagcgtattt 720 atcaccatca gctacaacgt gtttaccac cagcataaag ttaccctgat tggtagaagc 780 gatagccgta tggcagatag cgggtcatctg cgtgttacc tgcatacaaa ttattacaaa 840 aatgttacc agcgtctgcc tcgtgttcgt ttttggtcag ttcatatcta taacaactac 900 tatgagttta gcaacctggc cgattatgat tticagtagg tatgggggtgt tgggtgtgtt 960 agccagattt atgcacagaa caactatttc agcttcgatt gggatatatga tccgagcctg 1020 attatcaaag ttggagcaaa aaatgaagaa agcatgtatg aaacccggcac catcgttgat 1080 ctgcgaatg gtctcgta tattgatctg gttgcaagct ataagaaaag caataccctg 1140 cagctgaaaa aagaggttac ctggaaaccc atgtttatc atgtttatca tccgaccccg 1200 agcgttccgg cactgggttaa agcaaaagcc ggtgcagata atctgcat 1248

SEQ ID NO:	Secuencia
8	aaagaactgg gtcattgatgt gctgaaaaccg tatgatgggtt gggcaagcta tggatgaaggt 60 acaaaccggtg gtagcatggc aagtcocgcag aatgtttata ccgttaccaa taaaaccgaa 120 ctggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaaatc 180 atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatacggc ggttggtccg 240 gaattctata aagatccgca ttatgatgtt gaagcctatc tgaagagta tgatccgaaa 300 aatgggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cagcgcacg tagccagaaa 360 aaacagaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgt 420 aaagatgcc aattgtggg tgggtgttct ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc 480 cgcaacatcg aatttgaagc accggtggat tatttccgg aatgggatcc gaccgatggc 540 accctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattacca ttgaaggcag ccatcatatt 600 tggatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg ataaaaagcct gggcacctat 660 tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc gcaatggata tcaaaaatag cagcgatttt 720 atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgacctgat tggatgaagc 780 gatagccgta tggcagatga aggtcatctg cgtgttaccc tgcatacaaa ttattacaaa 840 aatgttacc agcgtctgcc tegtgttctg ttgggtcagg ttcatatcta taacaactac 900 tatgagttaa gcaacctggc cgattatgac ttacagtatg catggggtgt tgggtgtgaa 960 agcaaaatct atgcccagaa caactatttc agcttcgatt gggatatga ccgagcaaa 1020 attatcaaa tttggagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcgttac gattgttgat 1080 ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataataaaag caataccctg 1140 cagctgaaaa aagaggttgg ttggaaaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg 1200 agcgttccgg cactgggttaa agcaaaaagc ggtgcaggta atctgcat 1248

SEQ ID NO:	Secuencia
9	aagaactgg gtcatgatgt gctgaaccgg aatgatgggt gggcaagcta tggatgaaggt 60 acaaccgggtg gtagcgaagc aagtcgggat aatgtttata ccgttaccaa taaaagcgaa 120 ctggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccac ccgaaaaatc 180 atctatgtga aagccaccat tgaactgaac gtggatgata ataalcagcc ggttgggtccg 240 gaatattatg atgatccgca ttatgatattt gaagcctatc tgaagagata tgatccgaaa 300 aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cagcgcacag tagccagaaa 360 aaacagaaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgt 420 aaagatgcca aaattgtggg tgggtgtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc 480 cgcaacatcg aatttgaagc accggttgat tttttccgg aatgggatcc gaccgatggt 540 gaatatggcg aatggaatag cgaatatgat agcattacca tcgaaagcag ccatoatat 600 tggatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg ataagaagcct gggcacctat 660 tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc gcactggata tcaaaaaatag cagcgatttt 720 atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgagcctgat tggttcaagc 780 gatagccgta aaaccgatga aggtcatctg aaagttaccc tgcatacaaa ctattacaaa 840 aatgttaccg agcgtctgcc tcgtgttcgt tttgggtcagg ttcatatcta taacaactac 900 tatgagttha gcaacctggc cgattatgac tttcagtatg catgggggtgt tgggtgtgaa 960 agcaaaaatct atgcccagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga ccgagcaaaa 1020 attatcaaaag tttagagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcggtag gattgttgat 1080 ctgccgaatg gtctgtgtha tattgatctg gttgcaagct ataataaaag caataccctg 1140 cagctgaaaa aagagggttg ttggaaccgg atgttctatc atgttattca tccgaccccg 1200 agcgttccgg cactgggtta agcaaaaagcc ggtgcaggta atctgcat 1248

SEQ ID NO:	Secuencia
10	aaagaactgg gtcatgaagt tctgaaacccg tatgatgggtt gggcagcgta tggatgaaggt 60 acaaccgggtg gtgcaatggc aagtcocgcag aatgttttttg ttgttaccaa tcgtaccgaa 120 ctgattcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaaac 180 atctatgtga aaggcaccat tgatctgaac gtggatgata ataatacagcc ggttgggtccg 240 gattttctata agatccgca ttttgattttt gaggcctatc tgcgtgaata tgatccggca 300 acctggggta aaaaagaagt tgaagggtccg ctggaagaag cagcgttccg tagccagaaa 360 aaacagaaaag atcgtatcat ggtttatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgg 420 aaagacgcga aaatcaaagg tgggtggttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc 480 cgcaacatcg aatttgaagc accgctggat tattttccgg aatgggatcc gaccgatggc 540 acctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattagca ttgaaggcag cagccatatt 600 tggattgac acaatacctt taccgatggc gatcatccgg atcgtagcct gggcacctat 660 tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc ctgctggata tcaaaaaatag cagcgatttt 720 atcaccatca gctacaacgt gtttaccac cagataaaag ttaccctgat tggtgcaagc 780 gatagccgta tggcagatag cgtcatctcg cgtgttacc tgcatcaaa ttattacaaa 840 aatgttacc agcgtctgcc tcgtgttcgt tttggtcagg ttcatatcta taacaactac 900 tatgagttta gcaacctggc cgattatgat tttcagtatg catggggtgt tgggtgtgtt 960 agccagattt atgcacagaa caactatttc agcttcgatt gggatatga tccgagcctg 1020 attatcaaa tttggagcaa aaatgaagaa agcatgtatg aaaccggcac catcgttgat 1080 ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataataaaag caataccctg 1140 cagctgaaaa aagaggttac ctggaacccg atgttctatc atgttattca tccgaccccc 1200 agcgttccgg cactggttaa agcaaaaagcc ggtgcaggta atctgcat 1248

SEQ ID NO:	Secuencia
11	aaagaactgg gtcattgatgt gctgaaacccg tatgatgggtt gggcaagcta tggatgaaggt 60 acaaccgggtg gtagcatggc aagtcggcag aatgtttata cgtttaccaa taaaaccgaa 120 ctgggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaatc 180 atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg 240 gaattctata aagatccgca ttatgatattt gaagcctatc tgaagagagta tgatccgaaa 300 aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cagcgcacg tagccagaaa 360 aaacagaaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tggatgttgt 420 aaagatgcca aaattgtggg tgggtggttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc 480 cgcaacatcg aatttgaagc accggtggat tattttccgg aatgggatcc gaccgatggc 540 accctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattacca ttgaaaggcag ccatacatat 600 tggatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg ataaaagcct gggcacctat 660 tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc ctgctggata tcaaaaatag cagcgatttt 720 atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgacctgat tggatgcaagc 780 gatagccgta tggcagatga aggtcatctg cgtgttacc cgcattacaa ttattacaaa 840 aatgttaccc agcgtctgcc tcgtgttcgt tttgggtcagg ttcatatcta taacaactac 900 tatgagttaa gcaacctggc cgattatgac tttcagtatg catgggggtgt tggatgttgaa 960 agcaaaaatct atgcccagaa caactattc agcttcgatt gggatatatga cccgagcaaa 1020 attatcaaaag ttggagagca aaacgaagaa agcatgtatg aaagcgggtac gattgttgtat 1080 ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataataaaa caataccctg 1140 cagctgaaaa aagaggttgg ttggaaaccc atgttctatc atgttattca tccgaccccg 1200 agcgttccgg cactgggttaa agcaaaaagc ggtgcaggta atctgcat 1248

SEQ ID NO:	Secuencia
12	aaagaactgg gtcattgatgt gctgaacacg aatgatgggtt gggcaagcta tggatgaaggt 60 acaaccgggtg gtagcgaagc aagtcocggat aatgttttata ccgttaccac taaaagcgaa 120 ctgggttcagg cactgggttg taataatcat accaatcagt ataattccac ccgaaaaac 180 atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatacagc gggttggtccg 240 gaatattatg atgatccgca ttatgatattt gaagcctatc tgaagagata tgatccgaaa 300 aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cagcgcacg tagccagaaa 360 aaacagaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgg 420 aaagatgcca aaattgtggg tgggtggttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcacc 480 cgcaacatcg aatttgaagc accggttgat tttttccgg aatgggatcc gaccgatggt 540 gaatatggcg aatggaatag cgaatatgat agcattacca togaaagcag ccatcatatt 600 tggtatcgat acaataacctt taccgatggc gatcatccgg ataaaaagcct gggcacctat 660 tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc ctgctggata tcaaaaaatag cagcgatttt 720 atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgagcctgat tggttcaagc 780 gatagccgta aaaccgatga aggtcatctg aaagttacc tgcattacacaa ctattacaaa 840 aatgttacc agcgtctgcc tcgtgttcgt tttgggtcagg ttcatatcta taacaactac 900 tatgagttta gcaacctggc cgattatgac ttccagtatg catgggggtgt tgggtgttgaa 960 agcaaaaatct atgcccagaa caactatttc agcttcgatt gggatatatga ccgagcaaaa 1020 attatcaaaag tttagagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcggtag gattgttgat 1080 ctgccgaatg gtgcgtcgta tattgatctg gttgcaagct ataatagaag caataccctg 1140 cagctgaaaa aagagggttg ttggaaaacg atgttctatc atgttattea tccgaccccg 1200 agcgttccgg cactgggtta agcaaaaagc ggtgcaggta atctgcat 1248
13	gaaattaata cgactcacta tagg
14	gccatcatgc tctgaacacg gacgaccacaa ataggig
15	ggctgcctgt ttacagcagca tgatggcctg ctggatatac
16	ggttatgcta gttattgctc agcggig

Listado de secuencias

	<110> Metgen OY
5	<120> PECTINASAS INDEPENDIENTES DEL CALCIO CON TERMOESTABILIDAD MEJORADA
	<130> 324 WO
	<160> 16
10	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
	<211> 416
	<212> PRT
15	<213> Bacillus spec.
	<400> 1

ES 2 821 648 T3

Lys Glu Leu Gly His Glu Val Leu Lys Pro Tyr Asp Gly Trp Ala Ala
 1 5 10 15
 Tyr Gly Glu Gly Thr Thr Gly Gly Ala Met Ala Ser Pro Gln Asn Val
 20 25 30
 Phe Val Val Thr Asn Arg Thr Glu Leu Ile Gln Ala Leu Gly Gly Asn
 35 40 45
 Asn His Thr Asn Gln Tyr Asn Ser Val Pro Lys Ile Ile Tyr Val Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ile Asp Leu Asn Val Asp Asp Asn Asn Gln Pro Val Gly Pro
 65 70 75 80
 Asp Phe Tyr Lys Asp Pro His Phe Asp Phe Glu Ala Tyr Leu Arg Glu
 85 90 95
 Tyr Asp Pro Ala Thr Trp Gly Lys Lys Glu Val Glu Gly Pro Leu Glu
 100 105 110
 Glu Ala Arg Val Arg Ser Gln Lys Lys Gln Lys Asp Arg Ile Met Val
 115 120 125
 Tyr Val Gly Ser Asn Thr Ser Ile Ile Gly Val Gly Lys Asp Ala Lys
 130 135 140
 Ile Lys Gly Gly Gly Phe Leu Ile Lys Asn Val Asp Asn Val Ile Ile
 145 150 155 160
 Arg Asn Ile Glu Phe Glu Ala Pro Leu Asp Tyr Phe Pro Glu Trp Asp
 165 170 175

ES 2 821 648 T3

Pro Thr Asp Gly Thr Leu Gly Glu Trp Asn Ser Glu Tyr Asp Ser Ile
 180 185 190
 Ser Ile Glu Gly Ser Ser His Ile Trp Ile Asp His Asn Thr Phe Thr
 195 200 205
 Asp Gly Asp His Pro Asp Arg Ser Leu Gly Thr Tyr Phe Gly Arg Pro
 210 215 220
 Phe Gln Gln His Asp Gly Ala Leu Asp Ile Lys Asn Ser Ser Asp Phe
 225 230 235 240
 Ile Thr Ile Ser Tyr Asn Val Phe Thr Asn His Asp Lys Val Thr Leu
 245 250 255
 Ile Gly Ala Ser Asp Ser Arg Met Ala Asp Ser Gly His Leu Arg Val
 260 265 270
 Thr Leu His His Asn Tyr Tyr Lys Asn Val Thr Gln Arg Leu Pro Arg
 275 280 285
 Val Arg Phe Gly Gln Val His Ile Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Phe Ser
 290 295 300
 Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Phe Gln Tyr Ala Trp Gly Val Gly Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Gln Ile Tyr Ala Gln Asn Asn Tyr Phe Ser Phe Asp Trp Asp Ile
 325 330 335
 Asp Pro Ser Leu Ile Ile Lys Val Trp Ser Lys Asn Glu Glu Ser Met
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Gly Thr Ile Val Asp Leu Pro Asn Gly Arg Arg Tyr Ile
 355 360 365
 Asp Leu Val Ala Ser Tyr Asn Glu Ser Asn Thr Leu Gln Leu Lys Lys
 370 375 380
 Glu Val Thr Trp Lys Pro Met Phe Tyr His Val Ile His Pro Thr Pro
 385 390 395 400
 Ser Val Pro Ala Leu Val Lys Ala Lys Ala Gly Ala Gly Asn Leu His
 405 410 415

<210> 2

<211> 416

<212> PRT

<213> Bacillus spec.

ES 2 821 648 T3

<400> 2

```

Lys Glu Leu Gly His Asp Val Leu Lys Pro Tyr Asp Gly Trp Ala Ser
1          5          10          15

Tyr Gly Glu Gly Thr Thr Gly Gly Ser Met Ala Ser Pro Gln Asn Val
          20          25          30

Tyr Thr Val Thr Asn Lys Thr Glu Leu Val Gln Ala Leu Gly Gly Asn
          35          40          45

Asn His Thr Asn Gln Tyr Asn Ser Val Pro Lys Ile Ile Tyr Val Lys
          50          55          60

Gly Thr Ile Glu Leu Asn Val Asp Asp Asn Asn Gln Pro Val Gly Pro
65          70          75          80

Glu Phe Tyr Lys Asp Pro His Tyr Asp Phe Glu Ala Tyr Leu Lys Glu
          85          90          95

Tyr Asp Pro Lys Lys Trp Gly Lys Lys Glu Val Ser Gly Pro Leu Glu
          100          105          110

Glu Ala Arg Ala Arg Ser Gln Lys Lys Gln Lys Glu Arg Ile Val Val
          115          120          125

Asn Val Gly Ser Asn Thr Ser Ile Ile Gly Val Gly Lys Asp Ala Lys
          130          135          140

Ile Val Gly Gly Gly Phe Leu Ile Lys Asn Val Asp Asn Val Ile Ile
145          150          155          160

Arg Asn Ile Glu Phe Glu Ala Pro Val Asp Tyr Phe Pro Glu Trp Asp
          165          170          175

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

Thr Ile Glu Gly Ser His His Ile Trp Ile Asp His Asn Thr Phe Thr
          195          200          205

Asp Gly Asp His Pro Asp Lys Ser Leu Gly Thr Tyr Phe Gly Arg Pro
          210          215          220

Phe Gln Gln His Asp Gly Ala Leu Asp Ile Lys Asn Ser Ser Asp Phe
225          230          235          240

```

ES 2 821 648 T3

Ile Thr Ile Ser Tyr Asn Val Phe Lys Asp His Asp Lys Val Thr Leu
245 250 255

Ile Gly Ala Ser Asp Ser Arg Met Ala Asp Glu Gly His Leu Arg Val
260 265 270

Thr Leu His His Asn Tyr Tyr Lys Asn Val Thr Gln Arg Leu Pro Arg
275 280 285

Val Arg Phe Gly Gln Val His Ile Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Phe Ser
290 295 300

Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Phe Gln Tyr Ala Trp Gly Val Gly Val Glu
305 310 315 320

Ser Lys Ile Tyr Ala Gln Asn Asn Tyr Phe Ser Phe Asp Trp Asp Ile
325 330 335

Asp Pro Ser Lys Ile Ile Lys Val Trp Ser Lys Asn Glu Glu Ser Met
340 345 350

Tyr Glu Ser Gly Thr Ile Val Asp Leu Pro Asn Gly Arg Arg Tyr Ile
355 360 365

Asp Leu Val Ala Ser Tyr Asn Glu Ser Asn Thr Leu Gln Leu Lys Lys
370 375 380

Glu Val Gly Trp Lys Pro Met Phe Tyr His Val Ile His Pro Thr Pro
385 390 395 400

Ser Val Pro Ala Leu Val Lys Ala Lys Ala Gly Ala Gly Asn Leu His
405 410 415

<210> 3

<211> 416

5 <212> PRT

<213> Bacillus spec.

<400> 3

Lys Glu Leu Gly His Asp Val Leu Lys Pro Asn Asp Gly Trp Ala Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Glu Gly Thr Thr Gly Gly Ser Glu Ala Ser Pro Asp Asn Val
20 25 30

Tyr Thr Val Thr Asn Lys Ser Glu Leu Val Gln Ala Leu Gly Gly Asn
35 40 45

ES 2 821 648 T3

Asn	His	Thr	Asn	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Pro	Lys	Ile	Ile	Tyr	Val	Lys	50	55	60
Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Asn	Val	Asp	Asp	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Gly	Pro	65	70	75
Glu	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Pro	His	Tyr	Asp	Phe	Glu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Glu	85	90	95
Tyr	Asp	Pro	Lys	Lys	Trp	Gly	Lys	Lys	Glu	Val	Ser	Gly	Pro	Leu	Glu	100	105	110
Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Gln	Lys	Lys	Gln	Lys	Glu	Arg	Ile	Val	Val	115	120	125
Asn	Val	Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Lys	Asp	Ala	Lys	130	135	140
Ile	Val	Gly	Gly	Gly	Phe	Leu	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Asn	Val	Ile	Ile	145	150	155
Arg	Asn	Ile	Glu	Phe	Glu	Ala	Pro	Val	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Trp	Asp	165	170	175
Pro	Thr	Asp	Gly	Glu	Tyr	Gly	Glu	Trp	Asn	Ser	Glu	Tyr	Asp	Ser	Ile	180	185	190
Thr	Ile	Glu	Ser	Ser	His	His	Ile	Trp	Ile	Asp	His	Asn	Thr	Phe	Thr	195	200	205
Asp	Gly	Asp	His	Pro	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Pro	210	215	220
Phe	Gln	Gln	His	Asp	Gly	Ala	Leu	Asp	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser	Asp	Phe	225	230	235
Ile	Thr	Ile	Ser	Tyr	Asn	Val	Phe	Lys	Asp	His	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	245	250	255
Ile	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Arg	Lys	Thr	Asp	Glu	Gly	His	Leu	Lys	Val	260	265	270
Thr	Leu	His	His	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Val	Thr	Gln	Arg	Leu	Pro	Arg	275	280	285
Val	Arg	Phe	Gly	Gln	Val	His	Ile	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Phe	Ser	290	295	300

ES 2 821 648 T3

Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Phe Gln Tyr Ala Trp Gly Val Gly Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Lys Ile Tyr Ala Gln Asn Asn Tyr Phe Ser Phe Asp Trp Asp Ile
 325 330 335
 Asp Pro Ser Lys Ile Ile Lys Val Trp Ser Lys Asn Glu Glu Ser Met
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Gly Thr Ile Val Asp Leu Pro Asn Gly Arg Arg Tyr Ile
 355 360 365
 Asp Leu Val Ala Ser Tyr Asn Glu Ser Asn Thr Leu Gln Leu Lys Lys
 370 375 380
 Glu Val Gly Trp Lys Pro Met Phe Tyr His Val Ile His Pro Thr Pro
 385 390 395 400
 Ser Val Pro Ala Leu Val Lys Ala Lys Ala Gly Ala Gly Asn Leu His
 405 410 415

<210> 4

<211> 416

5

<212> PRT

<213> Bacillus spec.

<400> 4

Lys Glu Leu Gly His Glu Val Leu Lys Pro Tyr Asp Gly Trp Ala Ala
 1 5 10 15
 Tyr Gly Glu Gly Thr Thr Gly Gly Ala Met Ala Ser Pro Gln Asn Val
 20 25 30
 Phe Val Val Thr Asn Arg Thr Glu Leu Ile Gln Ala Leu Gly Gly Asn
 35 40 45
 Asn His Thr Asn Gln Tyr Asn Ser Val Pro Lys Ile Ile Tyr Val Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ile Asp Leu Asn Val Asp Asp Asn Asn Gln Pro Val Gly Pro
 65 70 75 80
 Asp Phe Tyr Lys Asp Pro His Phe Asp Phe Glu Ala Tyr Leu Arg Glu
 85 90 95
 Tyr Asp Pro Ala Thr Trp Gly Lys Lys Glu Val Glu Gly Pro Leu Glu
 100 105 110

ES 2 821 648 T3

Glu	Ala	Arg	Val	Arg	Ser	Gln	Lys	Lys	Gln	Lys	Asp	Arg	Ile	Met	Val
115						120				125					
Tyr	Val	Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Lys	Asp	Ala	Lys
130						135				140					
Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Phe	Leu	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Asn	Val	Ile	Ile
145				150						155				160	
Arg	Asn	Ile	Glu	Phe	Glu	Ala	Pro	Leu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Trp	Asp
				165				170						175	
Pro	Thr	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp	Asn	Ser	Glu	Tyr	Asp	Ser	Ile
		180						185				190			
Ser	Ile	Glu	Gly	Ser	Ser	His	Ile	Trp	Ile	Asp	His	Asn	Thr	Phe	Thr
195						200						205			
Asp	Gly	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Ser	Leu	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Pro
210						215				220					
Phe	Gln	Gln	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Asp	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser	Asp	Phe
225				230						235				240	
Ile	Thr	Ile	Ser	Tyr	Asn	Val	Phe	Thr	Asn	His	Asp	Lys	Val	Thr	Leu
				245				250						255	
Ile	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Arg	Met	Ala	Asp	Ser	Gly	His	Leu	Arg	Val
		260						265				270			
Thr	Leu	His	His	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Val	Thr	Gln	Arg	Leu	Pro	Arg
275						280						285			
Val	Arg	Phe	Gly	Gln	Val	His	Ile	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Phe	Ser
290						295				300					
Asn	Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp	Phe	Gln	Tyr	Ala	Trp	Gly	Val	Gly	Val	Phe
305				310						315				320	
Ser	Gln	Ile	Tyr	Ala	Gln	Asn	Asn	Tyr	Phe	Ser	Phe	Asp	Trp	Asp	Ile
				325				330						335	
Asp	Pro	Ser	Leu	Ile	Ile	Lys	Val	Trp	Ser	Lys	Asn	Glu	Glu	Ser	Met
		340						345				350			
Tyr	Glu	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ile

ES 2 821 648 T3

355

360

365

Asp Leu Val Ala Ser Tyr Asn Glu Ser Asn Thr Leu Gln Leu Lys Lys
370 375 380

Glu Val Thr Trp Lys Pro Met Phe Tyr His Val Ile His Pro Thr Pro
385 390 395 400

Ser Val Pro Ala Leu Val Lys Ala Lys Ala Gly Ala Gly Asn Leu His
405 410 415

<210> 5

<211> 416

5 <212> PRT

<213> Bacillus spec.

<400> 5

ES 2 821 648 T3

Lys Glu Leu Gly His Asp Val Leu Lys Pro Tyr Asp Gly Trp Ala Ser
 1 5 10 15
 Tyr Gly Glu Gly Thr Thr Gly Gly Ser Met Ala Ser Pro Gln Asn Val
 20 25 30
 Tyr Thr Val Thr Asn Lys Thr Glu Leu Val Gln Ala Leu Gly Gly Asn
 35 40 45
 Asn His Thr Asn Gln Tyr Asn Ser Val Pro Lys Ile Ile Tyr Val Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ile Glu Leu Asn Val Asp Asp Asn Asn Gln Pro Val Gly Pro
 65 70 75 80
 Glu Phe Tyr Lys Asp Pro His Tyr Asp Phe Glu Ala Tyr Leu Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Asp Pro Lys Lys Trp Gly Lys Lys Glu Val Ser Gly Pro Leu Glu
 100 105 110
 Glu Ala Arg Ala Arg Ser Gln Lys Lys Gln Lys Glu Arg Ile Val Val
 115 120 125
 Asn Val Gly Ser Asn Thr Ser Ile Ile Gly Val Gly Lys Asp Ala Lys
 130 135 140
 Ile Val Gly Gly Gly Phe Leu Ile Lys Asn Val Asp Asn Val Ile Ile
 145 150 155 160
 Arg Asn Ile Glu Phe Glu Ala Pro Val Asp Tyr Phe Pro Glu Trp Asp

ES 2 821 648 T3

165					170					175					
Pro	Thr	Asp	Gly 180	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp 185	Asn	Ser	Glu	Tyr	Asp 190	Ser	Ile
Thr	Ile	Glu 195	Gly	Ser	His	His	Ile 200	Trp	Ile	Asp	His	Asn 205	Thr	Phe	Thr
Asp	Gly 210	Asp	His	Pro	Asp	Lys 215	Ser	Leu	Gly	Thr	Tyr 220	Phe	Gly	Arg	Pro
Phe 225	Gln	Gln	His	Asp	Gly 230	Leu	Leu	Asp	Ile	Lys 235	Asn	Ser	Ser	Asp	Phe 240
Ile	Thr	Ile	Ser	Tyr 245	Asn	Val	Phe	Lys	Asp 250	His	Asp	Lys	Val	Thr 255	Leu
Ile	Gly	Ala	Ser 260	Asp	Ser	Arg	Met	Ala 265	Asp	Glu	Gly	His	Leu 270	Arg	Val
Thr	Leu	His 275	His	Asn	Tyr	Tyr	Lys 280	Asn	Val	Thr	Gln	Arg 285	Leu	Pro	Arg
Val	Arg 290	Phe	Gly	Gln	Val	His 295	Ile	Tyr	Asn	Asn	Tyr 300	Tyr	Glu	Phe	Ser
Asn 305	Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp 310	Phe	Gln	Tyr	Ala	Trp 315	Gly	Val	Gly	Val	Glu 320
Ser	Lys	Ile	Tyr	Ala 325	Gln	Asn	Asn	Tyr	Phe 330	Ser	Phe	Asp	Trp	Asp 335	Ile
Asp	Pro	Ser	Lys 340	Ile	Ile	Lys	Val	Trp 345	Ser	Lys	Asn	Glu	Glu 350	Ser	Met
Tyr	Glu	Ser 355	Gly	Thr	Ile	Val	Asp 360	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg 365	Arg	Tyr	Ile
Asp	Leu 370	Val	Ala	Ser	Tyr	Asn 375	Glu	Ser	Asn	Thr	Leu 380	Gln	Leu	Lys	Lys
Glu 385	Val	Gly	Trp	Lys	Pro 390	Met	Phe	Tyr	His	Val 395	Ile	His	Pro	Thr	Pro 400
Ser	Val	Pro	Ala 405	Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Ala 410	Gly	Ala	Gly	Asn 415	Leu	His

<210> 6

<211> 416

<212> PRT

<213> Bacillus spec.

ES 2 821 648 T3

<400> 6

```

Lys Glu Leu Gly His Asp Val Leu Lys Pro Asn Asp Gly Trp Ala Ser
1           5           10           15

Tyr Gly Glu Gly Thr Thr Gly Gly Ser Glu Ala Ser Pro Asp Asn Val
20           25           30

Tyr Thr Val Thr Asn Lys Ser Glu Leu Val Gln Ala Leu Gly Gly Asn
35           40           45

Asn His Thr Asn Gln Tyr Asn Ser Thr Pro Lys Ile Ile Tyr Val Lys
50           55           60

Gly Thr Ile Glu Leu Asn Val Asp Asp Asn Asn Gln Pro Val Gly Pro
65           70           75

Glu Tyr Tyr Asp Asp Pro His Tyr Asp Phe Glu Ala Tyr Leu Lys Glu
85           90           95

Tyr Asp Pro Lys Lys Trp Gly Lys Lys Glu Val Ser Gly Pro Leu Glu
100          105          110

Glu Ala Arg Ala Arg Ser Gln Lys Lys Gln Lys Glu Arg Ile Val Val
115          120          125

Asn Val Gly Ser Asn Thr Ser Ile Ile Gly Val Gly Lys Asp Ala Lys
130          135          140

Ile Val Gly Gly Gly Phe Leu Ile Lys Asn Val Asp Asn Val Ile Ile
145          150          155          160

Arg Asn Ile Glu Phe Glu Ala Pro Val Asp Phe Phe Pro Glu Trp Asp
165          170          175

Pro Thr Asp Gly Glu Tyr Gly Glu Trp Asn Ser Glu Tyr Asp Ser Ile
180          185          190

Thr Ile Glu Ser Ser His His Ile Trp Ile Asp His Asn Thr Phe Thr
195          200          205

Asp Gly Asp His Pro Asp Lys Ser Leu Gly Thr Tyr Phe Gly Arg Pro
210          215          220

```

ES 2 821 648 T3

Phe Gln Gln His Asp Gly Leu Leu Asp Ile Lys Asn Ser Ser Asp Phe
 225 230 235 240
 Ile Thr Ile Ser Tyr Asn Val Phe Lys Asp His Asp Lys Val Ser Leu
 245 250 255
 Ile Gly Ser Ser Asp Ser Arg Lys Thr Asp Glu Gly His Leu Lys Val
 260 265 270
 Thr Leu His His Asn Tyr Tyr Lys Asn Val Thr Gln Arg Leu Pro Arg
 275 280 285
 Val Arg Phe Gly Gln Val His Ile Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Phe Ser
 290 295 300
 Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Phe Gln Tyr Ala Trp Gly Val Gly Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Lys Ile Tyr Ala Gln Asn Asn Tyr Phe Ser Phe Asp Trp Asp Ile
 325 330 335
 Asp Pro Ser Lys Ile Ile Lys Val Trp Ser Lys Asn Glu Glu Ser Met
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Gly Thr Ile Val Asp Leu Pro Asn Gly Arg Arg Tyr Ile
 355 360 365
 Asp Leu Val Ala Ser Tyr Asn Glu Ser Asn Thr Leu Gln Leu Lys Lys
 370 375 380
 Glu Val Gly Trp Lys Pro Met Phe Tyr His Val Ile His Pro Thr Pro
 385 390 395 400
 Ser Val Pro Ala Leu Val Lys Ala Lys Ala Gly Ala Gly Asn Leu His
 405 410 415

<210> 7

<211> 1248

5 <212> ADN

<213> Bacillus spec.

<400> 7

ES 2 821 648 T3

```

aaagaactgg gtcataaagt tctgaaaccg tatgatgggt gggcagcgtg ttgtgaaggt      60
acaaccgggt gtgcaatggc aagtccgcag aatgtttttg ttgttaccaa tctgaccgaa      120
ctgattcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaatc      180
atctatgtga aaggcaccat tgatctgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg      240
gatttctata aagatccgca ttttgatttt gaggcctatc tgcgtgaata tgatccggca      300
acctggggta aaaaagaagt tgaaggtccg ctggaagaag cagcgttcg tagccagaaa      360
aaacagaaag atcgtatcat ggtttatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgt      420
aaagacgcta aatcaaagg tgggtgtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc      480
cgcaacatcg aatttgaagc accgctggat tattttccgg aatgggatcc gaccgatggc      540
accctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattagca ttgaaggcag cagccatatt      600
tggattgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg atcgtagcct gggcacctat      660
tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc gactggata tcaaaaatag cagcgatttt      720
atcaccatca gctacaacgt gtttaccac cagataaag ttaccctgat tgggtgcaagc      780
gatagccgta tggcagatag cggatcatctg cgtgttacc tgcatcaca ttattacaaa      840
aatgttacc agcgtctgcc tctgttctg tttggtcagg ttcatatcta taacaactac      900
tatgagttta gcaacctggc cgattatgat ttccagtatg catgggtgtg tgggtgtgtt      960
agccagattt atgcacagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga tccgagcctg     1020
attatcaaag tttggagcaa aatgaagaa agcatgtatg aaaccggcac catcgttgat     1080
ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataatgaaag caataccctg     1140
cagctgaaaa aagaggttac ctggaaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg     1200
agcgttccgg cactggttaa agcaaaagcc ggtgcaggta atctgcat                       1248

```

<210> 8

5

<211> 1248

<212> ADN

<213> Bacillus spec.

<400> 8

ES 2 821 648 T3

```

aaagaactgg gtcgatgatgt gctgaaaccg tatgatgggtt gggcaagcta tggatgaagg      60
acaaccgggtg gtagcatggc aagtccgcag aatgtttata ccgttaccaa taaaaccgaa      120
ctggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaatc      180
atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg      240
gaattctata aagatccgca ttatgatttt gaagcctatc tgaaagagta tgatccgaaa      300
aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cacgcgcacg tagccagaaa      360
aaacagaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgg      420
aaagatgcc aattgtggg tgggtggtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc      480
cgcaacatcg aatttgaagc accggtggat tattttccgg aatgggatcc gaccgatggc      540
accctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattacca ttgaaggcag ccatcatatt      600
tggatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg ataaaagcct gggcacctat      660
tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc gcaactggata tcaaaaatag cagcgatttt      720
atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgaccctgat tgggtgcaagc      780
gatagccgta tggcagatga aggtcatctg cgtgttacc tgcatcaca ttattacaaa      840
aatgttacc agcgtctgcc tcgtgttcgt tttggtcagg ttcatatcta taacaactac      900
tatgagttta gcaacctggc cgattatgac tttcagtatg catggggtgt tgggtgttgaa      960
agcaaatct atgccagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga cccgagcaaa      1020
attatcaaag tttggagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcggtag gattgttgat      1080
ctgccgaatg gtcgtcgta tattgatctg gttgcaagct ataatgaaag caataccctg      1140
cagctgaaaa aagaggttgg ttggaaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg      1200
agcgttccgg cactggttaa agcaaaagcc ggtgcaggta atctgcat      1248

```

<210> 9

5

<211> 1248

<212> ADN

<213> Bacillus spec.

<400> 9

ES 2 821 648 T3

```

aaagaactgg gtcgatgatgt gctgaaaccg aatgatgggtt gggcaagcta tggatgaagg 60
acaaccgggtg gtagcgaagc aagtccggat aatgtttata ccgttaccaa taaaagcgaa 120
ctggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccac cccgaaaatc 180
atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg 240
gaatattatg atgatccgca ttatgatgtt gaagcctatc tgaaagagta tgatccgaaa 300
aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cacgcgcacg tagccagaaa 360
aaacagaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgg 420
aaagatgcc aattgtggg tgggtgtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc 480
cgcaacatcg aatttgaagc accggttgat tttttccg aatgggatcc gaccgatgg 540
gaatatggcg aatggaatag cgaatatgat agcattacca tcgaaagcag ccatcatatt 600
tggatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccg ataaaagcct gggcacctat 660
tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc gactggata tcaaaaatag cagcgatttt 720
atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgagcctgat tggttcaagc 780
gatagccgta aaaccgatga aggtcatctg aaagttacc tgcatcaca ctattacaaa 840
aatgttacc agcgtctgcc tcgtgttcgt tttggtcagg ttcatatcta taacaactac 900
tatgagttta gcaacctggc cgattatgac tttcagtatg catggggtgt tgggtgtgaa 960
agcaaatct atgccagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga cccgagcaaa 1020
attatcaaag tttggagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcggtag gattgttgat 1080
ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataatgaaag caataccctg 1140
cagctgaaaa aagaggttg ttggaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg 1200
agcgttccg cactggttaa agcaaaagcc ggtgcaggta atctgcat 1248

```

<210> 10

5 <211> 1248

<212> ADN

<213> Bacillus spec.

<400> 10

ES 2 821 648 T3

```

aaagaactgg gtcataaagt tctgaaaccg tatgatgggt gggcagcgta tggatgaagg      60
acaaccgggtg gtgcaatggc aagtccgcag aatgtttttg ttgttaccaa tcgtaccgaa      120
ctgattcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaatc      180
atctatgtga aaggcaccat tgatctgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg      240
gattttctata aagatccgca ttttgatttt gaggcctatc tgcgtgaata tgatccggca      300
acctggggta aaaaagaagt tgaaggtccg ctggaagaag cacgcgttcg tagccagaaa      360
aaacagaaag atcgtatcat ggtttatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgt      420
aaagacgcga aaatcaaagg tgggtggtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc      480
cgcaacatcg aatttgaagc accgctggat tattttccgg aatgggatcc gaccgatggc      540
accctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattagca ttgaaggcag cagccatatt      600
tggattgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg atcgtagcct gggcacctat      660
tttggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc ctgctggata tcaaaaatag cagcgatttt      720
atcaccatca gctacaacgt gtttaccaac cacgataaag ttaccctgat tggatgaagc      780
gatagccgta tggcagatag cggatcatctg cgtgttaccg tgcatcacia ttattacaaa      840
aatgttaccg agcgtctgcc tctgttctgt tttggtcagg ttcatatcta taacaactac      900
tatgagttta gcaacctggc cgattatgat tttcagtatg catgggggtg tgggtgtgtt      960
agccagattt atgcacagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga tccgagcctg     1020
attatcaaag tttggagcaa aaatgaagaa agcatgtatg aaaccggcac catcgttgat     1080
ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataatgaaag caataccctg     1140
cagctgaaaa aagaggttac ctggaaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg     1200
agcgttccgg cactggttaa agcaaaagcc ggtgcaggta atctgcat                       1248

```

<210> 11

<211> 1248

5

<212> ADN

<213> Bacillus spec.

<400> 11

```

aaagaactgg gtcataaagt gctgaaaccg tatgatgggt gggcaagcta tggatgaagg      60

```

ES 2 821 648 T3

acaaccggtg gtagcatggc aagtcgcag aatgtttata ccgttaccaa taaaaccgaa	120
ctgggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccgt gccgaaaatc	180
atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg	240
gaattctata aagatccgca ttatgatgtt gaagcctatc tgaaagagta tgatccgaaa	300
aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cacgcgcacg tagccagaaa	360
aaacagaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgg	420
aaagatgcc aattgtggg tgggtgtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc	480
cgcaacatcg aatttgaagc accggtggat tattttccgg aatgggatcc gaccgatggc	540
accctgggtg aatggaatag cgaatatgat agcattacca ttgaaggcag ccatcatatt	600
tggatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg ataaaagcct gggcacctat	660
tttgggtcgtc cgtttcagca gcatgatggc ctgctggata tcaaaaatag cagcgatttt	720
atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgaccctgat tgggtgcaagc	780
gatagccgta tggcagatga aggtcatctg cgtgttacct tgcatacaaa ttattacaaa	840
aatgttacct agcgtctgcc tcgtgttctg tttgggtcagg ttcatatcta taacaactac	900
tatgagttta gcaacctggc cgattatgac tttcagtatg catggggtgt tgggtgttgaa	960
agcaaatct atgccagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga cccgagcaaa	1020
attatcaaag tttggagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcggtag gattgttgat	1080
ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataataagaa caataccctg	1140
cagctgaaaa aagaggttgg ttggaaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg	1200
agcgttccgg cactggttaa agcaaaagcc ggtgcaggta atctgcat	1248

<210> 12

<211> 1248

5

<212> ADN

<213> Bacillus spec.

<400> 12

aaagaactgg gtcgatgtgt gctgaaaccg aatgatggtt gggcaagcta tgggtgaaggt	60
acaaccggtg gtagcgaagc aagtcgggat aatgtttata ccgttaccaa taaaagcgaa	120
ctgggttcagg cactgggtgg taataatcat accaatcagt ataattccac cccgaaaatc	180
atctatgtga aaggcaccat tgaactgaac gtggatgata ataatcagcc ggttgggtccg	240
gaatattatg atgatccgca ttatgatgtt gaagcctatc tgaaagagta tgatccgaaa	300
aaatggggca aaaaagaagt tagcgggtccg ctggaagaag cacgcgcacg tagccagaaa	360
aaacagaaag aacgtattgt tgtgaatgtg ggtagcaaca ccagcattat tgggtgttgg	420
aaagatgcc aattgtggg tgggtgtttc ctgattaaaa acgtggataa tgtgatcatc	480

ES 2 821 648 T3

cgcaacatcg aatttgaagc accggttgat ttttttccgg aatgggatcc gaccgatggt 540
gaatatggcg aatggaatag cgaatatgat agcattacca tcgaaagcag ccatcatatt 600
tggtatcgatc acaatacctt taccgatggc gatcatccgg ataaaagcct gggcacctat 660
tttggctcgtc cgtttcagca gcatgatggc ctgctggata tcaaaaatag cagcgatttt 720
atcaccatca gctacaacgt gtttaaagac catgataaag tgagcctgat tggttcaagc 780
gatagccgta aaaccgatga aggtcatctg aaagttaccc tgcatacaaa ctattacaaa 840
aatgttaccc agcgtctgcc tcgtgttcgt tttggtcagg ttcatatcta taacaactac 900
tatgagttta gcaacctggc cgattatgac tttcagtatg catggggtgt tgggtgtgaa 960
agcaaatct atgccagaa caactatttc agcttcgatt gggatattga cccgagcaaa 1020
attatcaaag tttggagcaa aaacgaagaa agcatgtatg aaagcggtag gattgttgat 1080
ctgccgaatg gtcgtcgtta tattgatctg gttgcaagct ataataaag caataacctg 1140
cagctgaaaa aagaggttggt ttggaaaccg atgttctatc atgttattca tccgaccccg 1200
agcgttccgg cactggttaa agcaaaagcc ggtgcaggta atctgcat 1248

<210> 13

<211> 24

5

<212> ADN

<213> Bacillus Spec

<400> 13

gaaattaata cgactcacta tagg 24

10

<210> 14

<211> 37

<212> ADN

<213> Bacillus Spec

15

<400> 14

gccatcatgc tgctgaaacg gacgaccaa ataggtg 37

<210> 15

20

<211> 39

<212> ADN

<213> Bacillus Spec

ES 2 821 648 T3

<400> 15

ggtcgtccgt ttcagcagca tgatggcctg ctggatata 39

<210> 16

5

<211> 27

<212> ADN

<213> Bacillus Spec

<400> 16

10

ggttatgcta gttattgctc agcgggtg 27

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un resto de leucina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 y en donde la actividad de pectato liasa es independiente del calcio y/o en donde el polipéptido tiene una termoestabilidad mejorada, en comparación con un polipéptido con una secuencia de aminoácidos por lo demás idéntica, en donde el resto en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 no es un resto de leucina.
2. Polipéptido según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 % idéntica a la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, tal como 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 %.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido es un polipéptido aislado.
4. Ácido nucleico que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3.
5. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4.
6. Composición que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 o un ácido nucleico o un vector según la reivindicación 4 o 5.
7. Célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4 o un vector según la reivindicación 5.
8. Célula hospedadora recombinante según la reivindicación 7 seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, hongos filamentosos, levadura y células de insecto.
9. Método de producción de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, que comprende las etapas de:
 - a. cultivar una célula hospedadora recombinante según la reivindicación 7 u 8 en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido, y
 - b. recuperar el polipéptido obtenido, y
 - c. opcionalmente purificar dicho polipéptido.
10. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en una aplicación seleccionada del grupo que consiste en deslignificación de pulpa, degradación o disminución de la integridad estructural de material lignocelulósico, blanqueo de colorantes textiles, desintoxicación de aguas residuales, desintoxicación xenobiótica, producción de un azúcar a partir de un material lignocelulósico y recuperación de celulosa de una biomasa.
11. Método de mejora de la termoestabilidad de un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, comprendiendo el método la etapa de cambiar el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina.
12. Método de disminución, supresión o retirada de la dependencia del calcio de un polipéptido con actividad de pectato liasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, comprendiendo el método la etapa de cambiar el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 1 a un resto de leucina.

Figura 1

