



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 284 650**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 9/02 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01936492 .6**

⑧6 Fecha de presentación : **23.05.2001**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1294859**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

⑤4 Título: **Nueva enzima de lacasa y el gen que la codifica.**

③0 Prioridad: **23.05.2000 FI 20001240**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

⑦3 Titular/es:
VALTION TEKNILLINEN TUTKIMUSKESKUS
Vuorimiehentie 5
02044 VTT, FI

⑦2 Inventor/es: **Kruus, Kristiina;**
Kiiskinen, Laura-Leena;
Rättö, Marjaana;
Viikari, Liisa y
Saloheimo, Markku

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Nueva enzima de lacasa y el gen que la codifica.

5 La invención se refiere a nuevas enzimas de lacasa. El objeto de la invención es una nueva enzima de lacasa, una preparación de enzima, y un gen que codifica la enzima en particular. Otro objeto de la invención es el uso de lacasa en varias aplicaciones.

10 Las lacasas (documento EC 1.10.3.2) pertenecen a las oxidasas de cobre azul. De acuerdo a una definición, las lacasas son oxidasas de p-difenol. Además de los difenoles, las lacasas oxidan muchos otros sustratos, tales como diaminas y fenoles sustituidos con metoxi. Con respecto a sus sustratos, las lacasas son sorprendentemente no específicas. Principalmente debido a su amplia especificidad de sustrato y, por el otro lado, su capacidad para oxidar compuestos fenólicos, las lacasas han originado un gran interés en aplicaciones industriales. Los campos prometedores de aplicación de lacasas incluyen, por ejemplo, deslignificación y el encolado de tablas de fibra en la industria forestal, 15 tintura de telas y destoxificación de efluentes locales de tinte en la industria textil, así como el uso en diferentes biosensores. Con la ayuda de mediadores, es decir, moléculas intermedias, las lacasas también oxidan sustratos que de otra manera no serían capaces de oxidarse. Los mediadores son compuestos de molécula pequeña que se oxidan por lacasas. El mediador oxidado, a su vez, oxida el sustrato actual.

20 La primera lacasa se encuentra en 1883 en el árbol de laca Japonés (*Rhus vernicifera*). Se han encontrado lacasas en muchas plantas, tales como, durazno, tomate, mango, y papa; las lacasas también se han encontrado en algunos insectos. Sin embargo, la mayoría de las lacasas se originan en hongos de descomposición blancos. Los siguientes géneros, por ejemplo, producen lacasa: *Agaricus*, *Aspergillus*, *Cerrena*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Lentinus*, *Monocillium*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Schizophyllum*, *Sporotrichum*, *Stagonospora* y *Trametes*. En naturaleza, el funcionamiento de las lacasas se relaciona con la descomposición de lignocelulosa, la biosíntesis de las paredes celulares, las reacciones de tostado de la fruta y vegetales, así como la prevención de ataques microbianos en plantas, entre otros.

30 Muchas lacasas fúngicas se han aislado y algunos genes que las codifican se han clonado. Por ejemplo, Saloheimo *et al.*, (1985) aislaron y caracterizaron el gen de lacasa de la *Phlebia radiata*, y Kojima *et al.*, (1990) los genes de lacasa de la *Coriolus hirsutus* de hongos de descomposición blancos, y Berka *et al.*, (1997) WO 95/33836, el gen de la lacasa *Myceliophthora thermophila*. Los niveles de producción naturales con frecuencia son muy bajos. Se han hecho esfuerzos para mejorar la producción al expresar los genes de lacasa en huéspedes de producción externos. Por ejemplo, Saloheimo y Niku-Paavola (1991; documento WO 92/01046) producen exitosamente lacasa *Phlebia radiata* 35 en el hongo *Trichoderma reesei*. Las lacasas también se han producido heterológamente, en el hongo *Aspergillus oryzae* (Yaver *et al.*, 1996, Berka *et al.*, 1997 y documento WO 95/33836), y en la levadura *Pichia pastoris* (Jönsson *et al.*, 1997).

40 La expresión de una lacasa que se origina en el género *Coprinus* en el hongo del género *Aspergillus* se describe en la publicación de patente WO 97/08325. De manera similar, la expresión de la lacasa que se origina en las especies *Polyporus pinsitus* y la lacasa que se origina en el género *Scytalidium* en el hongo del género *Aspergillus* se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos 5.770.418 y Estados Unidos 5.843.745, respectivamente.

45 Las propiedades de pH y temperatura de las lacasas aisladas de varios organismos difieren entre sí. También depende del sustrato utilizado. Como la mayoría de las lacasas que se conocen funcionan mejor en un pH ácido y una temperatura preferiblemente baja, sus propiedades no son óptimas para las aplicaciones. Algunas lacasas termoestables o neutras se han reseñado pero, generalmente, las lacasas termoestables o neutras son ya sea termoestables o neutras, pero no ambas. Por ejemplo, Heinzkill *et al.*, (1998) encontraron lacasas con un pH inusualmente elevado, óptimo del hongo del género *Coprinaceae*. Sin embargo, en 60 minutos, la actividad de todas las lacasas que se encontraron se reducen por debajo de 30% del nivel inicial a 60°C. Una patente (documento WO 96/06930) se ha aplicado para el uso de estas lacasas para blanquear tintes de textil, pero la aplicación no menciona la actividad de estas lacasas a temperaturas elevadas. Los ejemplos de aplicación se hacen a una temperatura de 30-35°C. La solicitud de patente WO 95/07988 describe una lacasa neutra del hongo *Rhizoctonia solani*, pero la aplicación no estudia la aplicabilidad de esta lacasa a temperaturas elevadas en adición a condiciones alcalinas. Por el otro lado, la solicitud de patente WO 98/55628 describe una lacasa termoestable de la cepa *Trametes versicolor* TV-1, pero de acuerdo con la patente, la actividad de esta lacasa es mejor a pH 2. La lacasa *Trametes versicolor* TV-1 no es de pH estable; su actividad residual a pH 6 después de 60 minutos de incubación es aproximadamente 60% del original. La solicitud de patente WO 95/33836 describe una lacasa *Myceliophthora thermophila* neutra que en tintes para cabello funciona a pH 7, pero la temperatura en el ejemplo de aplicación fue 30°C. La publicación Berka *et al.*, (1997) reseña 60 que la lacasa *Myceliophthora thermophila* mantiene 100% de su actividad a 60°C durante 2 minutos y su actividad óptima es a pH 6,5.

Las publicaciones de patente JP8070861 y JP9056378 describen lacasas *Trametes*, que se han reseñado que son termoestables y su pH óptimo se ha reseñado que es 5,0. Además, Diamantidis *et al.*, (2000) ha caracterizado una lacasa bacteriana de la bacteria *Azospirillum lipoferum*. Reseñan que la lacasa fue termoestable durante 10 min a 70°C y el pH óptimo fue 6,0.

La publicación de Bharathi y Ramalingam (1993) describe la fenoloxidasa de una almeja, su actividad máxima siendo a pH 6,8 y más del 50% de su actividad manteniéndose cuando se incubaba a 60°C durante 10 min. La publicación de patente EP-A1-0852260 describe polifenoloxidasas de las especies del género *Myrothecium*, su pH óptimo siendo 8,5-9 y la temperatura óptima a 60-70°C. Se sabe que los hongos del género *Myrothecium* producen toxinas.

5 Cuando se compara con la temperatura y los valores óptimos de pH especificados para varias enzimas, debe observarse que el sustrato utilizado tiene un efecto en los valores. Los sustratos fenólicos, tales como guayacol y siringaldazina, proporcionan valores más elevados que los sustratos no fenólicos, tales como ABTS.

10 Las siguientes publicaciones de patente sugieren el uso de lacasas en aplicaciones que procesan madera: documentos WO 9954545, Estados Unidos 5,691,193, DE 4137761, EP 408803 y WO 9523232.

El documento WO 37 19 999 describe una lacasa con propiedades de tinción mejoradas.

15 El propósito de esta invención es eliminar las desventajas relacionadas con la técnica anterior y proporcionar una nueva clase de preparación de enzima que contiene actividad de la lacasa. Especialmente, la preparación de enzima puede utilizarse en aplicaciones, que necesitan tolerar tanto temperaturas elevadas como un pH elevado. Existen tales aplicaciones, por ejemplo, en la industria de procesamiento de madera y otras industrias de procesamiento.

20 La presente invención introduce una nueva lacasa que tiene tanto mejores propiedades de pH como de temperatura, y especialmente la estabilidad térmica, que las lacasas conocidas en aplicaciones que requieren un pH alcalino o neutro y una temperatura por encima de 40°C.

25 Para ser más preciso, el objeto de la invención es la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y el polipéptido de acuerdo una enzima de lacasa de acuerdo con la reivindicación 15.

La enzima de lacasa de acuerdo a la invención puede aislarse de las cepas del género *Melanocarpus*. Hasta donde sabemos, la lacasa no aislada de las cepas del género *Melanocarpus* se ha descrito anteriormente. La lacasa de acuerdo con la invención puede aislarse preferiblemente de las cepas de las especies *M. albomyces*, especialmente de la cepa IMI 255989, muestras de las cuales se encuentran disponibles libremente de la colección de la cepa GRC del Centro CABI RU de CABI Bioscience (Egham) (Bakeham Lane Egham Surrey DW20 9Ty, RU). La cepa se deposita en la colección en 1981. En 1996, la cepa se deposita también en la Colección de Cultivo de VTT Biotechnology (Centro de Investigación Técnico de VTT de Finlandia, en la dirección: VTT Bioteekniikka, PL1500, 02044 VTT, Espoo, Finlandia) y dando el número VTT-D-96490. Las muestras de esta disposición también se encuentran libremente disponibles. Esta cepa se describe en la publicación de Ravanko (1996), que estudia la actividad de la lacasa de la solución de cultivo de la cepa a varias temperaturas y valores de pH. Sin embargo, la publicación no describe el aislamiento y la purificación de la lacasa.

30 La enzima lacasa de acuerdo a la invención funciona arriba del rango de pH 3-9, preferiblemente 4-8, más preferiblemente 5-8, aún más preferiblemente 6-8, más preferiblemente 6,5-7,5. La actividad de la lacasa se encuentra en su punto más elevado arriba del rango de pH 7-8, el más elevado a aproximadamente 7,5. De esta manera, el pH óptimo de la enzima es demasiado amplio y varía arriba del pH 5-7,5; preferiblemente el pH óptimo es 7,5. La actividad de la enzima se encuentra en su punto más elevado dentro de 30-80°C, preferiblemente dentro de 40-80°C, más preferiblemente dentro de 50-80°C, aún más preferiblemente dentro de 60-80°C, más preferiblemente dentro de 60-70°C. La mejor actividad de la enzima ocurre a una temperatura de aproximadamente 70°C.

40 La lacasa de acuerdo con la invención mantiene bien su actividad a temperaturas elevadas. En las condiciones descritas en el Ejemplo 3, más del 50% de la actividad de la lacasa de la solución de cultivo permanece después de incubarse a 60°C durante 1 hora. Después de incubarse a 70°C durante 15 min, aproximadamente 30% de la actividad de la enzima permanece, y después de incubarse a 70°C durante 30 min, aproximadamente 10%. A 80°C, la enzima resiste la incubación por aproximadamente 5 min en las condiciones descritas en el Ejemplo 3. En algunas aplicaciones, por ejemplo, en la industria forestal, aún una tolerancia durante un corto periodo de tiempo a temperaturas elevadas proporciona ventajas considerables. Cuando se estudia más la actividad de la enzima pura, se descubre que la estabilidad térmica de la enzima fue excepcionalmente buena y claramente mejor que aquella de las lacasas previamente descritas.

55 A 60°C, la enzima mantiene su actividad esencialmente sin cargar durante 2 horas, como se indica por el Ejemplo 3 y la Figura 7. La estabilidad térmica de la lacasa *Myceliophthora* caracterizada por Berka *et al.*, (1997) permaneció a 60°C durante 20 min solamente.

Además, la estabilidad de pH de la enzima de lacasa de acuerdo a la invención mejora, cuando el pH aumenta. Después de incubación de 22 horas a pH 4, la actividad residual es 65%, la actividad residual en las mismas condiciones a pH 5 es aproximadamente 80%, la actividad residual a pH 6 es aproximadamente 85%, la actividad residual a pH 7 es aproximadamente 90%, y a pH 8 tanto como por arriba de 90%, aproximadamente 92%. Junto con el pH óptimo, esta propiedad hace ventajoso utilizar la enzima de acuerdo con la invención a valores de pH elevados.

65 El punto isoeléctrico de la lacasa de acuerdo con la invención es aproximadamente 4.0 cuando se mide por enfoque isoeléctrico, mediante lo cual la exactitud de la definición es aproximadamente $\pm 0,5$.

ES 2 284 650 T3

Cuando se determina por SDS-PAGE, el peso molecular de la lacasa de acuerdo con la invención es aproximadamente 80 kDa. La exactitud de la definición de SDS-PAGE es en el orden de +/- 5 kDa.

La lactasa de la invención, cuando se purifica, tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,0 como se mide por enfoque isoeléctrico, y un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. El pH óptimo de la lacasa es aproximadamente 7,5 y la temperatura óptima aproximadamente 70°C cuando se mide con una enzima purificada. La lacasa puede aislarse de las cepas del género *Melanocarpus*, preferiblemente de las cepas del género *Melanocarpus albomyces*, más preferiblemente de la cepa IMI 25598 de *M. albomyces*. Otro objetivo de la invención es una enzima de lacasa purificada y aislada.

Un objeto adicional de la invención es una preparación de enzima que contiene la enzima de lacasa de acuerdo con la invención. La cantidad de enzima de lacasa en la preparación de enzima es preferiblemente más elevada que aquella de las cepas del género *Melanocarpus*, especialmente las cepas de las especies *Melanocarpus albomyces*, especialmente la cantidad de la enzima naturalmente producida por la cepa IMI 255989 de *M. albomyces* en su solución de cultivo en condiciones de crecimiento, que no se optimizan para producir lacasa. La cantidad de lacasa en la preparación de enzima es preferiblemente arriba de 10 mg/l, más preferiblemente ≥ 30 mg/l, aún más preferiblemente ≥ 300 mg/l, aún más preferiblemente; ≥ 500 mg/l; más preferiblemente ≥ 1 g/l.

Como se establece arriba, la lacasa de acuerdo con la invención puede aislarse de las cepas del género *Melanocarpus*, especialmente de las cepas de las especies *Melanocarpus albomyces*, especialmente de la cepa IMI 255989 de *M. albomyces*, pero también puede producirse por la técnica de recombinación al aislar los genes que codifican las lacasas de acuerdo con la invención y transferirlas en un huésped de producción adecuado.

La lacasa de acuerdo a la invención puede producirse en la solución de cultivo de su huésped natural o un huésped de producción, de donde puede aislarse y purificarse al utilizar procedimientos conocidos de química de proteína. Si la solución de cultivo contiene una cantidad elevada suficiente de lacasa, pero no otras proteínas dañinas, la solución de cultivo puede utilizarse como tal al separar simplemente las células. La solución de cultivo puede concentrarse posiblemente. En diferentes aplicaciones, es preferible utilizar una preparación de enzima que contiene una cantidad incrementada de lacasa. La cantidad incrementada de lacasa puede prepararse al producir la enzima de lacasa en la solución de cultivo del huésped de producción por medio de tecnología recombinante. La cantidad incrementada se refiere a una cantidad de enzima de lacasa, que excede la cantidad de enzima de lacasa naturalmente producida por las cepas del género *Melanocarpus*, especialmente la cepa *M. albomyces*, especialmente la cepa IMI 255989.

Un objeto adicional de la invención es una preparación de enzima que contiene una cantidad esencial de la enzima de lacasa de acuerdo a la invención. Esto significa que la lacasa es la actividad principal de la preparación de enzima sin ninguna cantidad considerable de otras enzimas. Un objeto adicional de la invención también es una preparación de enzima que contiene una lacasa que puede aislarse del hongo del género *Melanocarpus*, y los aditivos que se necesitan para la aplicación respectiva. Tales aditivos pueden comprender, por ejemplo, tampones y estabilizadores.

Un objeto de la invención es también una molécula de ácido nucleico que codifica lacasa. La molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende:

una molécula de ácido nucleico que comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1;

una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2;

una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación que difiere de la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 debido a la degeneración del código genético;

una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1; y

una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene actividad de la lacasa y la secuencia de aminoácidos de la cual se muestra al menos 73% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

La invención también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos, la secuencia de aminoácidos de la cual se muestra al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad; más preferiblemente al menos 95% de identidad. Es más preferible si la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de acuerdo a la invención muestra al menos 99% de identidad con ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de la Figura 15. Si se valora la similitud en la base de aminoácidos homólogos, la invención incluye las moléculas de ácido nucleico, que codifican los polipéptidos, la secuencia de aminoácidos de la cual es al menos 83% homóloga a SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de la Figura 15, preferiblemente al menos 85% homóloga, más preferiblemente al menos 90% homóloga, aún más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99% homóloga a SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de la Figura 15.

La invención también incluye las moléculas de ácido nucleico, que se hibridizan a la secuencia SEQ ID NO:1 en condiciones de hibridización, donde la solución de hibridización contiene reactivo de 5XDenhardt 6XSSC, 0,5% SDS, 100 µg/ml de ADN desnaturalizado, y la hibridización se lleva a cabo a 50-60°C. Otra alternativa es que la solución de hibridización contiene reactivo de 5XDenhardt 6XSSC, 0,5% SDS, 100 µg/ml de ADN desnaturalizado, 50% de formamida y, en ese caso, la hibridización se lleva a cabo a 25-35°C. La invención especialmente incluye aquellas moléculas de ácido nucleico, que se hibridizan a la secuencia SEQ ID NO: 1 en condiciones severas, mediante lo cual la hibridización se lleva a cabo de acuerdo con la primera alternativa, de otro modo en las mismas condiciones, pero a 68°C y, de acuerdo con la segunda alternativa, a 42°C. 50x Denhardt es 10 g/l de Ficoll, 10 g/l de pirrolidona de polivinilo, 10 g/l de albúmina de suero de bovino y SSC es 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de sodio, pH 7,0.

Las moléculas de ácido nucleico se refieren a ADN, ARN o, por ejemplo, ADNc.

La invención también se refiere a polipéptidos, que tienen actividad de la lacasa y que se codifican por las moléculas de ácido nucleico definidas arriba. La invención se refiere además a polipéptidos, la secuencia de aminoácidos de los cuales, en la manera descrita arriba, es idéntica u homóloga con SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de la Figura 15.

La invención también se refiere a un procedimiento para producir lacasa, que comprende las siguientes etapas:

una molécula de ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención se transfiere en una célula huésped de microorganismo para expresar la molécula de ácido nucleico y, opcionalmente, para secretarla de la célula huésped; y

un polipéptido que tiene actividad de la lacasa se recupera ya sea de las células o la solución de cultivo del huésped de microorganismo.

La lacasa de acuerdo con la invención se adecua excepcionalmente bien a las aplicaciones industriales, en donde las condiciones de temperatura y pH prevalecientes son elevadas. Tales aplicaciones incluyen aquellas de la industria forestal, que afectan la lignina o extractores (ya sea directamente o mediante mediadores), fabricación de tableros y productos de fibra de fibras que contienen lignina mecánicamente triturada, mejora del funcionamiento de las máquinas de papel, y otras aplicaciones, oxidación de polímeros, tales como lignina, celulosa y/o almidón (ya sea directamente o mediante mediadores), así como la oxidación de otros químicos, tales como alquenos o moléculas de color. En estas aplicaciones, la temperatura con frecuencia es arriba de 60°C, generalmente tan alta como 80°C, y el pH está próximo a neutro, o ligeramente más elevado. La enzima de acuerdo con la invención funciona extremadamente bien en condiciones, en donde tanto el pH como la temperatura son simultáneamente elevadas.

A continuación, la invención se describe en detalle con la ayuda de los ejemplos y figuras anexas.

La Figura 1 muestra la producción de la lacasa de *M. albomyces* en cultivo de matraz agitado.

La Figura 2 muestra la actividad de la lacasa y el contenido de proteína de varias fracciones en cromatografía de intercambio de anión.

La Figura 3 muestra la actividad de la lacasa y el contenido de proteína de varias fracciones en cromatografía de interacción hidrófoba.

La Figura 4 muestra la dependencia de la actividad de la lacasa de *M. albomyces* con la temperatura.

La Figura 5 muestra la actividad de la lacasa de *M. albomyces* a diversos valores de pH.

La Figura 6 muestra la actividad residual de la lacasa de *M. albomyces* a diversas temperaturas.

La Figura 7 muestra la actividad residual de una lacasa de *M. albomyces* pura a diversas temperaturas.

La Figura 8 muestra la actividad residual de la lacasa de *M. albomyces* a diversos valores de pH después de 22 horas de incubación.

La Figura 9 muestra la capacidad de las lacasas de *M. albomyces* y *T. hirsuta* para formar color de 2,6-dimetoxifenol a 40°C a diversos valores de pH. La cantidad de lacasa fue 15 nkat/mmol de sustrato.

La Figura 10 muestra la capacidad de las lacasas de *M. albomyces* y *T. hirsuta* para formar color de 2,6-dimetoxifenol a 60°C a diversos valores de pH. La cantidad de lacasa fue 30 nkat/mmol de sustrato.

La Figura 11 muestra la decoloración de un tinte textil bajo el efecto de las lacasas de *Melanocarpus* y *Trametes*.

La Figura 12 muestra la polimerización de una sustancia modelo de lignina bajo el efecto de las lacasas de *Melanocarpus* y *Trametes* a 40°C.

ES 2 284 650 T3

La Figura 13 muestra la polimerización de una sustancia modelo de lignina bajo el efecto de las lacasas de *Melanocarpus* y *Trametes* a 60°C.

La Figura 14 muestra la polimerización de compuestos solubles que originan lignina y extractores bajo el efecto de las lacasas de *Melanocarpus* y *Trametes* a 70°C.

La Figura 15 muestra un gen que codifica la lacasa de *Melanocarpus albomyces*, y una secuencia de aminoácidos correspondiente.

El término “preparación de enzima” utilizado en esta solicitud se refiere a cualquier producto que contiene la actividad de la enzima de lacasa. La preparación de enzima puede ser, por ejemplo, una solución de cultivo que contiene lacasa, una lacasa aislada o una mezcla de enzimas, al menos un componente de la cual es una lacasa. La preparación de enzima también puede contener varios aditivos, tales como estabilizadores o tampones. Se seleccionan por ser adecuados para la aplicación respectiva de la preparación de la enzima de lacasa. La preparación de enzima también puede contener otras actividades de enzima, tal como actividad de peroxidasa, dependiendo de la aplicación de la preparación de enzima.

La preparación de enzima que contiene lacasa también puede contener un mediador adecuado, que se utiliza para aumentar la operación de la lacasa. Los mediadores adecuados incluyen, por ejemplo, Tempo (=2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi), HBT (=1-hidroxibenzotriazola), ABTS=2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazola-6-sulfonato, ácido violúrico, NHA (=N-hidroxi-acetaniluro).

Selección de microbios que producen lacasa

Los microbios que producen lacasa pueden aislarse de la naturaleza o pueden seleccionarse de cepas ya aisladas e identificadas de colecciones de cultivo al utilizar los procedimientos de selección que se conocen en microbiología. Ya que las lacasas pertenecen a fenoloxidasas, los procedimientos que son adecuados para seleccionar fenoloxidasas se utilizan en las selecciones. Las selecciones pueden llevarse a cabo al estudiar la producción de la enzima ya sea en un cultivo sólido en cultivaciones de placa o en un medio de cultivo líquido al medir la actividad de la enzima.

Cuando se buscan nuevas lacasas que toleran pHs y temperaturas más elevadas que la mayoría de las lacasas conocidas, es digno de atención seleccionar microbios de ambientes, en donde viven en condiciones cálidas y/o alcalinas. Tales ambientes se encuentran, por ejemplo, en abono, pilas de viruta de madera o áreas tropicales.

La producción de fenoloxidasas por los hongos positivos encontrados en la selección puede estudiarse en placas al agregar los sustratos de fenoloxidasas en la parte superior del micelio. Al utilizar estas pruebas de caída, puede descubrirse, si las reacciones positivas en las placas se causan por peroxidasas o lacasas. Los reactivos adecuados incluyen ABTS, siringaldacina, y guayacol, y para observar peroxidasas, peróxido de hidrógeno.

El micro-organismo, que produce fenoloxidasa y que se encuentra como un resultado de la selección se cultiva en un medio adecuado, y la formación de fenoloxidasa en la solución de cultivo se observa por un procedimiento que es adecuado para medir la actividad de fenoloxidasa. El medio de cultivo adecuado para hongos incluye, por ejemplo, extracto de malta y medio de dextrosa de papa, y sustratos adecuados para medir la actividad incluyen ABTS, guayacol, y siringaldacina. Para muchos hongos, la producción de fenoloxidasas requiere un inductor. Estos incluyen, por ejemplo, compuestos aromáticos, materiales que contienen lignina, agentes activos de superficie, ciertas fuentes de carbono, y sulfato de cobre. La actividad de la lacasa puede medirse al utilizar ABTS como un sustrato, la lacasa se oxida en verde oscuro. La medición puede hacerse de acuerdo con el procedimiento de Niku-Paavola *et al.*, (1988). La actividad de la lacasa también puede medirse al utilizar un procedimiento de guayacol de acuerdo con el procedimiento de Paszczynski *et al.*, (1985).

Después de que una cantidad suficiente de una lacasa interesante se ha producido, la enzima se purifica y sus propiedades se caracterizan. Pueden determinarse el comportamiento de temperatura y pH así como también el punto isoeléctrico de la enzima.

Los productores de lacasa también pueden seleccionarse por la homología de las secuencias de los genes de lacasa. En ese caso, los nucleótidos a base de las regiones conservadas del extremo amino de los genes de lacasa pueden utilizarse como cebadores en PCR, y buscando por secuencias de genes, que son homólogas a las lacasas conocidas, en el genoma de varios hongos, por ejemplo.

La determinación de la actividad de la lacasa a varias temperaturas puede llevarse a cabo por el procedimiento ABTS, como se describe en el Ejemplo 1.

El pH óptimo de la lacasa puede determinarse por el procedimiento de guayacol en un tampón adecuado a diferentes valores de pH. Cuando el pH es por arriba de 7, la operación de ABTS en el análisis de actividad se debilita.

La estabilidad térmica puede determinarse al incubar una muestra de enzima a varias temperaturas en un tampón adecuado a cierto pH. La actividad residual de la enzima en cada temperatura puede definirse por el procedimiento ABTS, por ejemplo.

La estabilidad de pH puede determinarse al incubar la muestra de enzima en varios valores de pH en un tampón adecuado. La actividad residual puede determinarse por el procedimiento ABTS, por ejemplo.

Aislamiento y purificación de lacasa

La enzima puede purificarse al utilizar procedimientos convencionales de química de enzima, tales como precipitación de sal, ultrafiltración, cromatografía de intercambio de ion, y cromatografía de interacción hidrófoba. La purificación puede monitorearse por electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. La actividad de la enzima de la enzima purificada a varias temperaturas y valores de pH puede determinarse; de manera similar, el peso molecular y el punto isoelectrico pueden determinarse.

En los ejemplos de esta invención, la producción de lacasa se describe al cultivar la cepa *Melanocarpus albomyces* en un medio de cultivo rico. Durante la cultivo, la actividad de la lacasa se monitorea de acuerdo con el procedimiento ABTS de Niku-Paavola *et al.*, (1988), en base a la generación de un radical de catión de verde oscuro del ABTS bajo el efecto de la lacasa. Sin embargo, la invención no se limita a *M. albomyces* producida en este medio solamente.

La lacasa de *M. Albomyces* se purifica de una solución de cultivo, de la cual las células se remueven mediante filtración o centrifugación. La solución de cultivo se concentra además utilizando ultrafiltración. Una cromatografía de intercambio de anión, y cromatografía de interacción hidrófoba se utilizan para purificación adicional. El valor de corte del peso molecular en la ultrafiltración fue aproximadamente 30 kDa. La cromatografía de intercambio de anión se lleva a cabo a pH 5 en un tampón de acetato, y la lacasa se eluye de la columna con un gradiente lineal creciente de Na_2SO_4 . Las mejores fracciones del intercambio de anión se purifican además por cromatografía de interacción hidrófoba, a pH 5 en un tampón de acetato. La muestra se limite a una concentración de 0.7 M de Na_2SO_4 y eluye con un gradiente lineal decreciente de Na_2SO_4 .

Sin embargo, es posible separar la enzima al utilizar otros procedimientos de purificación conocidos.

Se determinan el tamaño molecular, el punto isoelectrico, y el pH y perfiles de temperatura de la lacasa de *M. albomyces*.

La enzima purificada se refiere a una preparación de enzima, que no tiene otras proteínas además de la banda de lacasa, que puede observarse, como se define por SDS-PAGE y coloración Coomassie. En esta aplicación, la enzima se purifica mediante ultrafiltración, cromatografía de intercambio de anión, y cromatografía de interacción hidrófoba. La pureza de la lacasa obtenida que se encuentra esencialmente libre de otra proteína es $\geq 90\%$.

El tamaño molecular de la lacasa de *M. albomyces* purificada fue 80 kDa, determinada por electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. En enfoque isoelectrico por el equipo de electroforesis Multiphor II (Pharmacia LKB), 4.0 se determina como el punto isoelectrico. La actividad de la lacasa de *M. albomyces* fue más elevada a la temperatura de 70°C y su pH óptimo es 7.5. Después de 2 horas de incubación a 60°C, la lacasa de *M. albomyces* mantuvo 100% de su actividad. Además, su estabilidad de pH mejoró, cuando el pH aumentó.

Producción de lacasa

La lacasa de acuerdo a la invención puede producirse en la solución de cultivo de su huésped natural o un huésped de producción, del cual puede aislarse y purificarse al utilizar procedimientos conocidos de química de proteína. Si la solución de cultivo contiene una cantidad suficientemente elevada de lacasa pero no otras proteínas dañinas, puede ser posible utilizar la solución de cultivo como tal al separar simplemente las células. Cuando así se desea, la solución de cultivo puede concentrarse y/o purificarse. Es preferible utilizar, en varias aplicaciones, una preparación de enzima que contiene una cantidad incrementada de lacasa. Tal preparación de enzima puede prepararse al producir la cantidad incrementada de enzima de lacasa en la solución de cultivo del huésped de producción por medio de tecnología genética. La cantidad incrementada se refiere a una cantidad de enzima de lacasa naturalmente producida por la cepa de *M. albomyces*, cepa IMI 255989 en particular.

La lacasa de acuerdo a la invención también puede producirse mediante técnica recombinante al aislar los genes que codifican las lacasas de acuerdo a la invención y al transferirlas a un huésped de producción adecuado. Los genes que codifican la lacasa pueden aislarse de una biblioteca de ADNc en cualquiera de las siguientes maneras. La biblioteca de ADNc puede construirse en un vector de expresión de levadura adecuado y transformarse en levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo. Los clones que producen lacasa se identifican, por ejemplo, en la base de actividad al utilizar placas que contienen sustrato ABTS. Otra posibilidad es conectar la biblioteca de ADNc a un vector λ ZAP e infectar las células *Escherichia coli* con el banco de producción obtenido. Los clones que codifican la lacasa se identifican ya sea con la ayuda de un anticuerpo policlonal o hibridación de ADN. Si se utilizan anticuerpos policlonales, se producen contra una proteína de lacasa purificada en un conejo, por ejemplo. En hibridación, los fragmentos del gen de lacasa proporcionados por PCR se utilizando como una sonda. En ese caso, las secuencias de los cebadores de la PCR ya sea se basan en las regiones generalmente conservadas en los genes de lacasa (por ejemplo, regiones que corresponde a los aminoácidos del centro activo) y/o en la secuencia del extremo de terminal amino de la proteína de lacasa purificada o aquella de un péptido interno. Además, la región oligodT unida a la región poliA de la parte posterior de cada ARN mensajero puede utilizarse como cebador de PCR.

Se secuencian los ADNcs de lacasa aislados. La conexión entre el ADNc aislado y la enzima aislada puede acerse por secuenciación de aminoácidos, que se hace de la enzima. La copia cromosómica del gen de lacasa puede ya sea aislarse por PCR o de la biblioteca genómica hecha en el vector λ m y las ubicaciones de los intrones pueden establecerse por secuenciación.

Aislamiento del gen de la lacasa de *M. Albomyces*

No fue posible aislar el gen de la lacasa de *M. albomyces* en la base del ARN mensajero y la biblioteca de ADNc. La creación de una biblioteca de ADNc representativa no fue exitosa. Sorprendentemente, se causa un problema por el hecho de que *M. albomyces* produce lacasa en la última fase de cultivo, cuando muchas células ya se han autolizado, y el ARN mensajero parcialmente degradado o es difícil de aislarlo puro. Por lo tanto, en lugar de la biblioteca de ADNc, el gen tiene que aislarse de una biblioteca de gen genómico. El aislamiento del gen se describe en detalle en el Ejemplo 9.

La secuencia del gen de lacasa se muestra en la Figura 15 y en el listado de secuencias (SEQ ID NO: 1). La longitud del gen es 2279 pb, incluyendo intrones. Como se muestra en la Figura 15, el número de la base que inicia la región de codificación es 286, los intrones se encuentran en las posiciones 541-618, 698-770, 783-869, 1913-1999, 2069-2150. La última base de codificación es 2561.

El gen codifica un polipéptido de una longitud de 623 aminoácidos. Cuando se compara con la secuencia de aminoácidos, al utilizar el procedimiento Blast (Altschul *et al.*, 1990), con la secuencia de aminoácidos de Myceliophthora descrita en la solicitud de patente WO 9533836, se descubre que las secuencias de aminoácidos fueron 72% idénticas (identidades 450/623, 72%) y 82% homólogos (positivos 518/623, 82%; positivo se refiere a aminoácidos homólogos), (espacios = 4/623, 0%).

Cuando se hace una comparación correspondiente con lacasa de Podospora anserina (Fernandez-Larrea y Stahl, 1996), se descubre que las secuencias fueron 68% idénticas (identidades 427/627, 68%), y 79% homólogas (positivas 502/627, 79%) (espacios = 12/627, 1%).

El gen de lacasa aislado se utiliza en producción de proteína en otros organismos. Tales huéspedes de producción incluyen los sistemas de producción de Aspergillus mencionados arriba, tales como *A. oryzae* o *A. niger* (EU 5,843,745, EU 5,770,418, WO 9708323 y WO 9533836), el sistema de producción desarrollado para el hongo Trichoderma (EP 244 234), o el sistema de producción desarrollado para especies fúngicas de Fusarium, tal como *F. oxysporum* (Malardier *et al.*, 1989), los sistemas de producción desarrollados para una bacteria Bacillus, tal como bacteria *B. subtilis* o *E. coli*, las levaduras Saccharomyces, Shizosaccharomyces *Pichia pastoris*, o un actinomiceto Streptomyces o alguna otra célula de mamífero o microbio.

Optimización de la producción de lacasa

La producción de lacasa también puede mejorarse al optimizar las condiciones de cultivo y el medio de cultivo de una cepa recombinante o silvestre. Cuando se optimiza el medio de cultivo, por ejemplo, el efecto de la calidad (entre otros, una fuente orgánica o inorgánica de nitrógeno) y la cantidad de la fuente de nitrógeno en la producción de la casa. Cuando se necesita, la fuente de nitrógeno se limita con objeto de lograr una producción más elevada. De manera similar, el efecto de la fuente de carbono se establece. Una fuente de carbono que es óptima para la producción de enzima se selecciona. Cuando se necesita, la cantidad de fuente de carbono también puede limitarse. La proporción de carbono/nitrógeno se optimiza para que sea la mejor para la producción de enzima. Las condiciones de crecimiento se optimizan para que sean las mejores posibles para la producción de enzima en cuestión. El microbio se desarrolla a un pH y temperatura óptima para la producción de enzima.

El mezclado apropiado y suministro de aire garantiza una aeración óptima durante la fermentación. En fermentación, los inductores de la producción de lacasa, tales como alcohol de veratrilo, xilidina o lignina pueden también utilizarse. Se optimizan el modo y tiempo para agregar los inductores, así como su concentración.

Uso de lacasa en diversas aplicaciones

Generalmente, la lacasa de acuerdo con la invención se estudia bien para utilizarse en aplicaciones, en donde las lacasas pueden utilizarse, tales como formación de gel, pegamento de fibras, tratamiento de corcho, retiro de tinte (especialmente tintes de textil), tintura de fibras, tratamiento de proteína, detergentes, aplicaciones anti-microbiales, aplicaciones de almidón, oxidación de químicos, retiro de biopelícula, preparación de derivados de lignina, análisis médicos, reducción del encogimiento de madera, endurecimiento, mejora de la conservación de la cerveza, producción de tinte, retiro de oxígeno de productos de aceite, y la producción de yodo. Cuando así se desea, la lacasa de acuerdo con la invención también puede inmovilizarse para ciertos propósitos.

La lacasa de acuerdo con la invención se adecua especialmente bien a aplicaciones industriales, en donde las condiciones de temperatura y pH prevalientes son elevadas. Tales aplicaciones incluyen, entre otras, aplicaciones de la industria forestal, fabricación de tableros y productos de fibra de fibras que contienen lignina mecánicamente triturada, mejora del funcionamiento de las máquinas de papel, y otras aplicaciones, oxidación de polímeros y aquella

ES 2 284 650 T3

de otros químicos, tales como moléculas de tinte. En estas aplicaciones, la temperatura con frecuencia se encuentra arriba de 60°C, generalmente tanto como 80°C, y el pH es casi neutro o ligeramente alcalino.

En todas las aplicaciones, es esencial que suficiente oxígeno se traiga a la reacción. El oxígeno es el sustrato decreciente necesitado por la lacasa. En algunos casos, especialmente cuando la concentración de sustrato es baja, puede haber suficiente oxígeno en la mezcla de reacción como tal pero puede también agregarse ya sea al traer aire u oxígeno o aire enriquecido con oxígeno a la mezcla de reacción.

Cuando sea necesario, los mediadores se utilizan como aditivos en las reacciones.

La lacasa de acuerdo con la invención se adecua bien a la oxidación de agentes colorantes, por ejemplo. Las moléculas de tinte se traen en contacto con la lacasa a pH 4-8, por ejemplo, a pH 4,5-7,5, preferiblemente a pH 6-8, más preferiblemente a pH 7-8, la temperatura encontrándose dentro de un rango de 25-80°C, preferiblemente 40-80°C, más preferiblemente 50-80°C; más preferiblemente 60-80°C. El oxígeno se agrega en la reacción según se necesite. La cantidad de lacasa es 1-1000 nkat/g, preferiblemente 10-500 nkat/g, más preferiblemente 20-200 nkat/g de agente colorante. La reacción se deja tener lugar por 5 min a 24 horas, preferiblemente por 30 min a 2 horas.

La lacasa de acuerdo con la invención también se adecua bien a la polimerización. El compuesto seleccionado a polimerizarse entra en contacto con la lacasa en las mismas condiciones que se describen arriba. La mezcla de reacción puede airearse durante la prueba. La polimerización puede monitorearse al seguir el incremento en el peso molecular del compuesto polimerizado, por ejemplo por GPC (cromatografía de permeación de gel).

La lacasa de acuerdo con la invención también puede utilizarse para mejorar el funcionamiento de máquinas de papel. La lacasa puede utilizarse para mejorar el funcionamiento de las máquinas de papel al polimerizar los compuestos que se originan de lignina y extractores y al reducir el crecimiento dañino de microbios en la máquina de papel. Generalmente, las condiciones en la máquina de papel son aproximadamente pH 5-7 y la temperatura 60-80°C. La lacasa puede agregarse en el agua de proceso o en la caja superior o el sistema de agua de circulación de la máquina de papel sin necesitar esencialmente cambiar las condiciones que prevalecen en la máquina de papel. El pH puede encontrarse 5-8 y la temperatura dentro de 50-80°C. La cantidad de lacasa puede ser 1-1000 nkat/g, preferiblemente 10-500 nkat/g de materia seca, fibras o litros de agua de circulación. El tiempo de tratamiento puede ser 5 min a 24 horas, preferiblemente 30 min a 2 horas.

La lacasa de acuerdo a la invención también puede utilizarse en oxidación de fibras. Las fibras que contienen lignina pueden traerse en contacto con la lacasa a una temperatura de 50-80°C, aún tan elevada como 50-100°C, preferiblemente a una temperatura de 60-80°C, a pH 5-8, preferiblemente a pH 6-8, la concentración de lacasa siendo 1-1000 nkat/g de fibras, preferiblemente 10-500 nkat/g de fibras, el tiempo de reacción siendo 2 min a 24 horas, preferiblemente 10 min a 2 horas. Debido al tratamiento de lacasa, las propiedades de resistencia de las fibras mejoran, las cuales pueden utilizarse, por ejemplo, en la fabricación de tableros de fibra, tales como tableros MDF, o en productos de cartón o papel, que se hacen de fibras que contienen lignina molidas mecánicamente.

Además de los ejemplos de aplicación mencionados arriba, la lacasa de acuerdo con la invención también puede utilizarse en la deslignificación de fibras. La lacasa puede encontrarse en contacto con las fibras que están por deslignificarse, tales como fibras de papel kraft, con el valor kappa siendo 20-30, preferiblemente aproximadamente 25, la consistencia siendo 5-15, preferiblemente aproximadamente 10%, preferiblemente en la presencia de un mediador, la cantidad de mediador siendo 1-5% de la pulpa, preferiblemente 3% de la pulpa, el pH encontrándose dentro de 5-8, preferiblemente dentro de 6-8, la temperatura encontrándose dentro de 50-80°C, preferiblemente dentro de 60-80°C. El tiempo de reacción puede ser entre 5 min a 24 horas, preferiblemente 30 min a 2 horas. La cantidad de lacasa puede ser 10-1000 nkat/g, preferiblemente 10-500 nkat/g en una presión de oxígeno de 0,5 Mpa.

Los siguientes ejemplos proponen la ilustración de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Producción de lacasa de *M. Albomyces*

El hongo de *M. albomyces* se mantiene en placas de avena-agar (Difco). Tanto el inóculo como el medio de producción contienen:

25 g/l de glucosa (AnalaR)

27,5 g/l de extracto de levadura Bacto (Difco)

0,5 mg/ml de AT Indulina (Sigma)

0,04 l/l de solución mineral que contiene:

1,0 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën)

ES 2 284 650 T3

1,0 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën)

0,1 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

5 0,16 g/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

1,0 g/l de Na_2EDTA (Riedel-de Haën)

La solución de glucosa se esterilizó por separado.

10 Primero, 100 ml de medio se inoculó con 3-4 piezas (aproximadamente a 1 cm^2) cortadas del micelio crecido en la pared en agar de harina de avena. La temperatura de cultivo fue 37°C y la velocidad de agitación 120 rpm. Después de 2 días de cultivo, el micelio se homogeneizó, y 900 ml del cultivo estéril se inoculan con 100 ml del inóculo homogeneizado. El volumen del cultivo de producción fue 1 l; la temperatura de cultivo fue 37°C , y la velocidad de agitación 160 rpm. El cultivo se continúa durante 14 días. Se hacen cuatro cultivos paralelos.

15

Análisis de actividad de la enzima

20 La actividad de la lacasa de la solución de cultivo de *M. albomyces* se mide al utilizar ABTS. Lacasa oxida ABTS a un radical de catión de verde oscuro. El análisis de actividad se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Niku-Paavola *et al.*, (1988). La muestra se diluye con 0.025M de tampón de succinato, pH 4.5. 0.350 ml de solución ABTS (11 g/l) se agrega en 1.15 ml de dilución, y la reacción se sigue por 2 minutos por el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 a una longitud de onda de 436 nm.

25 Las actividades de la lacasa medidas de los cultivos de *M. albomyces* se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

Purificación de lacasa de M. albomyces

Determinación del contenido de proteína

30 Los contenidos de proteína se determina por el equipo de Análisis de Proteína DC de Bio-Rad, en base a un procedimiento desarrollado por Lowry *et al.*, (1951). Los análisis se llevan a cabo utilizando los reactivos del equipo, y la intensidad de la reacción de color así formada se mide en una longitud de onda de 750 nm por el espectrofotómetro Hitachi U-2000. En cada momento de medición, también se define una curva estándar utilizando soluciones que contienen 0,25-1,25 g/l de albúmina de suero de bovino (BSA, Bio-Rad).

35

Purificación

40 La solución de cultivo, de la cual las células se han retirado mediante filtración, se ultrafiltra por el equipo de filtración Amicon 8400, utilizando una membrana PM30 (Millipore). En esta filtración, la solución se concentra y se agrega agua destilada de manera que fue posible reducir la conductividad de la solución al nivel requerido por la cromatografía de intercambio de ión. La conductividad se midió al utilizar un instrumento de conductividad de EDV Instruments (electrodo de platino Mettler Toledo).

45 Después de la ultrafiltración, la solución se purificó por cromatografía de intercambio de anión (DEAE Flujo Rápido de Sefarosa, $h=10\text{ cm}$, $V=20\text{ ml}$, Pharmacia). La resina se equilibró a temperatura ambiente con tampón acetato 0,01M, pH 5. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de solución salina usando 0-0,5M de sulfato de sodio (Merck). El volumen total del gradiente fue 90 ml y la velocidad de flujo 2 ml/min. Durante el gradiente, se recolectaron fracciones de 4 ml. Se analizaron el contenido de proteína, actividad de la lacasa, y la conductividad de las fracciones. La actividad de la lacasa y el contenido de proteína de las fracciones se muestran en la Figura 2.

50

55 Las mejores fracciones de lacasa del intercambio de anión se combinan, y se purifican además por cromatografía de interacción hidrofoba (HIC) (Flujo Rápido de Sefarosa de Fenilo, $h=9\text{ cm}$, $V=18\text{ ml}$, Pharmacia). La hidrofobicidad de las proteínas se incrementa antes del paso al agregar Na_2SO_4 en la muestra, de manera que el contenido de sal se vuelve 0,7 M. La resina se equilibra con 1M de Na_2SO_4 en 0,02 M de tampón de citrato, pH 5, a temperatura ambiente. La muestra se eluye de la columna con un gradiente de salina lineal decreciente al utilizar 0,7-0 M de Na_2SO_4 en tampón de citrato. El volumen total del gradiente fue 90 ml y la velocidad de flujo 2 ml/min. Después del gradiente, la resina se enjuaga con el tampón de equilibrio y, finalmente, con agua. Durante los enjuagues de gradiente y subsecuentes ambos con tampón y agua, fracciones de 3,5 ml se recolectan, la actividad de la lacasa, el contenido de proteína, y el contenido de sal de las cuales se miden (Figura 3).

60

65 Las fracciones más interesantes de tanto el intercambio de anión como HIC se analizan por electroforesis de gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) para monitorear la purificación de la lacasa de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (1970). En la electroforesis de gel, se utilizan el equipo de Bio-Rad (Célula de Gel Lista Bio-Rad), y los geles de poliacrilamida listas (12% de Gel listo Tris-HCl). Los geles se colorean con una solución de tinte Azul Brillante Coomassie R 350 (Pharmacia). El Amplio Rango de Marcador de Proteína Precoloreado n° 7708S (New England BioLabs) se utiliza como la proteína estándar.

El peso molecular de la lacasa de *M. albomyces* como se define por SDS PAGE fue 80 kDa.

Ejemplo 3

5 Caracterización de la lacasa de *M. albomyces*

Dependencia de temperatura de la actividad

La dependencia de actividad de la lacasa de *M. albomyces* purificada en la temperatura se define al medir la actividad de la lacasa por ABTS a temperaturas de 25, 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C. La enzima se diluye en 0,025 M de tampón de succinato templado, pH 4.5. Inmediatamente después de agregar la enzima, la solución de ABST templada se agrega. La muestra se incuba por dos minutos a la temperatura deseada, después de lo cual la absorbancia se mide en la longitud de onda de 436 nm. Con objeto de que la solución de enzima agregada no disminuya considerablemente la temperatura del tampón, el volumen de la enzima agregada en el tampón en todas las diluciones fue por debajo de 7% del volumen total. La dependencia de la actividad de la lacasa de *M. albomyces* con la temperatura se muestra en la Figura 4.

pH óptimo

El pH óptimo de la lacasa de *M. albomyces* purificada se determina al medir la actividad de la lacasa por el procedimiento de guayacol en tampón Mcllvaine a valores de pH de 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Guayacol se selecciona debido a que ABTS no funciona cuando el pH se encuentra por encima de 7. La enzima se diluyó en los tampones, e inmediatamente después de agregar la enzima, se añadieron 25 µl de 1% de solución de guayacol. La reacción se siguió durante 5 minutos mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda de 465 nm. La dependencia de la actividad de la lacasa de *M. albomyces* con el pH se muestra en la Figura 5.

Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la lacasa de *M. albomyces* se determinó al incubar la enzima a 50, 60, 70 y 80°C en tampón citrato 0,06 M, pH 6. La actividad residual de la enzima a cada temperatura se definió por el procedimiento ABTS después de la incubación de 15, 30, 60 y 120 minutos. Los resultados de las mediciones de la estabilidad térmica se muestran en la Figura 6.

La estabilidad térmica de la lacasa de *M. albomyces* purificada se determinó en las condiciones arriba descritas. Los resultados se muestran en la Figura 7. Los resultados indican que la actividad residual de la enzima permaneció esencialmente sin cambiar a 60°C durante más de 2 horas. Después de 4 horas de incubación, aún existía 60% de actividad residual y después 6 horas, 40%.

Estabilidad de pH

La estabilidad de pH de la lacasa de *M. albomyces* se determinó al incubar la enzima a valores de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 en tampón Mcllvaine a temperatura ambiente. La actividad residual de la enzima en las muestras incubadas en cada pH se define por el procedimiento ABTS después de la incubación de 1, 3, 5 y 22 horas. Los resultados de las mediciones de la estabilidad de pH se muestran en la Figura 8.

Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico de la lacasa de *M. albomyces* se determinó por enfoque isoeléctrico. El gel de poliacrilamida de 0,5 mm de grueso contenía 7,5% de acrilamida (Merck), 0,225% de N,N'-bis-metilenoacrilamida (Merck), 6% de anfolita (Pharmalyte 2,5-5 para IEF, Pharmacia), 0,05% de persulfato de amonio (Merck) y 0,05% de N,N,N,N'-tetrametileno diamina (Merck). El enfoque isoeléctrico se llevó a cabo utilizando el equipo de electroforesis Multiphor II (Pharmacia LKB). Los geles se colorearon utilizando tinte activa, en donde el gel se sumergió durante aproximadamente 10 segundos en una solución ABTS diluida (1 g/l). Después de aproximadamente 15 minutos, las bandas de lacasa aparecían verdes. La distribución de pH del gel se determinó utilizando un electrodo de superficie de pH (Mettler Toledo). En la base de enfoque isoeléctrico, el punto isoeléctrico de la lacasa de *M. albomyces* fue 4,0.

Ejemplo 4

*Uso de la lacasa de *M. albomyces* en oxidación de tintes*

Las pruebas se llevaron a cabo usando una lacasa de *M. albomyces* termofílica y las pruebas de referencia por una lacasa bien conocida, que se aisló del hongo *Trametes hirsuta*. Un sustrato convencional, 2,6-dimetoxifenol, se utilizó como el sustrato. La concentración de sustrato fue 1 mmol/l, pH 4,5-7,5, y las temperaturas 40 ó 60°C. La cantidad de lacasa fue 15 nkat/g. Las mezclas de reacción se airearon durante la prueba. Al final de la prueba (30 min), se descubrió que la lacasa de *M. albomyces* termofílica funciona mejor a un pH y temperatura elevada, cuando la formación de color del dimetoxifenol se midió a una longitud de onda de 468 nm (Figuras 9 y 10).

Las lacasas pueden utilizarse para eliminar color de tintes de textil. Las lacasas oxidan muchos tintes, que pueden observarse como un color eliminado. La eliminación de color de tintes de textil se midieron al utilizar un tinte comúnmente utilizado en la industria textil, Negro Diamante PLC. El tratamiento de lacasa se llevó a cabo a pH 7,5 y temperaturas de 40 y 60°C durante 2 horas, siendo la dosis de lacasa 20 nkat/mg de tinte. En la base de una medición de absorbancia máxima (560 nm), la lacasa de *Melanocarpus* eliminó el 34% del color a 40°C y 16% a 60°C, mientras que la lacasa de *Trametes* solamente eliminó el 14% a 40°C y solamente 1% a 60°C (Figura 1).

La capacidad de la lacasa de *M. albomyces* para eliminar el color se comparó con la de lacasa de *T. hirsuta* a pH 5 y 8. La capacidad de eliminación de color se estudió utilizando tintes comúnmente utilizados en la industria textil. Una solución de color (50 mg/l) se oxidó con una dosis de lacasa de 1 nkat/ml en 50 mM de tampón succinato (pH 5) o en un tampón fosfato (pH 8) durante 24 horas a una temperatura de 40°C. La eliminación de color se siguió visualmente. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Como los resultados indican, ambas enzimas oxidaron los tintes probados de manera que se vuelven incoloros a pH 5. La lacasa de *T. hirsuta* fue inefectiva a pH 8, y no oxidó los tintes probados, diferente a la lacasa de *M. albomyces*, que aún a pH 8 fue capaz de oxidar los tintes. Los resultados indican que el comportamiento de la lacasa de *M. albomyces* en oxidación de tintes es considerablemente más amplio que el de la lacasa de *Trametes* convencional.

TABLA 1

Eliminación de tintes de textil con las lacasas de *T. hirsuta* y *M. albomyces* a pH 5 y 8 (+ = color eliminado de la solución, - = sin eliminación de color de la solución)

Tinte	Lacasa de <i>T. hirsuta</i>		Lacasa de <i>M. albomyces</i>	
	pH 5	pH 8	pH 5	pH 8
Acido + tintes complejos de metal				
Azul ácido 113	+	-	+	+
Lanaset Blau 5G	+	-	+	+
Después de tintes de cromos				
Café Diamante Rápido	+	-	+	+
Schwarz PLC Diamante	+	-	+	+

Ejemplo 5

Uso de la lacasa de *M. albomyces* en polimerización

La prueba estudió la polimerización de un compuesto modelo (lignina, Westvaco o Indulin AT, Sigma) con una lacasa termoplástica. La lignina es un sustrato aromático típico de lacasa. Las pruebas de referencia se llevan a cabo utilizando una lacasa que se ha aislado de *Trametes hirsuta*. Las condiciones de prueba fueron como sigue: concentración de sustrato 1%, pH 7.5, y temperaturas 40 ó 60°C. La cantidad de lacasa fue 200 nkat/g. Las mezclas de reacción se airean durante la prueba. La polimerización se sigue al determinar el incremento en el peso molecular de la lignina polimerizada por GPC (cromatografía de permeación de gel). Al final de la reacción (30 minutos), se descubre que la lacasa de *M. albomyces* termofílica funcionó más efectivamente que la lacasa de referencia a una temperatura elevada y pH. La Figura 12 ilustra una situación, en donde la polimerización de lignina se lleva a cabo a 40°C y, correspondientemente, a 60°C en la Figura 13. La lacasa de *Melanocarpus* causa un incremento promedio en el tamaño molecular y una reducción en la porción de moléculas pequeñas obviamente mejor que la lacasa de *Trametes*.

Ejemplo 6

Uso de la lacasa de *M. albomyces* para mejorar el funcionamiento de máquinas de papel

La lacasa puede utilizarse para mejorar el funcionamiento de las máquinas de papel al polimerizar compuestos que se originan en lignina y extractores y al reducir los problemas microbiológicos de la máquina de papel. Generalmente, las condiciones de la máquina de papel son: el pH es 5-7 y la temperatura 60-80°C. Las pruebas de tratamiento se llevaron a cabo utilizando una lacasa de referencia convencional y termoplástica en las condiciones de la máquina de papel al utilizar compuestos solubles que se origina de lignina y extractores, aislados de la máquina de papel. La concentración de sustrato fue 0,5% de peso en seco, el pH 7, y la temperatura 70°C. La agitación intensiva aseguró contenido de oxígeno suficiente en la reacción. La reacción se controló como la polimerización del compuesto aromático y otros, que funcionan como los sustratos de la lacasa, mediante filtración de gel (GPC). Se descubrió que la reacción mediante lacasa de *M. albomyces* termofílica fue más efectiva que por la lacasa de referencia.

ES 2 284 650 T3

La Figura 14 muestra cómo se comportan las lacasas de *Melanocarpus* y *Trametes* en la polimerización de compuestos que se originan de lignina y extractores a 70°C. En la Figura 14, la lacasa de *Melanocarpus* ha reducido claramente la cantidad de moléculas pequeñas.

5 Ejemplo 7

Uso de la lacasa de *M. albomyces* en oxidación de fibras

Las fibras que contienen lignina, que se trituraron mecánicamente sin deslignificación química, se trataron con lacasa de *M. albomyces* termofílica para activar y polimerizar la lignina en la superficie de las fibras. Los tratamientos se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: las temperaturas fueron 50 y 70°C, el pH 6, y la concentración de lacasa 200 nkat/g de fibras. La mezcla de reacción se aireó al soplar oxígeno en la mezcla de reacción. La referencia fue una lacasa convencional que se aísla del hongo *Trametes hirsuta*. Las hojas de papel hechas a mano se prepararon de las fibras tratadas. Las propiedades físicas de las hojas se miden. Los resultados (Tabla 2) indican que la densidad de la hoja hecha de fibras tratadas con la lacasa de *M. albomyces* fue claramente más elevada y la difusión de luz más pequeña que aquella de las hojas referenciadas. No se observó ningún cambio correspondiente en las hojas, que estaban hechas de fibras tratadas con la lacasa de *T. hirsuta*. El efecto fue específicamente obvio a una temperatura incrementada de 70°C, en donde la lacasa de *M. albomyces*, debido a su buena estabilidad térmica, se comportó ventajosamente en comparación con la lacasa de referencia que se aísla del hongo *T. hirsuta*. En la base del resultado, puede concluirse que fue posible utilizar la lacasa de *M. albomyces* para polimerizar lignina sobre la superficie de las fibras en las condiciones utilizadas.

TABLA 2

La densidad y difusión de luz de las hojas hechas de fibras tratadas con la lacasa de *M. albomyces* y *T. hirsuta*

Prueba	T(°C)	Densidad (kg/m ³)	Difusión de luz (m ² /kg)
Sin enzima	70	339	55,0
Lacasa de <i>T. hirsuta</i>	70	347	55,2
Lacasa de <i>M. albomyces</i>	70	367	53,6

Ejemplo 8

Uso de la lacasa de *M. albomyces* en deslignificación de fibras

Los mediadores pueden utilizarse para expandir el rango de sustrato de la lacasa, entre otros, en la deslignificación u otra oxidación indirecta de polímeros. La hidroxibenzotriazola se seleccionó como el mediador. La lacasa termofílica se utilizó para degradar la lignina de fibras de papel de kraft en oxidación valorada como mediador. Las condiciones de la reacción eran como sigue: pulpa de papel kraft, el número kappa aproximadamente 29, la consistencia 4%, la cantidad de mediador 1% de la pulpa, el pH ajustado a 7, y la temperatura 70°C, el tiempo de reacción 2 horas, la cantidad de lacasa 500 nkat/g en presión de oxígeno (0.5 mPa). La lacasa de *Trametes* sirvió como un material de referencia. Después de los tratamientos, la pulpa se sometió a extracción con álcali, quelación y blanqueado con peróxido de una sola etapa. La disolución de la lignina se controló midiendo la absorbancia del filtrado a una longitud de onda de 280 nm después de la extracción con álcali. Las hojas de papel hechas a mano se prepararon de las pulpas y brillo ISO, y se midieron los número kappa. Como los resultados indican (Tabla 3), la lacasa de *M. albomyces* funciona más eficazmente en las condiciones de prueba que la lacasa de referencia; redujo el valor kappa de las hojas (la cantidad de lignina) e incrementó la absorbancia_{280nm} del filtrado más de la lacasa de referencia.

TABLA 3

El efecto del tratamiento LM en el blanqueado de pulpa de papel kraft (κ 29) con una secuencia LQ-E-P

Prueba	A280 de filtrado	Valor kappa
Sin enzima	11,9	18,9
Lacasa de <i>T. hirsuta</i>	14,3	16,3
Lacasa de <i>M. albomyces</i>	32,7	15,4

Ejemplo 9

Aislamiento del gen y el ADNc de la lacasa de M. albomyces

5 El ADN total se aisló de las células de acuerdo a Raeder y Broda (1985). Una biblioteca genómica se construyó utilizando un paquete de reacción comercial (Equipo del Vector Cósmido SuperCos I, Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante. 100 μ g de ADN se dividió parcialmente con 5 U de una enzima de restricción Sau3AI (New England Biolabs) al incubar durante 10 minutos a 37°C. El ADN digerido se desfosforiló con 20 U de CIAP (Fosfatasa Alcalina Intestinal de Becerro, Finnzymes). Las moléculas de ADN de diferentes longitudes se separaron con un gradiente de 15-30% de sacarosa al ultracentrifugar durante 22 horas a una temperatura de 20°C y una velocidad de rotación de 22 000 rpm (rotor Beckman SW 41 T1). El gradiente de sacarosa de 12 ml se divide en fracciones de 300 μ l, y 10 μ l de cada segunda fracción se examinan en 0.5% de gel de agarosa por electroforesis. Las fracciones, que en la base de la electroforesis de gel contuvieron fragmentos de ADN de mas de 20 pares de kilobases en longitud, se combinan, y el ADN se precipita de ellos con etanol. El ADN obtenido (aproximadamente 2 μ g) se inserta en el vector de cósmido SuperCos I (aproximadamente 1 μ g), que se ha digerido con XbaI (New England Biolabs), y después de desfosforilan con CIAP y, finalmente, se digieren con BamHI (Boehringer Mannheim). La ligación se llevó a cabo con ligasa de ADN T4 (Promega) al incubar la mezcla a 4°C durante la noche. La mezcla de ligación se empaquetó en partículas λ al utilizar un paquete de reacción comercial (extracto de empaquetamiento Gigapack III Gold, Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante, y el fago empaquetado se utiliza para infectar las células huésped *E. coli* (cepa XL1-Azul MR, Stratagene). Una ligación proporcionó más de 5×10^6 clonas, que puede considerarse un banco genético representativo.

La sonda de hibridización para la selección del banco genético se obtuvo del gen *Iac2* del hongo *Podospora anserina*. Este gen se seleccionó como la sonda, debido a que la secuencia de aminoácidos de terminal N y los péptidos internos de la lacasa de *M. albomyces* fueron homólogos a la secuencia de aminoácidos de la lacasa de *P. anserina*. El hongo *P. anserina* se desarrolló en un sustrato, que se describe en la Figura 1. El ADN genómico se aisló de un micelio, que se recolectó y liofilizó después de tres días de crecimiento, utilizando un paquete de reacción comercial (kit de ADN Fácil, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gen *Iac2* se multiplicó por una reacción PCR, utilizando cebadores de inicio que se basan en la secuencia publicada del gen *Iac2*: 5'-TGCCA CACTGCCGCCAACCGTGCT-3' (SEQ ID NO:3) (delantera) y 5'-GTTCTTGATATACCAATCAGGATG-3' (SEQ ID NO:4) (posterior). El programa PCR utilizado para multiplicación comprende 26 ciclos, en donde el programa de temperatura fue como sigue: desnaturalización de ADN a 94°C durante 45 segundos, inserción de cebadores a 55°C durante 1 min, extendiendo la cadena de ADN con polimerasa a 72°C durante 2,5 min. Finalmente, la cadena se extendió a 72°C durante 5 minutos. El fragmento obtenido de aproximadamente 1,9 pares de kilobases en longitud se purificó por electroforesis de gel de agarosa. Su comportamiento como una sonda se examinó por hibridización Southern con el ADN genómico del hongo *M. albomyces* como sigue: en dos diferentes reacciones, 40 μ g de ADN se separaron con 80 U de enzimas de restricción EcoRI y HindIII (New England Biolabs) a 37°C durante 5 horas. Los fragmentos se separaron por electroforesis en 0,8% de gel de agarosa; se desnaturalizó el ADN y transfirió sobre membranas Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech) (el procedimiento se describe en Sambrook *et al.*, 1989). El gen *Iac2* de *P. anserina* se etiqueta con α -³²P-dCTP al utilizar un paquete de reacción comercial (equipo de etiquetado de ADN cargado aleatorio, Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la unión de la sonda se examina a cuatro diferentes temperaturas de hibridización: 48, 50, 55 y 60°C. La solución de hibridización contuvo 6xSSC, 1x Denhardt's (Sambrook *et al.*, 1989), 0,5% de SDS, y 100 μ g/ml de ADN de Esperma Herring (SSC contiene 0,15 M de NaCl y 0,015 M de citrato de sodio a pH 7,0). La hibridización contuvo aproximadamente 5×10^5 cpm/ml de sonda marcada. Después de la hibridización, las membranas se lavaron en 2xSSC que contenía 0,1% de SDS dos veces durante cinco minutos a temperatura ambiente y, después de esto, durante 30 minutos a la misma temperatura a la que se hizo la hibridización. Las membranas se encerraron en un módulo de exposición con una película, y la película expuesta mostró que el gen *Iac2* de *P. anserina* se hibridizó con un fragmento de ADN, que fue aproximadamente 4,5 pares de kilobases de longitud y se separó con enzima ExoRI.

Aproximadamente 5×10^5 clones del banco genético genómico obtenidos se colocaron en placas de agar, y las colonias que se han desarrollado durante la noche se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Schleicher & Schuell). El ADN contenido en las colonias se desnaturalizó (Sambrook *et al.*, 1989) y después se unió a las membranas mediante el calentamiento a 80°C durante 2 horas. Después de la unión de ADN, los residuos de las colonias bacteriales se lavaron de las membranas al fregarlos con el fluido de enjuague (Sambrook *et al.*, 1989) a 48°C. El ADN unido a las membranas se hibridizó durante la noche a una temperatura de 57°C con un gen *Iac2* de *P. anserina* que se etiquetó con α -³²P-dCTP (una solución de hibridización, como arriba). En la base de las señales de hibridización obtenidas, varias colonias se recogieron de las placas originales, a las cuales las colonias de gen *Iac2* de *P. anserina* se han hibridizado. Estas colonias se hibridizaron además con el gen *Iac2* de *P. anserina* y, en la base de señales radioactivas, 6 colonias se seleccionaron para examen adicional. Los cósmidos (procedimiento de purificación de Plásmido, Tip-500, QIAGEN) se aíslan de ellos. La enzima de restricción que hizo posible aislar el gen de lacasa del cósmido, se dividió al separar los cósmidos con 19 diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos se sometieron a hibridización Southern a una temperatura de 57°C, utilizando el gen *Iac2* de *P. anserina*, como arriba. Un fragmento EcoRI de aproximadamente 45 pares de kilobases de longitud se hibridizó de nuevo con el gen *Iac2*. El cósmido se separó con EcoRI, y el fragmento se purificó por electroforesis de gel de agarosa. El fragmento obtenido se insertó en el plásmido pBluescriptSK (Stratagene), y el plásmido se transformó en células huésped *E. coli* (cepa DH5 α , Gibco BRL) mediante electroporación. Se obtuvo un clon a partir de la transformación, que contenía el fragmento EcoRI deseado en plásmido pLLK1. Un gen de lacasa se secuenció de este plásmido, utilizando cebadores

de oligonucleótidos sintetizados. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando un paquete de reacción comercial (Equipo de Secuenciación de ADN, Reacción Lista de Secuenciación de Ciclo Terminador de dRhodamina, PE Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para establecer los intrones contenidos por el gen de lacasa de *M. albomyces*, un ADN complementario (ADNc) que corresponde a la lacasa de *M. albomyces* se clonó por RACE-PCR, utilizando un paquete de reacción comercial (Equipo FirstChoice™; RLM-RACE, Ambion, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. ARN se aisló de las células de *M. albomyces* con las instrucciones del fabricante. Se aisló el ARN de las células de *M. albomyces* mediante un paquete de reacción comercial (Reactivo TRIZOL®, Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se desfosforiló y transcribió en ADN al utilizar una enzima de transcripción inversa, donde los extremos 5' y 3' del gen se multiplicaron por reacciones PCR separadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La multiplicación de ambos extremos de ADNc se llevó a cabo por dos reacciones PCR secuenciales utilizando diferentes cebadores. En la primera reacción, la parte deseada del ADNc de lacasa se multiplicó utilizando un cebador específico de gen, y la segunda reacción aseguró la multiplicación del ADNc de lacasa al utilizar otro cebador específico de gen. En cada reacción de PCR, uno de los cebadores necesarios para la multiplicación del ADN vino del paquete de reacción del equipo RLM-RACE, y se unió a las regiones adaptadoras conectadas a los extremos del ADNc. El programa PCR utilizado para la multiplicación comprende 35 ciclos, en donde el programa de temperatura fue como sigue: desnaturalización de ADN a 94°C durante 30 segundos, inserción de cebadores a 60-62°C durante 30 seg, extensión de la cadena de ADN a 72°C durante 2 minutos. En la multiplicación del extremo 5', la temperatura de inserción de los cebadores fue 60°C, y en el extremo 3', 62°C. Finalmente, la extensión de cadena se lleva a cabo a 72°C durante 7 minutos. Los cebadores específicos de gen utilizados en la multiplicación del extremo 5' son como sigue: en la primer reacción PCR, 5'-GCCGGTGAGGATGTAGTCGATGAT-3' (SEQ ID NO:5), y en la segunda reacción, 5'-AGGTGACGTTGAACCAGTAGTTGTC-3' (SEQ ID NO: 6). Los cebadores específicos de gen utilizados en la multiplicación del extremo 3' fueron como sigue: en la primer reacción de PCR, 5'-CTGGTGCACTTCACGCA GAACAA-3' (SEQ ID NO: 7), y en la segunda reacción, 5'-AGAACCACTTCCAGGTGTCGCT-3' (SEQ ID NO: 8). De las reacciones RLM-RACE, un fragmento de 1194 pares base en longitud se obtuvo del extremo 5', y del extremo 3', un fragmento de 1322 pares de bases de longitud. Los fragmentos se aíslan por electroforesis de gel de agarosa y se clonaron en un vector pCR2.1-TOPO™; al utilizar un paquete de reacción comercial (Equipo de Clonación TOPO TA, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido se transformó en las células de huésped *E. coli* (cepa TOP10F®, Invitrogen) al utilizar electroporación de acuerdo con las instrucciones del paquete de reacción. Los fragmentos clonados se secuenciaron y se establecieron las posiciones de los intrones en el gen de la lacasa de *M. albomyces* al comparar la secuencia genómica con la secuencia de ADNc obtenida.

La secuencia genómica del gen se muestra en la Figura 15. Los intrones se subrayan.

Referencias

- Altschuil *et al.*, 1990. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Berka *et al.*, 1997. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):3151-3157.
- Bharahi, M.S. and Ramalingam, K. 1993. *J. Anim. Morphol. Physiol.* 40 (1&2):153.
- Diamantidis *et al.*, 2000. *Soil Biology & Biochemistry* 32:919-927.
- Fernandez-Larrea & Stahl. 1996. *Mol. Gen. Genet.* 252, 539-551.
- Heinzkill *et al.*, 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1601-1606.
- Jönsson *et al.*, 1997. *Curr. Genet.* 32:425-430.
- Laemmli 1970. *Nature* 227:680-685.
- Lowry *et al.*, 1951. *Biol. Chem.* 193:265-275.
- Kojima *et al.*, 1990. *J. Biol. Chem.* 265:15224-15230.
- Niku-Paavola *et al.*, 1988. *Biochem. J.* 254:877-884
- Paszczynski *et al.*, 1985. *FEMS Microbiol. Lett.* 29(1985)37-41.
- Ravanko, K. 1996. Termostabiliin lakkaasin seulonta (Screening of Thermostable Laccase).
- Master's Thesis. 97 p.4 Appendices. (En fines)
- Raeder and Broda, 1985. *Lett. Appl. Microbiol* 1:17-20.
- Saloheimo *et al.*, 1985. *J. Gen. Microbiol.* 137:1537-1544.

ES 2 284 650 T3

Saloheimo and **Niku-Paavola**. 1991. *Bio/Technology* 9:987-990.

Sambrook *et al.*, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn.

5 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Yaver *et al.*, 1996., *Appl. Environ. Microbiol.* 62:834-841.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de la enzima de lacasa, que tiene un pH óptimo entre 5-8 y que funciona a pH 3-9 y a una temperatura de 30-80°C, **caracterizada** porque la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo constituido por:

a) una molécula de ácido nucleico que comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1;

b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2;

c) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación que difiere de la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1 o la Figura 15 debido a la degeneración del código genético;

d) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1; y

e) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene actividad de la lacasa y la secuencia de aminoácidos de la cual se muestra al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada muestra al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

3. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2.

4. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1.

5. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque codifica la enzima lacasa que tiene un pH óptimo entre 6 y 8.

6. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque codifica la enzima lacasa que tiene una temperatura óptima de 50 a 80°C.

7. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque codifica la enzima lacasa que tiene un pH óptimo de aproximadamente 7,5 y una temperatura óptima de aproximadamente 70°C.

8. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque codifica la enzima lacasa que esencialmente permanece sin cambiar durante 2 horas a 60°C.

9. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,0 determinado por un enfoque isoeléctrico y que tiene un peso molecular de aproximadamente 80kDa como se determina por SDS-PAGE.

10. Un vector, **caracterizado** porque comprende la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un huésped de micro-organismo, **caracterizado** porque se ha transformado por la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o por el vector de acuerdo con la reivindicación 10.

12. El huésped según la reivindicación 11, **caracterizado** porque es un hongo filamentoso, levadura o bacteria.

13. El huésped según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizado** porque pertenece al género *Aspergillus*, *Trichoderma* o *Fusarium*.

14. Un procedimiento para producir lacasa, **caracterizado** por

transferir una molécula de ácido nucleico de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el vector de acuerdo a la reivindicación 10 en una célula huésped de micro-organismo para expresar la molécula de ácido nucleico y, opcionalmente, para secretarla de la célula huésped; y

recuperar el polipéptido que tiene actividad de lacasa ya sea de las células o de la solución de cultivo del huésped de micro-organismo.

15. Un polipéptido, que tiene la actividad de la lacasa, **caracterizado** porque se codifica por una molécula de ácido nucleico, que se selecciona entre el grupo constituido por:

a) una molécula de ácido nucleico que comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1;

b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2;

c) una molécula de ácido nucleico que difiere de la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 debido a la degeneración del código genético;

d) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1; y

e) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene actividad de la lacasa y la secuencia de aminoácidos de la que muestra al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y que el pH óptimo del polipéptido está entre 5-8 y el polipéptido funciona a pH 3-9 y a una temperatura de 30-80°C.

16. Un polipéptido que tiene la actividad de la lacasa, **caracterizado** porque comprende una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y porque el pH óptimo del polipéptido está entre 5-8 y el polipéptido funciona a pH 3-9 y a una temperatura de 20-80°C.

17. Una preparación de enzima, **caracterizada** porque está enriquecida en el péptido de acuerdo a la reivindicación 15 ó 16 que tiene la actividad de la lacasa, comparada con lo que las cepas del género *Melanocarpus* producen naturalmente en sus soluciones de cultivo.

18. La preparación de enzima según cualquiera la reivindicación 17, **caracterizada** porque comprende más de 10 mg/l, preferentemente ≥ 30 mg/l de lacasa.

19. La preparación de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, **caracterizada** porque comprende al menos un aditivo, tal como un estabilizador y/o un tampón.

20. El uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 para oxidar los agentes colorantes.

21. El uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 para polimerizar los compuestos.

22. El uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 para oxidar fibras.

23. El uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 para la deslignificación de fibras.

24. El uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 para mejorar el funcionamiento de las máquinas de papel.

25. Un procedimiento para oxidar los agentes colorantes, **caracterizado** porque, en presencia de una cantidad de oxígeno suficiente, el agente colorante entra en contacto con el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 a pH 4-8, una temperatura de 40-80°C, durante 5 min-24 horas con una cantidad de lacasa, que es aproximadamente 1-1000 nkat/g de agente colorante.

26. Un procedimiento para polimerizar compuestos, **caracterizado** porque, en presencia de una cantidad de oxígeno suficiente, el compuesto a polimerizar entra en contacto con el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 a pH 4-8, una temperatura de 40-80°C, durante 5 min-24 horas con una cantidad de lacasa, que es aproximadamente 1-1000 nkat/g de la sustancia que está por polimerizarse.

ES 2 284 650 T3

27. Un procedimiento para oxidar fibras, **caracterizado** porque, en presencia de una cantidad de oxígeno suficiente, el compuesto a oxidar entra en contacto con el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 a pH 5-8, una temperatura de 50-80°C, durante 5 min-24 horas con una cantidad de lacasa, que es aproximadamente 1-1000 nkat/g de fibras de materia seca.

28. Un procedimiento para deslignificar fibras, **caracterizado** porque, en presencia de una cantidad de oxígeno suficiente, la fibra que se va a deslignificar entra en contacto con el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14, estando el entre de 5-8, la temperatura entre 50-80°C, durante 5 min-24 horas con una cantidad de lacasa, que es aproximadamente 1-1000 nkat/g de fibras de materia seca.

29. Un procedimiento para mejorar el funcionamiento de las máquinas de papel, **caracterizado** porque el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, la preparación de enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o la lacasa obtenida por el procedimiento según la reivindicación 14 se añade en el agua de proceso o la caja principal de la máquina de papel 1-1000 nkat/g de materia seca, fibras o litros de agua de circulación.

30. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, **caracterizado** porque se utiliza un mediador en el procedimiento, cuando sea necesario.

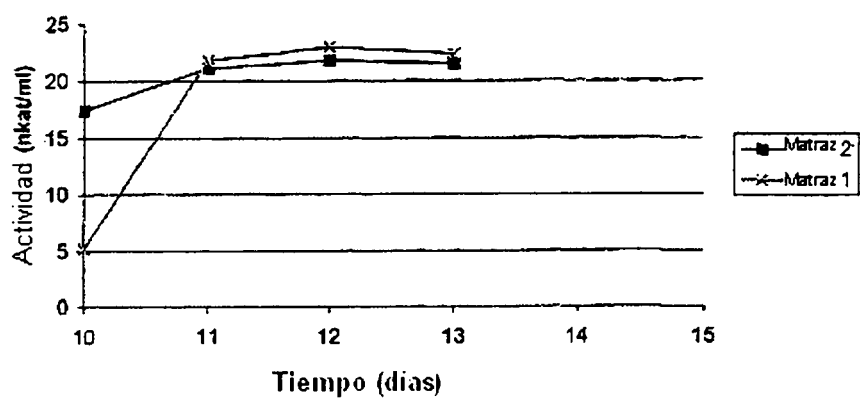


Fig. 1

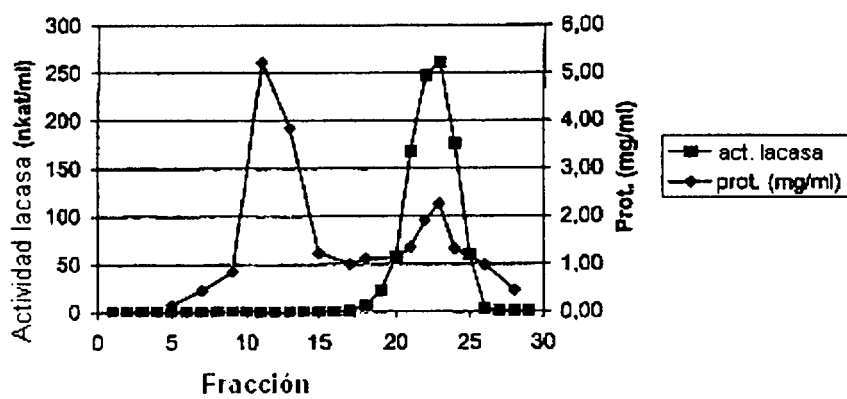


Fig. 2

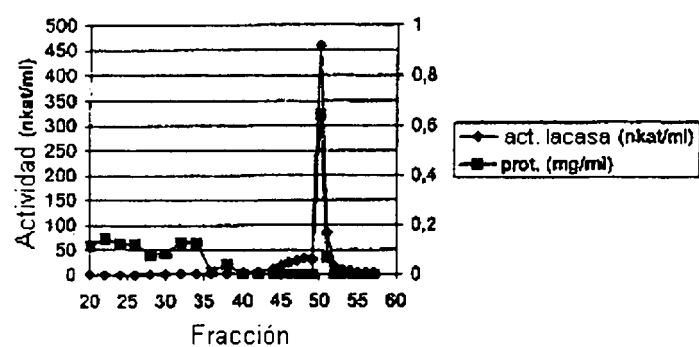


Fig. 3

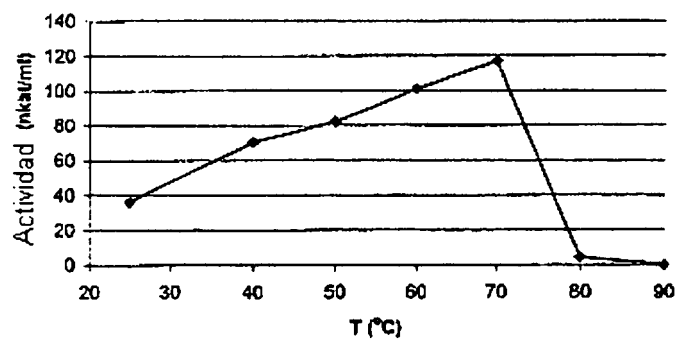


Fig. 4

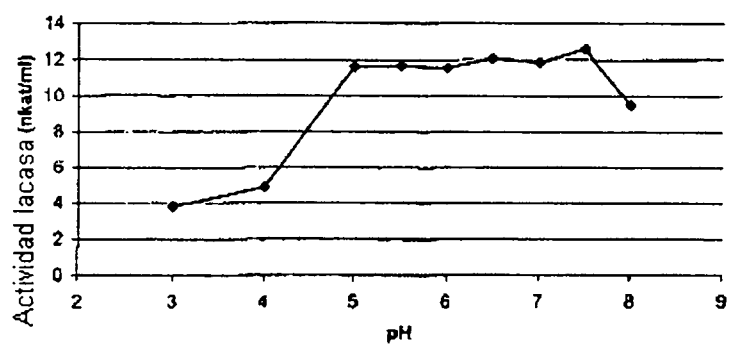


Fig. 5

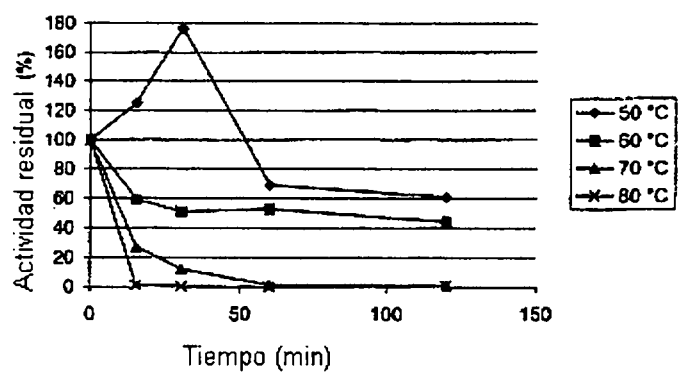


Fig. 6

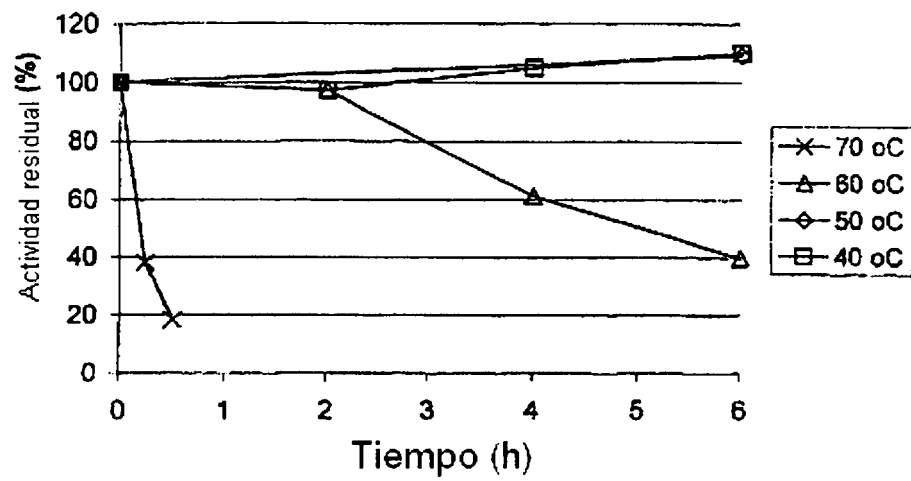


Fig. 7

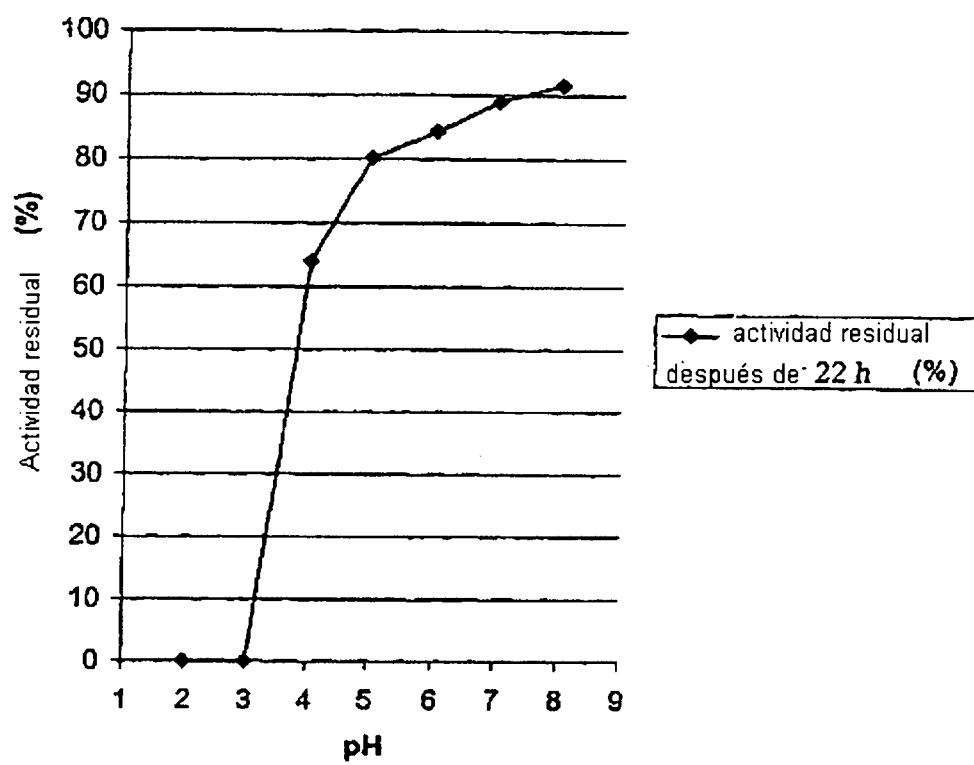


Fig. 8

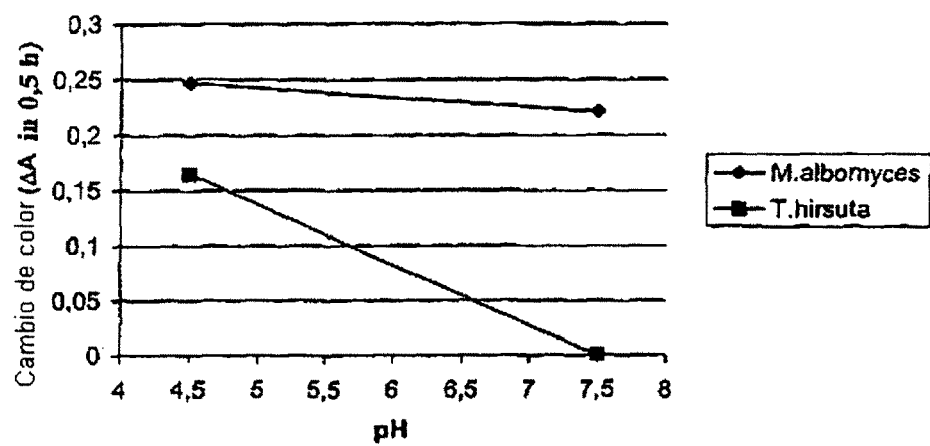


Fig. 9

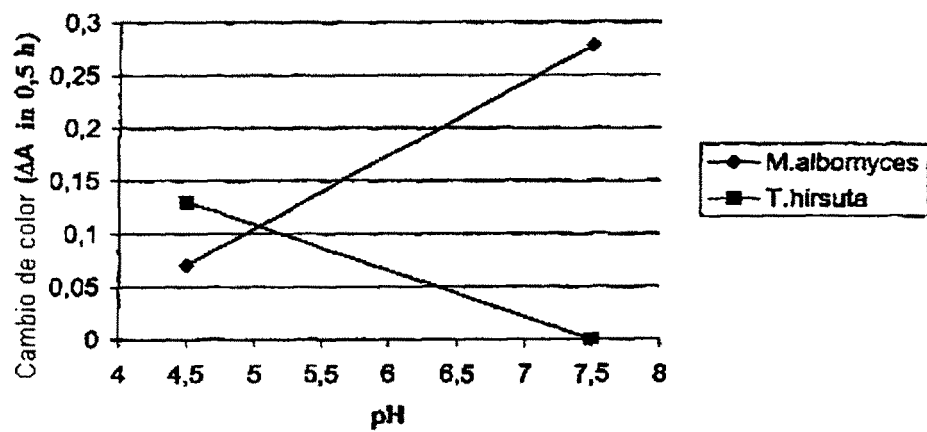


Fig. 10

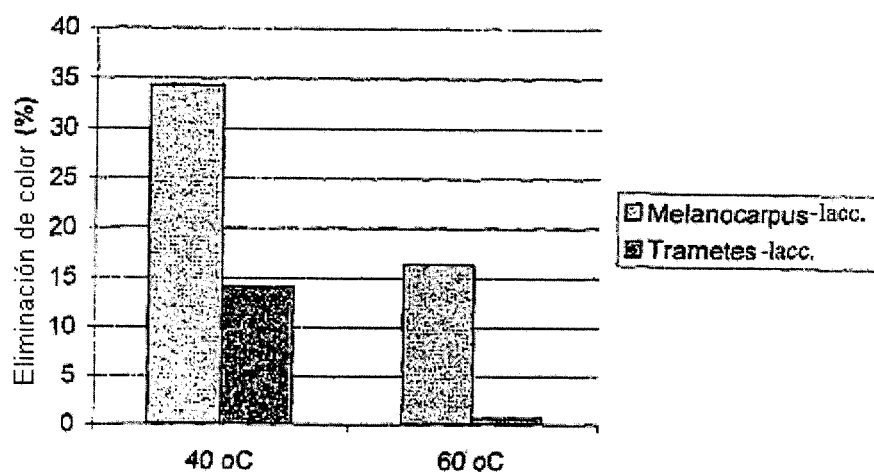


Fig. 11

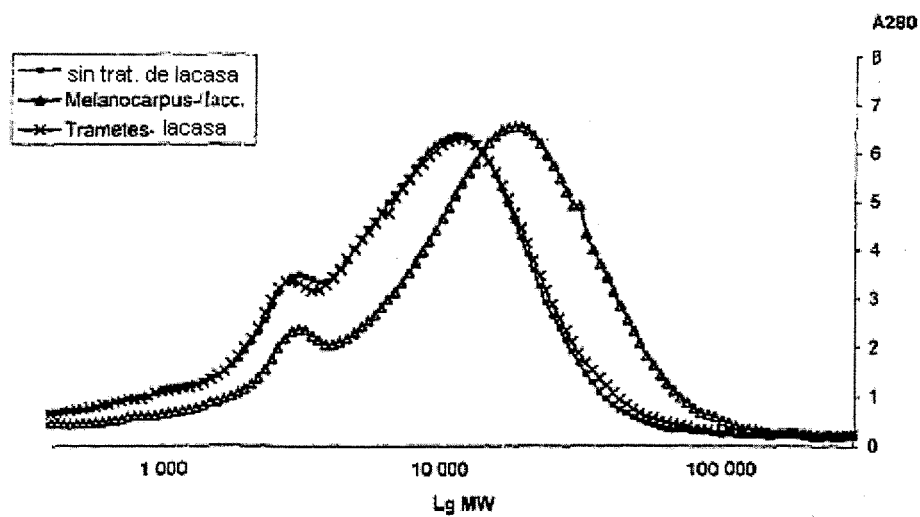


Fig. 12

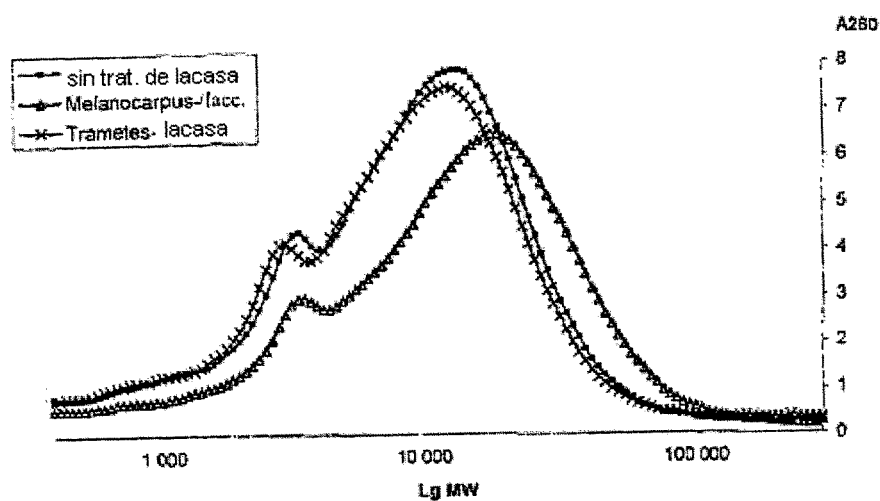


Fig. 13

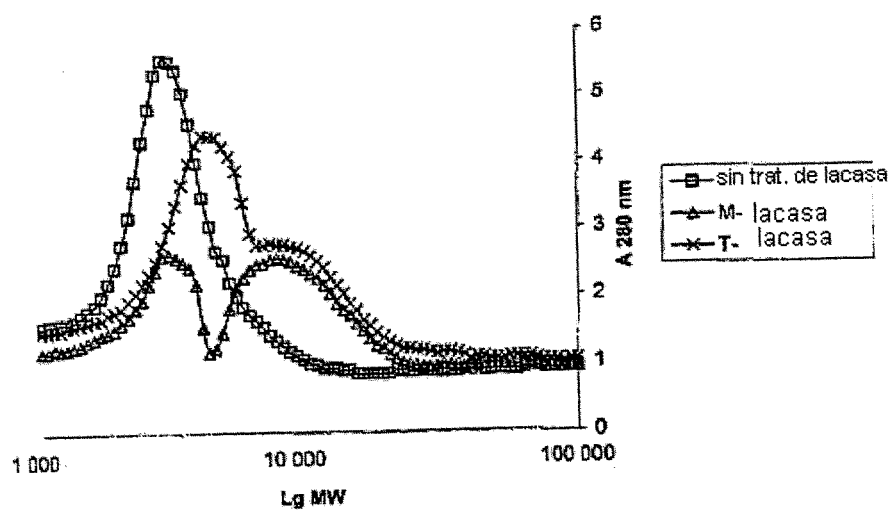


Fig. 14

atgaagaccttcaccagcgccctggcgctcggtgggcatgcttgccccgggtgccgtc
 M K T F T S A L A L V V G M L A P G A V
 gttgccgcgcctcccagcactccggcccagcgagatctggtcgagctgcgcgagggcgagg
 V A A P P S T P A Q R D L V E L R E A R
 caggagggcggaaggacctccgtccccgtgagccgacgtgcaacacgcccagcaaccgg
 Q E G G K D L R P R E P T C N T P S N R
 gcgtgctggagcgacggcttcgacatcaacaccgactacgaagtcagcacgcccggatacc
 A C W S D G F D I N T D Y E V S T P D T
ggcgctcactcagtcgtgagtcctcctcctccgc
 G V T Q S
ccccttggtttcgggaaggctgtccgaagggaaggaaagtccgaggctaactgcagacag
 tacgtattcaacctcactgaggttgacaactggatgggcccagacggcgctcgtaaggag
 Y V F N L T E V D N W M G P D G V V K E
 aaggtgatgttgatcaatgggtgagtcgaccgcgaatgggatgtcgagttgccatccaaaa
 K V M L I N
tagacctgtgtaactgactgggttcgatcacagggaacattatgggtacgtcttatctg
 G N I M
gctgtccccggcacgccaatggcctttcttttcccttgagcgtaggacgtgcgacggactga
ctgagaacaataggccccaacatcgctcggaactgggggtgatacggtcgaggtcaccgtg
 G P N I V A N W G D T V E V T V
 atcaacaaccttgtgaccaacgga acgtcgatccactggcacggcatccaccagaaggac
 I N N L V T N G T S I H W H G I H Q K D
 accaacctgcacgacggcgccaacggcggtgaccgagtggtccgatccccgcccaaggcggc
 T N L H D G A N G V T E C P I P K G G
 cagcgagcgtaccgctggcgggcgcggcagtgatggcaccagctggtaccactcgacttc
 Q R T Y R W R A R Q Y G T S W Y H S H F
 tcggcgagcgtacggcaacggcggtgggtgggcacgatccagatcaacggccccggcgctcgctg
 S A Q Y G N G V V G T I Q I N G P A S L
 ccctacgacatcgaccttggcggtgttccccatcaccgactactactaccggggcgccgac
 P Y D I D L G V F P I T D Y Y Y R A A D
 gacctggtgcacttcacgcagaacaacgcgcgccttcagcgacaacgtgctcatcaac
 D L V H F T Q N N A A P P F S D N V L I N
 ggcacggcgctcaaccgcgaacacggggcgaggggccagtagccaacgtgacgctgacggcg
 G T A V N P N T G E G Q Y A N V T L T P
 ggcaagcgggcaccgcctgcgcacatcctcaacacgtcgaccgagaaccacttccaggtgtcg
 G K R H R L R I L N T S T E N H F Q V S
 ctcgtaaccacacccatgacggcatcgccgcccagatgggtgcccgtcaacgccatgacg
 L V N H T M T V I A A D M V P V N A M T
 gtcgacagcctgttcctggcgctcgccagcgctacgacgtcgatcgacgcctcgaga
 V D S L F L A V G Q R Y D V V I D A S R
 gccccggacaactactggttcaacgtcacctttggcgggccaggcgcggtgcgggcggtcg
 A P D N Y W F N V T F G G Q A A C G G S
 ctcaaccgcgacccggcgcccatcttccactacggcgcgccccggcgcgccctgccacc
 L N P H P A A I F H Y A G A P G G L P T
 gacgagggcacgccccggctcgaccaccagtgctggacacgctcgacgtgcgccccgtc
 D E G T P P V D H Q C L D T L D V R P V
 gtgcccgcgagcggtgccgtcaacagcttcgtcaagcgggccgacaacacgctgcccgtg
 V P R V S V P V S F V K R P D N T L P V
 gcgctcgacctgaccggcacgccccgtgttcgtgtgg
 A L D L T G T P L F V W
 aaggtcaacggcgacgatcaacgtcgactggggcaagcccatcatcgactacatcctc
 K V N G S D I N V D W G K P I I D Y I L
 accggcaacaccagctaccccggtgctcggaacacatcgtcaggttgatgccgtcgatcag
 T G N T S Y P V S D N I V Q V D A V D Q

gtatgtcctctgttaaagccttacgtcgtacgattgcgctggcaaatcacacctcgtact
gacgccaaaccaccacctcccttctagtggacatactggctcatcgagaacgatccggag
W T Y W L I E N D P E
ggcccttcagcctgccgcacccgatgcacctccac
G P F S L P H P M H L H
gtaagtggccaacctgtcacgtac
gttgcaaccgccctctcccgggccccccaactcacacttcggactcccgtcccacagggc
G
cacgacttctcgtgctggggcggtcgcccgacgtgcggcggtcgagcagcagcgttc
H D F L V L G R S P D V P A A S Q Q R F
gtgttcgacccggccgtggacctggcgcggtcaacggcgacaacccgccggcgcgac
V F D P A V D L A R L N G D N P P R R D
accacgatgctgccggcggtggctgctgctcgccttcgcaccgacaacccgggc
T T M L P A G G W L L L A F R T D N P G
gcctggctcttccactgccacatcgctggcacgtgtcggcggtcgtcggtcgacttc
A W L F H C H I A W H V S G G L S V D F
ctcgagcgccccgccgacctgcgccagcgcacatctcccaggaggagaggacgacttcaac
L E R P A D L R Q R I S Q E D E D D F N
cgcgtctgcgacgagtggcgccctactggccgacgaatccctaccccaagatcgactcg
R V C D E W R A Y W P T N P Y P K I D S
ggcctgaagcgtcgccgctgggtggaggagcgcgagtggtggttcgttgatgggggaaa
G L K R R R W V E E S E W L V R -
gggggggtaggtgcgattcaggggtacctaggggtgcacttgatgttgatgctcgatggag
aattggttttggttacttgttgttcaactttcgacatgcgttggctccttgtttggatttt
taggttgcagatgatggatgatatgggtaccgaggggaactgtggtccttgccttcgaaag
gggacttcatgttatggtaccacaggaccagttatcgaaagcatccttgttttcaatcgca_poli -A
tcttttttccccgatgctcgagtacatgatgcccatagtgagtcgtagcacaccagcc comienza
acaccacctacctcccttcccgaacgcccatcatgcggtacgccaaatcaaggtcctcca
caatcccatgccaatgcgcacctccgcacagcaacctgatcc

FIG. 15

ES 2 284 650 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <120> NUEVA ENZIMA DE LACASA Y EL GEN QUE CODIFICA LA ENZIMA

<130> vtt105

10 <140>

<141>

15 <150> 20001240

20 <151> 2000-05-23

<160> 8

25 <170> PatentIn Ver. 2.1

30 <210> 1

<211> 3116

35 <212> ADN

<213> *Melanocarpus albomyces*

40 <400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 284 650 T3

	gaattcagga	tggcatcgag	tgaagggcga	ggaggatgtg	ccgaatacga	gctcgtcgac	60
	ggcttcctgc	tcogtccctgc	gctctcctgg	gatcgagcgg	catgggggatt	tcttctatat	120
	aaggggctcg	acagtcgcga	tcattgagatt	gattttttcca	ccctcaccag	gcacaagcca	180
	gccatcagaa	cctctcttcc	accttcacat	ggcactctcc	ttcogtctgt	cgagctcttt	240
5	cccacatttc	tagcaggcgg	tttcgacacc	agccgtcttc	acaccatgaa	gaccttcacc	300
	agcgccttg	cgtcgttgt	gggcatgctt	gccccgggtg	ccgtcgttgc	cgcgcctccc	360
	agcaactcgg	cccagcgaga	tctggtcgag	ctgcgcgagg	cgaggcagga	gggcggaag	420
	gacctccgtc	cccgtagacc	gacgtgcaac	acgcccagca	accgggcgtg	ctggagcgac	480
	ggcttcgaca	tcaacaccga	ctacgaagtc	agcacgccgg	ataccggcgt	cactcagctc	540
10	gtgagtcctc	ctctccgccc	ccttggtttc	gggaaggctg	tccgaaggga	aggaaagtcc	600
	gaggctaact	gcagacagta	cgtattcaac	ctcactgagg	ttgacaactg	gatgggcccc	660
	gacggcgtcg	tcaaggagaa	ggtgatgttg	atcaatggtg	agtccgaccg	gaatgggatg	720
	tcgagttgcc	atccaaaata	gacctgtgta	actgactggt	tcgatcacag	ggaacattat	780
15	gggtacgtct	tatctggctg	tccgggcacg	ccaatggcct	ttcttttcc	tgagcgtagg	840
	acgtgcgacg	gactgactga	gaacaatagg	ccccaacatc	gtcgcgaact	ggggtgatac	900
	ggtcgagggtc	accgtgatca	acaaccttgt	gaccaacgga	acgtcgatcc	actggcacgg	960
	catccaccag	aaggacacca	acctgcacga	cggcgccaac	ggcgtgaccg	agtgtccgat	1020
	cccgcccaag	ggcgcccgag	ggacgtaccg	ctggcgggcg	cggcagtatg	gcaccagctg	1080
20	gtaccactcg	cacttctcgg	cgcagtagcg	caacggcgtg	gtgggcacga	tccagatcaa	1140
	cggccccggcg	tcgctgccc	acgacatcga	ccttggcgtg	ttccccatca	cggactacta	1200
	ctaccgggccc	gcccagcacc	tgggtgacct	cacgcagaac	aacgcgcgcg	ccttcagcga	1260
	caacgtgctc	atcaacggga	cggcgcgtca	cccgaacacg	ggcgaggggc	agtaaggcaa	1320
25	cgtgacgtcg	acgcggggca	agcggcaccg	cctgcgcctc	ctcaacacgt	cgaccgagaa	1380
	ccacttccag	gtgtcgtcgt	tcaaccacac	catgacggtc	atcgccgcgg	acatgggtgc	1440
	cgtcaacgcc	atgacggctg	acagcctgtt	cctggccgtc	ggccagcgct	acgacgtcgt	1500
	catcgacgcc	tcgagagccc	cggacaacta	ctgggttcaac	gtcacctttg	gcggccaggc	1560
	ggcgtgcggc	ggctcgtcga	acccgcaccc	ggccgccatc	ttccactacg	ccggcgcgcc	1620
30	cggcggcctg	cccaccgacg	agggcacgcc	cccgttcgac	caccagtgc	tggacacgct	1680
	cgaactgcgc	cccgctcgtg	cgcgcagcgt	gcccgtcaac	agcttcgtca	agcggccccga	1740
	caacacgctg	ccgggtggcg	tcgacctgac	cggcacgcc	ctgttcgtgt	ggaagggtcaa	1800
	cggcagcgac	atcaacgtcg	actggggcaa	gcccattcat	gactacatcc	tcaccggcaa	1860
35	caccagctac	cccggtgcgg	acaacatcgt	gcaggttgat	gcccgtcgatc	aggtatgtcc	1920
	tctgttaaag	ccttacgtcg	taogatttgc	ctggcaaata	acacctcgta	ctgaagccaa	1980
	accaccacct	cccttctagt	ggacatactg	gctcatcgag	aacgatccgg	agggccccct	2040
	cagcctgcgg	cacccgatgc	acctccacgt	aagtggccaa	ccctgtcacg	taagttgcaa	2100
	ccgccccttc	ccgggcccc	caactcacac	ttcggaactc	cgtccacag	ggccacgaat	2160
40	tctcgtgctc	ggggcggtcg	cccgacgtgc	cggcggcgtc	gcagcagcgc	ttcgtgttcg	2220
	acccgcgcgt	ggacctggcg	cggctcaacg	gcgacaaccc	gccgcggcgc	gacaccacga	2280
	tgtgcgcggc	cggcggtcgg	ctgctgctcg	ccttcgcgac	cgacaacccg	ggcgccctggc	2340
	tcttccactg	ccacatcgcc	tggcacgtgt	cgggcggcct	gtcgttcgac	ttcctcgagc	2400
	gccccgcgga	cctgcgcag	cgcattctcc	aggaggacga	ggacgacttc	aaccgcgtct	2460
45	gcgacgagtg	gcgcgcctac	tggccgacga	atccctaccc	caagatcgac	tcgggcctga	2520
	agcgtcgccg	ctgggtggag	gagagcgagt	ggctgggtcg	ttgatggggg	aaaggggggg	2580
	taggtgcgat	tcagggttac	ctagggtgca	cctgatgttg	atgctcgatg	gagaattggt	2640
	tttggttact	tgtttgtcac	tttcgacatg	cgttggtcct	tgtttggatt	ttttagggtg	2700
	tccagatgat	ggatgatatg	gtaccgaggg	aactgtggtc	ttgccttcga	aaggggactt	2760
50	catgttatgg	taccacagga	ccagttatcg	aagcatcctt	gttttcaatc	gcattctttt	2820
	tcccccgatg	cctcgagtac	atgatgccca	tagtgagtcg	tagcacacca	gccacaccac	2880
	ctacctccct	tcccgcaacg	ccatcatgcg	gtacgccaaa	tcaaggtcct	ccacaatccc	2940
	atgccaatcg	ccgcacctcc	gcacagcaac	ctcgatcctc	ctccggaacg	cctcgccagc	3000
	atcaatcgcc	cgcaccaacc	cccgatcatc	accaccaggc	gaaggctccg	tctcgtccac	3060
55	cccaaccacc	cgcagtagcc	gcagcagccc	gacgtcctct	cgaccggcgc	aagcac	3116

<210> 1

60 <211> 623

<212> PRT

65 <213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 2

ES 2 284 650 T3

Met Lys Thr Phe Thr Ser Ala Leu Ala Leu Val Val Gly Met Leu Ala
 1 5 10 15
 Pro Gly Ala Val Val Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Gln Arg Asp
 20 25 30
 Leu Val Glu Leu Arg Glu Ala Arg Gln Glu Gly Gly Lys Asp Leu Arg
 35 40 45
 Pro Arg Glu Pro Thr Cys Asn Thr Pro Ser Asn Arg Ala Cys Trp Ser
 50 55 60
 Asp Gly Phe Asp Ile Asn Thr Asp Tyr Glu Val Ser Thr Pro Asp Thr
 65 70 75 80
 Gly Val Thr Gln Ser Tyr Val Phe Asn Leu Thr Glu Val Asp Asn Trp
 85 90 95
 Met Gly Pro Asp Gly Val Val Lys Glu Lys Val Met Leu Ile Asn Gly
 100 105 110
 Asn Ile Met Gly Pro Asn Ile Val Ala Asn Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Val Thr Val Ile Asn Asn Leu Val Thr Asn Gly Thr Ser Ile His Trp
 130 135 140
 His Gly Ile His Gln Lys Asp Thr Asn Leu His Asp Gly Ala Asn Gly
 145 150 155 160
 Val Thr Glu Cys Pro Ile Pro Pro Lys Gly Gly Gln Arg Thr Tyr Arg
 165 170 175
 Trp Arg Ala Arg Gln Tyr Gly Thr Ser Trp Tyr His Ser His Phe Ser
 180 185 190
 Ala Gln Tyr Gly Asn Gly Val Val Gly Thr Ile Gln Ile Asn Gly ro
 195 200 205
 Ala Ser Leu Pro Tyr Asp Ile Asp Leu Gly Val Phe Pro Ile Thr Asp
 210 215 220
 Tyr Tyr Tyr Arg Ala Ala Asp Asp Leu Val His Phe Thr Gln Asn Asn
 225 230 235 240
 Ala Pro Pro Phe Ser Asp Asn Val Leu Ile Asn Gly Thr Ala Val Asn
 245 250 255

ES 2 284 650 T3

	Pro Asn Thr Gly Glu Gly Gln Tyr Ala Asn Val Thr Leu Thr Pro Gly	260	265	270
5	Lys Arg His Arg Leu Arg Ile Leu Asn Thr Ser Thr Glu Asn His Phe	275	280	285
	Gln Val Ser Leu Val Asn His Thr Met Thr Val Ile Ala Ala Asp Met	290	295	300
10	Val Pro Val Asn Ala Met Thr Val Asp Ser Leu Phe Leu Ala Val Gly	305	310	315
	Gln Arg Tyr Asp Val Val Ile Asp Ala Ser Arg Ala Pro Asp Asn Tyr	325	330	335
15	Trp Phe Asn Val Thr Phe Gly Gly Gln Ala Ala Cys Gly Gly Ser Leu	340	345	350
	Asn Pro His Pro Ala Ala He Phe His Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Gly	355	360	365
20	Leu Pro Thr Asp Glu Gly Thr Pro Pro Val Asp His Gln Cys Leu Asp	370	375	380
	Thr Leu Asp Val Arg Pro Val Val Pro Arg Ser Val Pro Val Asn Ser	385	390	400
	Phe Val Lys Arg Pro Asp Asn Thr Leu Pro Val Ala Leu Asp Leu Thr	405	410	415
30	Gly Thr Pro Leu Phe Val Trp Lys Val Asn Gly Ser Asp Ile Asn Val	420	425	430
	Asp Trp Gly Lys Pro Ile Ile Asp Tyr He Leu Thr Gly Asn Thr Ser	435	440	445
35	Tyr Pro Val Ser Asp Asn Ile Val Gln Val Asp Ala Val Asp Gln Trp	450	455	460
	Thr Tyr Trp Leu Ile Glu Asn Asp Pro Glu Gly Pro Phe Ser Leu Pro	465	470	475
40	His Pro Met His Leu His Gly His Asp Phe Leu Val Leu Gly Arg Ser	485	490	495
	Pro Asp Val Pro Ala Ala Ser Gln Gln Arg Phe Val Phe Asp Pro Ala	500	505	510
	Val Asp Leu Ala Arg Leu Asn Gly Asp Asn Pro Pro Arg Arg Asp Thr	515	520	525
50	Thr Met Leu Pro Ala Gly Gly Trp Leu Leu Leu Ala Phe Arg Thr Asp	530	535	540
	Asn Pro Gly Ala Trp Leu Phe His Cys His Ile Ala Trp His Val Ser	545	550	555
55	Gly Gly Leu Ser Val Asp Phe Leu Glu Arg Pro Ala Asp Leu Arg Gln	565	570	575
	Arg Ile Ser Gln Glu Asp Glu Asp Asp Phe Asn Arg Val Cys Asp Glu	580	585	590
60	Trp Arg Ala Tyr Trp Pro Thr Asn Pro Tyr Pro Lys Ile Asp Ser Gly	595	600	605
65	Leu Lys Arg Arg Arg Trp Val Glu Glu Ser Glu Trp Leu Val Arg	610	615	620

ES 2 284 650 T3

	<210> 3	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
15	<400> 3	
20	tgccacactg ccgccaaccg tgct	24
25	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
40	<400> 4	
45	gttcttgata taccaatcag gatg	24
	<210> 5	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
	<400> 5	
65	gccggtgagg atgtagtcga tgat	24

ES 2 284 650 T3

<210> 6

<211> 25

5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

15

<400> 6

20

aggtgacgtt gaaccagtag ttgtc

25

<210> 7

25

<211> 23

<212> ADN

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

40

<400> 7

ctggtgcact tcacgcagaa caa

23

45

<210> 8

<211> 22

50

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

60

<400> 8

65

agaaccactt ccaggtgtcg ct

22