(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 977 697**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2015 PCT/US2015/063550**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16090059**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2015 E 15816306 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3227438**

(54) Título: **Variantes de lacasa y polinucleótidos que las codifican**

(30) Prioridad:

02.12.2014 US 201462086454 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

HELD, DANIEL;
LUTTRINGER, SHERYL y
DOTY, TAMMY

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

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

Variantes de lacasa y polinucleótidos que las codifican

Referencia a un listado de secuencias

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

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a variantes de lacasa, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos para obtener las variantes, métodos para producir las variantes y métodos para usar las variantes.

Descripción de la técnica relacionada

[0003] La lacasa es una polifenol oxidasa (EC 1.10.3.2) que cataliza la oxidación de una variedad de compuestos inorgánicos y aromáticos, particularmente fenoles, con la reducción concomitante de oxígeno molecular a agua.

[0004] Puesto que las lacasas son capaces de catalizar la oxidación de una variedad de compuestos inorgánicos y aromáticos, tienen muchas aplicaciones industriales potenciales tales como la modificación de lignina, el refuerzo de papel, la inhibición de la transferencia de tinte en detergentes, la polimerización de fenol, la coloración del cabello y el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, el uso industrial de lacasas ha sido limitado debido a la baja expresión en células huésped microbianas. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de mejorar la expresión recombinante de lacasas en células huésped microbianas importantes desde el punto de vista industrial.

[0005] En los documentos WO 98/27197, WO 98/27198, WO 98/38286, WO 01/83761, WO 09/127702, WO 2012/138474 y WO 2013/038062 se describen variantes de lacasa con propiedades mejoradas.

[0006] La presente invención proporciona variantes de lacasa con un rendimiento de expresión aumentado en comparación con su progenitora.

Resumen de la invención

[0007] La presente invención se refiere a variantes de lacasa aisladas, que comprenden sustituciones en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2, donde las variantes tienen actividad lacasa y donde la variante tiene al menos un 90 %, pero menos de un 100 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de esta; donde la variante comprende las sustituciones A9R+L79D+L179N, donde el rendimiento de expresión de la variante está incrementado al menos por 2 en comparación con la progenitora que tiene la secuencia SEQ ID N.º: 2.

[0008] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; construcciones de ácido nucleico, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos; métodos para producir las variantes y métodos para obtener las variantes.

[0009] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden las variantes.

[0010] La presente invención también se refiere al uso de las variantes.

Breve descripción de las figuras

[0011]

La figura 1 muestra un mapa de restricción de pMMar27.
La figura 2 muestra un mapa de restricción de pEvFz1.
La figura 3 muestra un mapa de restricción de pDLHD0006.
La figura 4 muestra un mapa de restricción de pDLHD0140.
La figura 5 muestra un mapa de restricción de pDAu571.
La figura 6 muestra un mapa de restricción de pADl006.
La figura 7 muestra un mapa de restricción de pTmmD014.
La figura 8 muestra un mapa de restricción de pAMFS200.
La figura 9 muestra un mapa de restricción de pAMFS201.
La figura 10 muestra un mapa de restricción de pDLHD0199.

La figura 11 muestra un mapa de restricción de pDLHD0201.

Definiciones

[0012] **Variante alélica**: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de la mutación, y puede dar como resultado polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0013] **ADNc**: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura, cortada y empalmada, obtenida a partir de una célula eucariota o procariota. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, incluyendo corte y empalme, antes de aparecer como ARNm cortado y empalmado maduro.

[0014] **Secuencia codificante**: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierto, que comienza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de estos.

[0015] **Secuencias de control**: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, de un mismo gen) o exógena (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante nativa o exógena entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

[0016] **Expresión**: el término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de una variante incluyendo, pero sin limitarse a, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

[0017] **Vector de expresión**: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está unida operativamente a secuencias de control que permiten su expresión.

[0018] **Fragmento**: el término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro, donde el fragmento tiene actividad lacasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de los residuos de aminoácidos del polipéptido maduro.

[0019] **Célula huésped**: el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción o similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0020] **Propiedad mejorada**: el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada con una variante que está mejorada en comparación con la progenitora. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero no se limitan a, eficiencia catalítica, velocidad catalítica, estabilidad química, actividad de blanqueo de tintes, rendimiento de expresión, estabilidad de oxidación, actividad de pH, estabilidad de pH, actividad específica, estabilidad en condiciones de almacenamiento, unión a sustrato, escisión de sustrato, especificidad de sustrato, estabilidad de sustrato, propiedades superficiales, actividad térmica, termoestabilidad y actividad lacasa volumétrica.

[0021] En un aspecto, la propiedad mejorada es el rendimiento de expresión aumentado de una variante en comparación con la progenitora. En otro aspecto, la propiedad mejorada es la actividad específica aumentada de una variante en comparación con la progenitora. En otro aspecto, la propiedad mejorada es el aumento del rendimiento de expresión y el aumento de la actividad específica de una variante en comparación con la progenitora. En otro aspecto, la propiedad mejorada es un aumento del blanqueo de tintes. Por ejemplo, el blanqueo de tintes se emplea en diversas aplicaciones industriales tales como la modificación de lignina, el refuerzo de papel, la inhibición de la transferencia de tinte en detergentes, la polimerización de fenol, el teñido del

cabello, el blanqueo de textiles (en particular el blanqueo de tejido vaquero, como se describe en WO 96/12845 y WO 96/12846) y el tratamiento de aguas residuales.

[0022] **Actividad de blanqueo de tintes aumentada**: el término "actividad de blanqueo de tintes aumentada" significa una capacidad más alta de una variante en comparación con la progenitora para decolorar cualquier tinte que pueda decolorarse usando una enzima lacasa. Los ejemplos de dichos tintes incluyen, pero no se limitan a, tintes azoicos, monoazoicos, disazoicos, nitrosos, xanteno, quinolina, antroquinona, triarilmetano, paraazoanilina, azinaoxazina, estilbeno, anilina y ftalocianina, o mezclas de estos. En algunas formas de realización, el tinte es un tinte azoico (por ejemplo, Negro Reactivo 5 (sal tetrasódica del ácido 4-amino-5-hidroxi-3,6-bis((4-((2-(sulfooxi)etil)sulfonil)fenil)azo)-2,7-naftalenodisulfónico), Violeta Reactivo 5, amarillo de metilo, rojo congo). En algunas formas de realización, el tinte es un tinte de antraquinona (por ejemplo, azul de remazol), índigo (carmín de índigo), o un tinte de triarilmetano/paraazoanilina (por ejemplo, violeta cristal, verde malaquita). En varias formas de realización, el tinte es un tinte reactivo, directo, disperso o pigmentario. En otra forma de realización, el tinte está contenido dentro de una tinta. En otra forma de realización, el tinte está contenido dentro de un textil. En otra forma de realización, el tinte es índigo y/o un tinte a base de azufre. En algunas formas de realización, el textil es tejido vaquero teñido con índigo y/o un tinte a base de azufre. En una forma de realización particular, el textil se tiñe con índigo, y se usa una variante de lacasa para oxidar el índigo hasta obtener isatina.

[0023] En un aspecto, la actividad de blanqueo de tintes de la variante aumenta al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,20 veces, al menos 1,30 veces, al menos 1,40 veces, al menos 1,50 veces, al menos 1,60 veces, al menos 1,70 veces, al menos 1,80 veces, al menos 1,90 veces, al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con la actividad de blanqueo de tintes de la progenitora.

[0024] **Rendimiento de expresión aumentado**: el término "rendimiento de expresión aumentado" significa una cantidad (g) más alta de enzima activa secretada por litro de medio de cultivo del cultivo de una célula huésped que expresa el gen variante en comparación con la cantidad (g) de enzima activa secretada por litro producida en las mismas condiciones de cultivo por la misma célula huésped que expresa el gen progenitor.

[0025] En un aspecto, el rendimiento de expresión de la variante aumenta al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,20 veces, al menos 1,30 veces, al menos 1,40 veces, al menos 1,50 veces, al menos 1,60 veces, al menos 1,70 veces, al menos 1,80 veces, al menos 1,90 veces, al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, o al menos 40 veces en comparación con el rendimiento de expresión del progenitor.

[0026] **Actividad específica aumentada**: el término "actividad específica aumentada" significa una actividad enzimática superior por molécula o µmol de una variante en comparación con la actividad enzimática por molécula o µmol del precursor de la variante. La actividad enzimática se mide en unidades por gramo, donde una unidad se define como la cantidad de actividad lacasa requerida para oxidar 1 nmol de sustrato (por ejemplo, 4,4'-[azinobis(metanililiden)]bis(2,6-dimetoxifenol) (siringaldazina); 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato [ABTS]; 10-(2-hidroxietil)-fenoxazina (HEPO); 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi [TEMPO], índigo carmín, Negro Reactivo 5) por segundo en condiciones de un ensayo basado en la capacidad de la enzima lacasa para oxidar el sustrato, por ejemplo, ABTS, hasta obtener su radical catiónico estable correspondiente, por ejemplo, ABTS+. Por ejemplo, a diferencia de la forma inicial de ABTS, la forma radical es de color verde oscuro con una absorbancia aumentada a 420 nm. La cantidad de formación de color verde es proporcional a la cantidad de actividad lacasa, y puede compararse con una curva estándar de lacasa para determinar la cantidad absoluta de actividad lacasa.

[0027] La actividad específica aumentada de la variante en comparación con la progenitora puede evaluarse, por ejemplo, en condiciones específicas de pH y/o temperatura. Por ejemplo, el pH puede ser cualquier pH en el intervalo de 3 a 7, por ejemplo, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0 (o entre estos). Se puede usar cualquier tampón adecuado para conseguir el pH deseado. Por ejemplo, la temperatura puede ser cualquier temperatura en el intervalo de 25 °C a 90 °C, por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 °C (o entre estas). En otro aspecto, una combinación de dos o más (por ejemplo, varias) de las condiciones anteriores se usan para determinar la actividad específica aumentada de la variante en comparación con la progenitora, tal como cualquier temperatura en el intervalo de 25 °C a 90 °C, por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o 90 °C (o entre estas) a un pH en el intervalo de 3 a 7, por ejemplo, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0 (o entre estos).

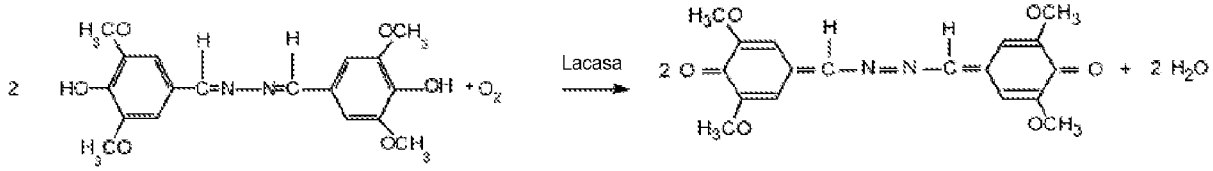
[0028] En un aspecto, la actividad específica de la variante aumenta al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,20 veces, al menos 1,30 veces, al menos 1,40 veces, al menos 1,50 veces, al menos 1,60 veces, al

menos 1,70 veces, al menos 1,80 veces, al menos 1,90 veces, al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con la actividad específica de la progenitora.

[0029] **Aislado**: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o entorno que no se produce en la naturaleza. Los ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia de origen no natural, (2) cualquier sustancia que incluya, pero no se limite a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se haya extraído al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los que está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por el ser humano con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que está asociada de forma natural (por ejemplo, producción recombinante en una célula huésped; múltiples copias de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado de forma natural con el gen que codifica la sustancia).

[0030] **Lacasa**: el término lacasa significa una bencenodiol:oxígeno oxidorreductasa (E.C. 1.10.3.2) que cataliza la siguiente reacción: 1,2- o 1,4-bencenodiol + O_2 = 1,2- o 1,4-benzosemiquinona + $2H_2O$.

[0031] La actividad lacasa puede determinarse midiendo la oxidación de siringaldazina (4,4'-[azinobis(metanililiden)]bis(2,6-dimetoxifenol)) en la quinona correspondiente 4,4'-[azobis(metanililideno])bis(2,6-dimetoxiciclohexa-2,5-dien-1-ona). La reacción (mostrada a continuación) se detecta mediante un aumento en la absorbancia a 530 nm.



La reacción se lleva a cabo en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 23 mM pH 5,5 a 30 °C con sustrato (siringaldazina) 19 µM y polietilenglicol (PEG) 6000 1 g/l. La muestra se coloca en un espectrofotómetro y el cambio en la absorbancia se mide a 530 nm cada 15 segundos hasta 90 segundos. Una unidad de lacasa es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de siringaldazina por minuto en las condiciones analíticas especificadas.

[0032] La actividad lacasa también se puede determinar a partir de la oxidación de siringaldazina en condiciones aerobias. El color violeta producido se midió con fotómetro a 530 nm. Las condiciones de ensayo son siringaldazina 19 mM, tampón Tris/maleato 23 mM, pH 7,5, 30 °C y 1 minuto de tiempo de reacción. Una unidad de lacasa (LAMU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 µmol de siringaldazina por minuto en estas condiciones.

[0033] La actividad lacasa también se puede medir usando 10-(2-hidroxietil)-fenoxazina (HEPO) como sustrato. La HEPO se sintetiza usando el mismo procedimiento que se describe para la 10-(2-hidroxietil)-fenotiazina, (Cauquil, 1960, Bulletin de la Society Chemique de France p. 1049). En presencia de oxígeno, la lacasa oxida la HEPO para dar un radical HEPO que puede monitorizarse fotométricamente a 528 nm.

[0034] La actividad lacasa también se puede medir usando sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Número CAS: 30931-67-0) como sustrato en acetato sódico 100 mM pH 4 y midiendo la absorbancia a 405 nm.

[0035] La actividad lacasa también se puede medir usando otros sustratos tales como índigo carmín o Negro Reactivo 5 usando métodos conocidos en la técnica.

[0036] **Polipéptido maduro**: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 2 según el programa SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 340: 783-795), que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 2 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 4 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 4 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 6 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 6 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 8

según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 8 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 10 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 10 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 12 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 12 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 14 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 14 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 16 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 16 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 18 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 18 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 20 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 20 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 22 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 22 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 519 de la SEQ ID N.º: 24 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 24 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 26 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 26 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 28 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 28 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 30 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 30 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 32 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 32 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 34 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 34 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 36 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 36 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 38 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 38 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 515 de la SEQ ID N.º: 40 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 40 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 520 de la SEQ ID N.º: 42 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 42 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 64 a 518 de la SEQ ID N.º: 44 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 44 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 46 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 46 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 48 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 48 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 50 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 50 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 52 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 52 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 26 a 524 de la SEQ ID N.º: 54 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID N.º: 54 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 26 a 524 de la SEQ ID N.º: 56 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID N.º: 56 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 521 de la SEQ ID N.º: 58 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 58 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 24 a 524 de la SEQ ID N.º: 60 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID N.º: 60 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 517 de la SEQ ID N.º: 62 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 62 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 539 de la SEQ ID N.º: 64 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 18 de la SEQ ID N.º: 64 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 24 a 533 de la SEQ ID N.º: 66 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID N.º: 66 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 21 a 531 de la SEQ ID N.º: 68 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 20 de la SEQ ID N.º: 68 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 25 a 518 de la SEQ ID N.º: 70 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 24 de la SEQ ID N.º: 70 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 518 de la SEQ ID N.º: 93 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 93 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 620 de la SEQ ID N.º: 95 según el programa SignalP 3.0, que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID N.º: 95 son un péptido señal. Se sabe en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresados por el mismo polinucleótido. También se sabe en la técnica que diferentes células huésped procesan polipéptidos de manera diferente y, por lo tanto, una célula huésped que expresa un polinucleótido

puede producir un polipéptido maduro diferente (por ejemplo, que tiene un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) en comparación con otra célula huésped que expresa el mismo polinucleótido.

[0037] **Secuencia codificante del polipéptido maduro**: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad lacasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 1 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 3 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 3 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 5 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 5 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 7 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 7 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 9 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 9 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 11 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 11 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 13 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 13 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 15 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 15 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 17 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 17 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 19 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 19 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 21 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 21 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1557 de la SEQ ID N.º: 23 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 23 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 25 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 25 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 27 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 27 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 29 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 29 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 31 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 31 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 33 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 33 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 35 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 35 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 37 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 37 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1545 de la SEQ ID N.º: 39 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 39 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1560 de la SEQ ID N.º: 41 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 41 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 43 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 43 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 45 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 45 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 47 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 47 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 49 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 49 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 51 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 51 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 76 a 1572 de la SEQ ID N.º: 53 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 75 de la SEQ ID N.º: 53 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 76 a 1572 de la SEQ ID N.º: 55 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 75 de la SEQ ID N.º: 55 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1563 de la SEQ ID N.º: 57 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID

N.º: 57 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 70 a 1572 de la SEQ ID N.º: 59 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 69 de la SEQ ID N.º: 59 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1551 de la SEQ ID N.º: 61 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 61 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 55 a 1617 de la SEQ ID N.º: 63 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 54 de la SEQ ID N.º: 63 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 70 a 1599 de la SEQ ID N.º: 65 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 69 de la SEQ ID N.º: 65 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 61 a 1593 de la SEQ ID N.º: 67 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 60 de la SEQ ID N.º: 67 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 73 a 1554 de la SEQ ID N.º: 69 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 72 de la SEQ ID N.º: 69 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1554 de la SEQ ID N.º: 92 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 92 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1860 de la SEQ ID N.º: 94 según el programa SignalP 3.0, que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 94 codifican un péptido señal.

[0038] En cada uno de los aspectos anteriores, se entenderá que el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" incluye la secuencia de ADNc de la secuencia de ADN genómico o la secuencia de ADN genómico de la secuencia de ADNc.

[0039] **Mediador**: el término "mediador" (o "mediador químico", que se puede usar indistintamente en el presente documento) se define en el presente documento como un compuesto químico que actúa como un mediador redox para transportar electrones de manera eficaz entre una lacasa y un sustrato. Los mediadores químicos también se conocen como potenciadores y aceleradores en la técnica.

[0040] **Mutante**: el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

[0041] **Construcción de ácido nucleico**: el término "construcción de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0042] **Unido operativamente**: el término "unido operativamente" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0043] **Progenitora o lacasa progenitora**: el término "progenitora" o "lacasa progenitora" significa una lacasa a la que se le hace una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones, para producir las variantes de lacasa de la presente invención. La progenitora puede ser un polipéptido de origen natural (de tipo silvestre) o una variante del mismo, o fragmento del mismo.

[0044] **Identidad de secuencia**: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0045] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0046] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra)* - como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, J. Biol, 2000, *supra),* preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0047] **Condiciones de rigurosidad**: el término "condiciones de rigurosidad muy baja" significa sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 25 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 0,2X SSC, SDS al 0,2 % a 45 °C.

[0048] La expresión "condiciones de baja rigurosidad " significa sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 25 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 0,2X SSC, SDS al 0,2 % a 50 °C.

[0049] La expresión "condiciones de rigurosidad media" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 35 %, siguiendo procedimientos de transferencia Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 0,2X SSC, SDS al 0,2 % a 55 °C.

[0050] La expresión "condiciones de rigurosidad media-alta" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 35 %, siguiendo procedimientos de transferencia Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 0,2X SSC, SDS al 0,2 % a 60 °C.

[0051] La expresión "condiciones de alta rigurosidad" significa sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 50 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 0,2X SSC, SDS al 0,2 % a 65 °C.

[0052] La expresión "condiciones de rigurosidad muy alta" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 50 %, siguiendo procedimientos de transferencia Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 0,2X SSC, SDS al 0,2 % a 70 °C.

[0053] **Subsecuencia**: el término subsecuencia significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad lacasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de los nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro.

[0054] **Variante**: el término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad lacasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una deleción significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir un aminoácido adyacente a e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % de la actividad lacasa de la progenitora.

[0055] **Actividad volumétrica**: el término "actividad volumétrica" es el nivel de actividad lacasa producida por unidad de volumen (por ejemplo, ml o litro) de un caldo de cultivo. La actividad lacasa se determina como se describe en el presente documento.

[0056] **Lacasa de tipo salvaje**: el término lacasa "de tipo salvaje" significa una lacasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

Convenciones para la designación de variantes

[0057] Para los fines de la presente invención, el polipéptido de longitud completa descrito en la SEQ ID N.º: 2 se usa para la numeración para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra lacasa. La secuencia de aminoácidos de otra lacasa se alinea con el polipéptido de longitud completa descrito como la SEQ ID N.º: 2 y, en función del alineamiento, el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en el polipéptido de longitud completa (por ejemplo, incluyendo el péptido señal) de la SEQ ID N.º: 2, donde la posición 1 es el primer aminoácido del péptido señal (es decir, Met) y la posición 22 (es decir, Gly) es la primera posición del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0058] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra lacasa puede determinarse mediante alineamiento de múltiples secuencias de polipéptidos usando varios programas informáticos que incluyen, pero no se limitan a, MUSCLE (comparación de secuencias múltiples por log-expectativa; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066; Katoh *et al.*, 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh *et al.*, 2009, *Methods in Molecular Biology* 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, *Bioinformatics* 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA con ClustalW (1,83 o posterior; Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680), usando sus respectivos parámetros por defecto.

[0059] Cuando otra lacasa ha divergido del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 de manera que la comparación tradicional basada en secuencias no detecta su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, *J. Mol. Biol.* 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencias por pares. Puede conseguirse una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso iterativo de búsqueda en bases de datos y es capaz de detectar homólogos remotos (25: 3389-3402). Se puede conseguir una sensibilidad aún mayor si la familia o superfamilia para el polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, *Bioinformatics* 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural y potenciales de solvatación) como entradas a una red neuronal que predice el plegamiento estructural para una secuencia problema. De manera similar, se puede utilizar el método de Gough *et al.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 313: 903-919 para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estas alineaciones se pueden usar a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y la precisión de tales modelos puede evaluarse usando una variedad de herramientas desarrolladas para ese fin.

[0060] Para proteínas de estructura conocida, están disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente, y esas alineaciones son accesibles y se pueden descargar. Dos o más estructuras de proteínas pueden alinearse usando una variedad de algoritmos tales como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos puede utilizarse adicionalmente para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0061] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación se ha adaptado para facilitar la referencia. Se emplea la abreviatura para aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptada por la IUPAC.

[0062] Sustituciones. Para la sustitución de un aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se denomina "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples están separadas por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

[0063] Deleciones. Para la deleción de un aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la deleción de glicina en la posición 195 se denomina "Gly195*" o "G195*". Las deleciones múltiples se separan mediante signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0064] Inserciones. Para la inserción de un aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente, la inserción de lisina después de glicina

en la posición 195 se denomina "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de múltiples aminoácidos se denomina [aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido #1 insertado, aminoácido #2 insertado; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

[0065] En tales casos, el/los residuo(s) de aminoácidos insertado(s) se numeran mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido que precede al/a los residuo(s) de aminoácido insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería, por tanto:

Progenitor:	Variante:
195	195a 195b
G	G - K - A

[0066] Diferentes alteraciones. Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones están separadas por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" o "R170Y,E" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Así, "Tyr167Gly, Ala + Arg170Gly, Ala" designa las siguientes variantes: "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Descripción detallada de la invención

[0067] La presente invención se refiere a variantes de lacasa aisladas, que comprenden sustituciones en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2, donde las variantes tienen actividad lacasa y donde las variantes tienen al menos un 90 % pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de esta; donde la variante comprende las sustituciones A9R+L79D+L179N, donde el rendimiento de expresión de las variantes se incrementa al menos 2 veces en comparación con la progenitora que tiene la secuencia SEQ ID N.º: 2.

Variantes

[0068] En una forma de realización, las variantes tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0069] En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención es de 3-24, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 sustituciones.

[0070] En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en tres posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en cuatro posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en cinco posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en seis posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en siete posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en ocho posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en nueve posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en diez posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en once posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en doce posiciones correspondientes a

cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en trece posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en catorce posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en quince posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en dieciséis posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en diecisiete posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en dieciocho posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en diecinueve posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en veinte posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en veintiún posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en veintidós posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en veintitrés posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en cada posición correspondiente a las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2.

[0071] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 21 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Cys. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución A21C del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2.

[0072] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Cys. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución S37C del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0073] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 102 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución F102A del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0074] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 170 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ala, Met, Gln, Ser o Thr. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución V170A,M,Q,S,T del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0075] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 175 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ser o Thr. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución V175S, T del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0076] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 178 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ser. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución K178S del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0077] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 200 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Asp. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución S200D del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0078] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 262 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Gly. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución A262G del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0079] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 275 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ile. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución V275I del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0080] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 276 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Gly. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución D276G del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0081] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 289 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ile, Lys, Gln, Arg o Thr. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución V289I,K,Q,R,T del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0082] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 292 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Asp, Phe, Gly, His o Lys. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución T292D,F,G,H,K del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0083] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 333 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ser, Glu, Lys o Arg. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución A333S,E,K,R del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0084] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 357 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Asp, Ala, Glu, Phe, Gly, Met, Gln, Ser, Thr, Val o Tyr. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución N357D,A,E,F,G,M,Q,S,T,V,Y del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0085] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 360 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Val, Ala, His o Met. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución I360V,A,H,M del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0086] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 393 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ile. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución Y393I del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0087] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 397 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución S397A del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0088] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 418 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ile, Val, Leu o Met. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución F418I,V,L,M del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0089] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 485 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ser. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución A485S del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0090] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 506 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con His. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución S506H del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0091] En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 518 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución S518A del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0092] Las variantes pueden comprender además una o más alteraciones adicionales, por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o deleciones en una posición o en más (por ejemplo, varias) posiciones distintas.

[0093] Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones amino o carboxilo terminales pequeñas, tales como un residuo metionina amino terminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como una cola de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0094] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en The Proteins, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0095] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0096] Por ejemplo, las variantes pueden comprender además sustituciones en una o más (por ejemplo, varias) posiciones correspondientes a las posiciones 89, 151, 286, 307, 313, 339 y 355 de la SEQ ID N.º: 2, que se describen en WO 2012/138474.

[0097] En un aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 89. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 89 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Ala, Val, Leu o Ile. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución F89A,V,L,I del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0098] En otro aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 151. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 151 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Asp, Glu, Arg o Lys. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución N151D,E,R,K del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0099] En otro aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 286. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 286 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Arg, His o Val. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución F286R,H,V del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0100] En otro aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 307. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 307 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Pro, His o Gly. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución A307P,H,G del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0101] En otro aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 313. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 313 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Asn, Thr o Ser. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución T313N,T,S del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0102] En otro aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 339. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 339 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Trp, Thr o Ser. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución V339W,T,S del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0103] En otro aspecto, la variante comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 355. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 355 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Arg. En otro aspecto, la variante comprende además la sustitución G355R del polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 o del polipéptido maduro de esta.

[0104] En cada uno de los aspectos anteriores, la variante comprende además una o más sustituciones descritas anteriormente en posiciones correspondientes al polipéptido de longitud completa de la SEQ ID N.º: 2 en otras lacasas como progenitoras.

[0105] En otro aspecto, la variante comprende además una o más (por ejemplo, varias) sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F89A,V,L,I N151D,E,R,K F286R,H,V A307P,H,G T313N,T,S V339W,T,S y G355R.

[0106] Las variantes pueden comprender además o incluso comprender además sustituciones en una o más (por ejemplo, varias) posiciones como se describe en WO 98/27197, WO 98/27198, WO 98/27198, WO 98/38286, WO 01/83761y WO 2013/038062.

[0107] Los aminoácidos esenciales de un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones de alanina individuales en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan con respecto a su actividad lacasa para identificar residuos de aminoácidos que son cruciales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también puede determinarse por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos putativos de sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. La identidad de aminoácidos esenciales también puede deducirse a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado. Los aminoácidos esenciales del sitio de unión del cobre (sitio activo) se localizan en las posiciones correspondientes a las posiciones H85, H87, H130, H132, H416, H419, H421, H473, C474, H475, I476, H479 y F484 de la SEQ ID N.º: 2.

[0108] En una forma de realización, el rendimiento de expresión de la variante aumenta al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces o al menos 40 veces en comparación con el rendimiento de expresión de la progenitora.

[0109] En una forma de realización adicional, la actividad específica de la variante aumenta al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,20 veces, al menos 1,30 veces, al menos 1,40 veces, al menos 1,50 veces, al menos 1,60 veces, al menos 1,70 veces, al menos 1,80 veces, al menos 1,90 veces, al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con la actividad específica de la progenitora.

[0110] En una forma de realización adicional, la actividad de blanqueo de tintes de la variante aumenta al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,20 veces, al menos 1,30 veces, al menos 1,40 veces, al menos 1,50 veces, al menos 1,60 veces, al menos 1,70 veces, al menos 1,80 veces, al menos 1,90 veces, al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con la actividad de blanqueo de tintes de la progenitora.

[0111] En una forma de realización adicional, una combinación de mutaciones que aumenta el rendimiento de expresión y la actividad específica aumenta la actividad volumétrica de la lacasa al menos 1,05 veces, al menos

1,10 veces, al menos 1,20 veces, al menos 1,30 veces, al menos 1,40 veces, al menos 1,50 veces, al menos 1,60 veces, al menos 1,70 veces, al menos 1,80 veces, al menos 1,90 veces, al menos 2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces o al menos 40 veces en comparación con la progenitora.

Preparación de las variantes

[0112] La presente invención también se refiere a métodos para obtener una variante que tiene actividad lacasa, que comprende: (a) introducir en una lacasa progenitora sustituciones en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad lacasa; y opcionalmente (b) recuperar la variante; donde la variante tiene al menos un 90 %, pero menos de un 100 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma; donde la variante comprende las sustituciones A9R+L79D+L179N; y donde el rendimiento de expresión de la variante aumenta al menos 2 veces en comparación con la progenitora que tiene la secuencia SEQ ID N.º: 2. En una forma de realización, los métodos comprenden, además, introducir en una lacasa progenitora una sustitución en una o más (por ejemplo, varias) posiciones correspondientes a las posiciones 89, 151, 286, 307, 313, 339 y 355 del polipéptido de longitud completa de SEQ ID N.º: 2, como se describe en este caso.

[0113] Las variantes se pueden preparar usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, como mutagénesis dirigida, construcción de genes sintéticos, construcción de genes semisintéticos, mutagénesis aleatoria, barajado, etc.

[0114] La mutagénesis dirigida es una técnica en la que se introducen una o más (por ejemplo, varias) mutaciones en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica la progenitora. En la presente invención se puede utilizar cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden usar para preparar variantes.

[0115] La mutagénesis dirigida se puede realizar *in vitro* mediante PCR, que implica el uso de cebadores oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida también se puede realizar *in vitro* mediante mutagénesis en casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el progenitor y la posterior ligación de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos pegajosos del plásmido y el inserto se unan entre sí. Véase, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4949-4955; y Barton *et al.*, 1990, *Nucleic Acids Res.* 18: 7349-4966.

[0116] La mutagénesis dirigida también se puede realizar *in vivo* mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0171154; Storici *et al.*, 2001, *Nature Biotechnol.* 19: 773-776; Kren *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43: 15-16.

[0117] La mutagénesis de saturación de sitio reemplaza sistemáticamente una secuencia codificante del polipéptido con secuencias que codifican los 19 aminoácidos en una o más (por ejemplo, varias) posiciones específicas (Parikh y Matsumura, 2005, *J. Mol. Biol.* 352: 621-628).

[0118] La construcción de genes sintéticos implica la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede realizar utilizando diversas técnicas, como la tecnología basada en microchips multiplex descrita por Tian *et al.* (2004, *Nature* 432: 1050-1054) y tecnologías similares donde los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan en chips microfluídicos fotoprogramables.

[0119] Se pueden realizar y probar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de cribado relevante, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a errores, visualización de fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; Patente de EE. UU. n.º 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7: 127).

[0120] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando

métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0121] La construcción de genes semisintéticos se realiza combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos y/o mutagénesis dirigida, y/o mutagénesis aleatoria y/o barajado. La construcción semisintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. De este modo, se pueden sintetizar regiones definidas de genes de *novo*, mientras que otras regiones se pueden amplificar usando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras que otras regiones más se puede someter a amplificación por PCR propensa a errores o amplificación por PCR no propensa a errores. A continuación, se pueden barajar las subsecuencias de polinucleótidos.

Polinucleótidos

[0122] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Construcciones de ácido nucleico

[0123] La presente invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente unida a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0124] El polinucleótido se puede manipular de diversas formas para proporcionar la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0125] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido reconocido por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control transcripcional que median en la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped, incluidos los promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0126] Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de un hongo filamentoso son promotores obtenidos a partir de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma r*eesei, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; los ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos. Otros promotores se describen en la patente de EE. UU. n.º 6,011,147.

[0127] En una levadura huésped, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos *et al*., 1992, *Yeast* 8: 423-488.

[0128] La secuencia de control también puede ser un terminador de la transcripción, que es reconocido por una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está operativamente unido al extremo 3' del polinucleótido que codifica la variante. En la presente invención se puede utilizar cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.

[0129] Los terminadores preferidos para células huésped de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*.

[0130] Los terminadores preferidos para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0131] La secuencia de control también puede ser una región líder no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. El líder está operativamente unido al extremo 5' del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier líder que sea funcional en la célula huésped.

[0132] Los líderes preferidos para las células huésped de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0133] Los líderes adecuados para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces c*erevisiae, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0134] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' del polinucleótido y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.

[0135] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, amilasa TAKA *de Aspergillus oryzae* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum.*

[0136] Guo y Sherman, 1995, *Mol. Celular Biol*. 15: 5983-5990 describen las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura.

[0137] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal unido al extremo N-terminal de una variante y dirige la variante hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal unida naturalmente en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica la variante. De manera alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es extraña a la secuencia codificante. Puede ser necesaria una secuencia codificante del péptido señal extraño cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal extraño puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, se puede usar cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija la variante expresada hacia la vía secretora de una célula huésped.

[0138] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped de hongos filamentosos son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei.*

[0139] Los péptidos señal útiles para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles se describen en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0140] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N-terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo mediante escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La

secuencia codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0141] Cuando están presentes secuencias del péptido señal y del propéptido, la secuencia del propéptido está situada junto al extremo N-terminal de una variante y la secuencia del péptido señal está situada junto al extremo N-terminal de la secuencia del propéptido.

[0142] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante con respecto al crecimiento de la célula huésped. Los ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que hacen que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. En la levadura, se puede usar el sistema de ADH2 o sistema de GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de la alfa-amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, el promotor de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* y el promotor de la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación de genes. En los sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0143] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector, de manera que la secuencia codificante esté operativamente unida con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0144] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda someterse de manera conveniente a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0145] El vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De manera alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0146] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o resistencia viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0147] Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero no se limitan a, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped de hongos filamentosos incluyen, pero no se limitan a, *adeA* (fosforribosil aminoimidazol succinil carboxamida sintasa), *adeB* (fosforribosil aminoimidazol sintasa), *amdS* (acetamidasa), *argb* (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Para usarse en una célula de *Aspergillus,* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y los genes *pyrG* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Para usarse en una célula de *Trichoderma,* se prefieren los genes *adeA*, *adeb*, *amdS*, *hph* y *pyrG*.

[0148] El marcador seleccionable puede ser un sistema de marcador seleccionable dual, como se describe en el documento WO 2010/039889. En un aspecto, el marcador seleccionable dual es un sistema de marcador seleccionable dual *hph-tk*.

[0149] El vector contiene preferiblemente uno o varios elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0150] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una o varias ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales debería contener un número suficiente de ácidos nucleicos, como de 100 a 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases y de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

[0151] Para replicación autónoma, el vector puede comprender, además, un origen de replicación que permita al vector replicarse de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de la replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

[0152] Los ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0153] Los ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de hongos filamentosos son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos descritos en el documento WO 00/24883.

[0154] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de una variante. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido, donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0155] Los procedimientos usados para ligar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes son bien conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0156] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Se introduce un construcción o vector que comprende un polinucleótido en una célula huésped, de modo que el construcción o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante, como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica la variante y su fuente.

[0157] La célula huésped puede ser cualquier celular útil en la producción recombinante de una variante de la presente invención.

[0158] La célula huésped puede ser una célula eucariota, como una célula mamífera, de insecto, vegetal o fúngica.

[0159] La célula huésped puede ser una célula fúngica. Los "hongos", como se utiliza en este documento, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y zygomycota, así como los Oomycota y todos los hongos mitospóricos (según lo definen Hawkswort *et al.* en *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

[0160] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. La "levadura", como se utiliza en este documento, incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea y levadura que pertenece a los hongos imperfectos (Blastomycetes). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el

futuro, para los fines de esta invención, la levadura se definirá como se describe en *Biology and Activity of Yeast* (Skinner, Passmore y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n.º 9, 1980).

[0161] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, como una célula de *Kluyveromyce lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces* douglasii, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia li*polytica.

[0162] La célula huésped fúngica puede ser una célula de hongos filamentosos. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se produce por elongación de las hifas y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo de levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae,* se produce mediante la gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0163] La célula huésped de hongos filamentosos puede ser una célula de *Acremonium, Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0164] Por ejemplo, la célula huésped de hongos filamentosos puede ser una célula de *Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Talaromyces emersonii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0165] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474, y Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787 describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium*. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *el al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* :1920.

Métodos de producción

[0166] La presente invención también se refiere a métodos para producir una variante, que comprende (a) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones propicias para la producción de la variante; y opcionalmente (b) recuperar la variante.

[0167] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar mediante placas de múltiples pocillos, tales como las placas de 24, 48, o 96 pocillos, cultivo en matraz con agitación, o fermentación a pequeña o gran escala (incluidas fermentaciones continuas, por lotes, por lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permitan que la variante se exprese y/o aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o pueden prepararse según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de *American Type Culture Collection*). Si la variante se secreta en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de lisados celulares.

[0168] Las variantes pueden detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las lacasas. Estos métodos de detección incluyen, pero no se limitan a, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante, como se describe en este caso.

[0169] La variante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede recuperar del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, colección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. En un aspecto, se recupera todo el caldo de fermentación que comprende una variante de la presente invención.

[0170] La variante se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatoenfoque y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, *Protein Purification*, Janson y Riden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

[0171] En un aspecto alternativo, la variante no es recupera, sino que se utiliza como fuente de la variante una célula huésped de la presente invención que expresa la variante.

Formulaciones de caldos de fermentación o composiciones celulares

[0172] La presente invención también se refiere a una formulación de caldo de fermentación o una composición celular que comprende una variante de la presente invención. El producto de caldo de fermentación comprende, además, ingredientes adicionales usados en el proceso de fermentación, tales como, por ejemplo, células (incluidas las células huésped que contienen el gen que codifica la variante que se usan para producir la variante de interés), restos celulares, biomasa, medios de fermentación y/o productos de fermentación. En algunas formas de realización, la composición es un caldo completo de células muertas que contiene ácido(s) orgánico, células muertas y/o restos celulares, y medio de cultivo.

[0173] El término "caldo de fermentación", como se utiliza en este documento, se refiere a una preparación producida por fermentación celular que no experimenta ninguna recuperación y/o purificación o es mínima. Por ejemplo, los caldos de fermentación se producen cuando los cultivos microbianos se cultivan hasta la saturación, se incuban en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, expresión de enzimas por las células huésped) y la secreción en un medio de cultivo celular. El caldo de fermentación puede contener contenidos no fraccionados o fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Normalmente, el caldo de fermentación no está fraccionado y comprende el medio de cultivo gastado y los restos celulares presentes después de que las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación. En algunas formas de realización, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular gastado, enzimas extracelulares y células microbianas viables y/o no viables.

[0174] En una forma de realización, la formulación de caldo de fermentación y la composición celular comprenden un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal del mismo y, un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. En una forma de realización específica, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de los mismos o una mezcla de dos o más de los anteriores, y el segundo componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de los mismos o una mezcla de dos o más de los anteriores.

[0175] En un aspecto, la composición contiene uno o varios ácido(s) orgánico(s) y, opcionalmente, también contiene células muertas y/o restos celulares. En una forma de realización, las células muertas y/o los restos celulares se eliminan de un caldo completo de células muertas para proporcionar una composición que esté exenta de estos componentes.

[0176] La formulación de caldo de fermentación o la composición celular puede comprender, además, un agente conservante y/o antimicrobiano (por ejemplo, bacterioestático), que incluye, pero de forma no limitada, sorbitol, cloruro de sodio, sorbato de potasio y otros conocidos en la técnica.

[0177] La formulación de caldo de fermentación o la composición celular puede comprender, además, múltiples actividades enzimáticas, tales como una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo que consta de una hidrolasa, una isomerasa, una ligasa, una liasa, una oxidorreductasa y una transferasa, por ejemplo, un polipéptido AA9, alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, amilasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, expansina,

glucoamilasa, invertasa, lacasa, enzima ligninolítica, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, swollenina, transglutaminasa o xilanasa.

[0178] El caldo completo o la composición de células muertas puede contener los contenidos no fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Normalmente, el caldo completo o la composición de células muertas contiene el medio de cultivo gastado y los restos celulares presentes después de que las células microbianas (por ejemplo, las células de hongos filamentosos) se cultiven hasta la saturación, y se incuben en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas. En algunas formas de realización, el caldo completo o la composición de células muertas contiene el medio de cultivo celular gastado, enzimas extracelulares y células muertas. En algunas formas de realización, las células microbianas presentes en el caldo completo o la composición de células muertas se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

[0179] Un caldo completo o una composición celular, como se describe en este caso, es normalmente un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células muertas, restos celulares, componentes de medios de cultivo y/o enzima(s) insoluble(s). En algunas formas de realización, los componentes insolubles se pueden retirar para proporcionar una composición líquida clarificada.

[0180] La formulación de caldo completo y la composición celular de la presente invención se pueden producir mediante un método descrito en los documentos WO 90/15861 o WO 2010/096673.

Composiciones enzimáticas

[0181] La presente invención también se refiere a una composición que comprende una variante de la presente invención. Preferiblemente, la composición está enriquecida en dicha variante. El término "enriquecido" indica que la actividad lacasa de la composición ha aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0182] La composición puede comprender una variante de la presente invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo que consta de una hidrolasa, una isomerasa, una ligasa, una liasa, una oxidorreductasa y una transferasa, por ejemplo, un polipéptido AA9, una alfa-galactosidasa, una alfa-glucosidasa, una aminopeptidasa, una amilasa, una beta-galactosidasa, una beta-glucosidasa, una beta-xilosidasa, una carbohidrasa, una carboxipeptidasa, una catalasa, una celobiohidrolasa, una celulasa, una quitinasa, una cutinasa, una ciclodextrina glucosiltransferasa, una desoxirribonucleasa, una endoglucanasa, una esterasa, una expansina, una glucoamilasa, una invertasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una lipasa, una manosidasa, una mutanasa, una oxidasa, una enzima pectinolítica, una peroxidasa, una fitasa, una polifenoloxidasa, una enzima proteolítica, una ribonucleasa, una swollenina, una transglutaminasa o una xilanasa.

[0183] La composición se puede preparar según métodos conocidos en la técnica y se puede encontrar en forma de una composición líquida o seca. La composición se puede estabilizar según métodos conocidos en la técnica.

[0184] A continuación se proporcionan ejemplos de usos preferidos de la composición de la presente invención. La dosificación de la composición y otras condiciones bajo las cuales se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0185] Las variantes de la presente invención se puede usar en varias aplicaciones industriales, incluidas, pero de forma no limitada, conversión de celulosa (WO 2013/087027), modificación de lignina (WO 1995/033836 y WO 1996/000290), fortalecimiento del papel, inhibición de la transferencia de tintes en detergentes, polimerización de fenol, teñido del cabello, blanqueo de textiles (en particular blanqueo de vaqueros, como se describe en los documentos WO 1996/12845 y WO 1996/12846), teñido de textiles (WO 2001/044563, WO 2000/031333, WO 1997/023684, WO 1997/023685), abrasión de textiles (WO 1997/025468), tratamiento de aguas residuales y desintoxicación de material celulósico pretratado (WO 2008/134259). Se puede usar cualquier composición detergente normalmente para enzimas, por ejemplo, las composiciones detergentes descritas en el documento WO 95/01426.

[0186] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para decolorar un tinte, que comprende tratar el tinte con una variante de lacasa de la presente invención. En una forma de realización, el tinte puede ser cualquier tinte que sea un sustrato para una lacasa. Por ejemplo, el tinte puede ser índigo carmín o Reactive Black (Negro Reactivo) 5.

[0187] La presente invención se describe con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Medios y soluciones

[0188] El medio inductor de celulasa (CIM, por sus siglas en inglés) estaba compuesto por 20 g de celulosa, 10 g de sólidos macerados de maíz, 1,45 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,08 g de KH_2PO_4, 0,28 g de $CaCl_2$, 0,42 g de $MgSO_4$-$7H_2O$, 0,42 ml de solución de metales traza de *Trichoderma*, 1-2 gotas de antiespumante y agua desionizada hasta 1 litro; pH ajustado a 6,0.

[0189] Las placas de COVE estaban compuestas por 342,3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina de COVE, 10 ml de acetamida 1 M, 10 ml de CsCl 1,5 M, 25 g de agar noble (Difco) y agua desionizada hasta 1 litro.

[0190] Las placas de COVE2 + uridina 10 mM estaban compuestas por 30 g de sacarosa, 20 ml de solución salina de COVE, 10 ml de acetamida 1 M, 10 ml de uridina 1 M, 25 g de agar noble (Difco) y agua desionizada hasta 1 litro.

[0191] La agarosa superior de COVE-N-JP estaba compuesta por 342,3 g de sacarosa, 3 g de $NaNO_3$, 0,52 g de KCl, 0,52 g de $MgSO_4 \cdot 7H_20$, 6 g de $NaNO_3$, 1,52 g de KH_2PO_4, 0,04 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0,4 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 mg de $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,8 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de agarosa de bajo punto de fusión y agua desionizada hasta 1 litro.

[0192] Las placas de agar de COVE-N-gly estaban compuestas por 218 g de sorbitol, 10 g de glicerol, 2,02 g de KNO_3, 1,3 g de KCl, 1,3 g de MgSO4·7H20, 6 g de $NaNO_3$, 3,8 g de KH_2PO_4, 0,1 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 1 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,75 mg de $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 2 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 25 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 25 g de agar noble y agua desionizada hasta 1 litro.

[0193] La solución salina de COVE estaba compuesta por 26 g de KCl, 26 g de $MgSO_4 \cdot 7H_20$, 76 g de KH_2PO_4, 50 ml de solución de metales traza de COVE y agua desionizada hasta 1 litro.

[0194] La solución de metales traza de COVE estaba compuesta por 0,04 g de $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0,4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,8 g de $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$, 10 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y agua desionizada hasta 1 litro.

[0195] Las placas de LB estaban compuestas por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar bacteriológico y agua desionizada hasta 1 litro.

[0196] El medio LB estaba compuesto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y agua desionizada hasta 1 litro.

[0197] El medio M410 estaba compuesto por 50 g de maltosa, 50 g de glucosa, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_20$, 2 g de KH_2PO_4, 4 g de polvo anhidro de ácido cítrico, 8 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0,5 g de $CaCl_2$, 17 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,1 mg de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 27,6 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 28,6 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, y agua desionizada hasta 1 litro; el medio se ajustó el pH a 6,0 con 10-20 ml de 10 N de NaOH. La solución final se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

[0198] Las placas de agar con medio mínimo estaban compuestas por 342,3 g de sacarosa, 10 g de glucosa, 4 g de $MgSO_4 \cdot 7H_20$, 6 g de $NaNO_3$, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH_2PO_4, 0,04 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0,4 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 mg de $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,8 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 500 mg de ácido cítrico, 4 mg de d-biotina, 20 g de agar noble y agua desionizada hasta 1 litro.

[0199] El tampón PEG estaba compuesto por 500 g de polietilenglicol 4000 (PEG 4000), $CaCl_2$ 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y agua desionizada hasta 1 litro; esterilizado por filtración.

[0200] STC estaba compuesto por sorbitol 1 M, CaC_{l2} 10 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; esterilizado por filtración.

[0201] El medio sintético definido que carecía de uridina estaba compuesto por 18 mg de hemisulfato de adenina, 76 mg de alanina, 76 mg de clorhidrato de arginina, 76 mg de monohidrato de asparagina, 76 mg de ácido aspártico, 76 mg de clorhidrato de cisteína monohidrato, 76 mg de sal monosódica de ácido glutámico, 76 mg de glutamina, 76 mg de glicina, 76 mg de histidina, 76 mg de mioinositol, 76 mg de isoleucina, 380 mg de leucina, 76 mg de monoclorhidrato de lisina, 76 mg de metionina, 8 mg de sal de potasio de ácido p-aminobenzoico, 76 mg de fenilalanina, 76 mg de prolina, 76 mg de serina, 76 mg de treonina, 76 mg de triptófano, 76 mg de sal disódica de tirosina, 76 mg de valina y agua desionizada hasta 1 litro.

[0202] El tampón TAE estaba compuesto por 4,84 g de Tris Base, 1,14 ml de ácido acético glacial, 2 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0 y agua desionizada hasta 1 litro.

[0203] El tampón TBE estaba compuesto por 10,8 g de Tris Base, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0 y agua desionizada hasta 1 litro.

[0204] La solución de metales traza de *Trichoderma* estaba compuesta por 216 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 58 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,4 g de H_3BO_3, 336 g de ácido cítrico y agua desionizada hasta 1 litro.

[0205] El medio YP estaba compuesta por 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona Bacto y agua desionizada hasta 1 litro.

[0206] Las placas de 2XYT + ampicilina estaban compuestas por 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio, 15 g de agar Bacto y agua desionizada hasta 1 litro. Se añadió un ml de una solución de ampicilina de 100 mg/ml después de que el medio tratado en autoclave se atemperara a 55 °C.

Tabla 1: Cebadores usados en los siguientes ejemplos.

Identificador	SEQ ID N.º	Secuencia (5'-3')
1204672	71	TCCTCTATATACACAACTGGGGATCCACCATGTCGAGGTTTCACTCTCTTCTCG CTTTC
1204673	72	TCCTCTATATACACAACTGGGGATCCACCATGTCGAGGTTTCACTCTCTTCTCG CTTTC TCTAGATCTCGAGCTCGCTAGAGTCGACCTACTGGTCGCTCGGGTCGAG
1204564	73	CATGGTGGATCCCCAGTTGTGTATATAGAGG
614604	74	TAGGTCGACTCTAGCGAGCTCGAGATC
999551	75	ACATGTCTTTGATAAgCTAGcGGGCCGCATCATGTA
999552	76	TACATGATGCGGCCCgCTAGcTTATCAAAGACATGT
613017	77	ttaatcgccttgcagcacaCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC
613018	78	acaataaccctgataaatgcGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTC
613019	79	agatagggttgagtgttgttccGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
613020	80	ttctacacgaaggaaagagGAGGAGAGAGTTGAACCTGGACG
613022	81	aggttcaactctctcctcCTCTTTCCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG
613021	82	tcagtgagcgaggaagcggTGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG
1209071	83	TCAACCGCGGACTGCGCACCATGTCGAGGTTTCACTCTCT
1209072	84	GGCTTTCGCCACGGAGCTTACTACTGGTCGCTCGGGTCGA
1206637	85	CTGGCCGTAGAGCTTAAAGTATGTCCC
1206638	86	CGGTCGATTACAATCACATGACTTGGCTTC
1217524	88	TCCTCTATATACACAACTGGGGATCCACCATGTCGAGGTTCCAGTCTCTTTTCT TCTTCG
1217525	89	TCTAGATCTCGAGCTCGCTAGAGTCGACCTAGAGGTCGCTCGGGTCGAGCGC G
1217528	90	TCCTCTATATACACAACTGGGGATCCACCATGAGGTCCTTCATCAGCGCCGCG AC
1217529	91	TCTAGATCTCGAGCTCGCTAGAGTCGACCTACGCCTTGACCAGCCACTCGCCC

Ejemplo 1: Cribado de halo de agar de ABTS para determinar la actividad lacasa en transformantes primarios

[0207] Los transformantes primarios se cribaron para determinar la producción de la actividad lacasa en placas de agar con medio mínimo cubiertas con agarosa superior de COVE-N-JP que contenía (ácido 2,2'-azinobis-(3-etibenzotiazolina-6-sulfónico)) 1 mM (ABTS). Los transformantes que producían halos verdes sobre las placas de ABTS se colocaron en placas de agar de COVE-N-gly antes de realizar más análisis.

Ejemplo 2: Ensayo líquido de ABTS para determinar la actividad lacasa

[0208] El ensayo se realizó usando una estación robotizada Beckman Coulter Biomek 3000 (Beckman Coulter, Inc.). Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron apropiadamente en acetato de sodio 0,1 M, tampón TRITON® X-100 pH 5,0 al 0,01 % (tampón de muestra) seguido de una dilución en serie de 0 veces a 1/3 veces a 1/9 veces de la muestra diluida. Se diluyó una lacasa estándar usando pasos de 2 veces comenzando por una

concentración de 0,06 LAMU/ml y terminando con una concentración de 0,0075 LAMU/ml en el tampón de muestra. Se transfirió un total de 20 µl de cada dilución, incluido el estándar de lacasa a una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo doscientos microlitros de una solución de sustrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0 + 0,275 mg/ml de ABTS + TRITON® X-100 al 0,01 %) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la velocidad de la reacción se midió a una densidad óptica de 405 nm en un espectrofotómetro SPECTRAMAX® M5 (Molecular Devices). Las concentraciones de las muestras se determinaron mediante extrapolación de la curva estándar generada.

Ejemplo 3: Ensayo líquido de siringaldazina para determinar la actividad lacasa

[0209] El ensayo se realizó usando una Beckman Coulter Biomek 3000. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron apropiadamente en acetato de sodio 0,1 M, tampón TRITON® X-100 pH 5,0 al 0,01 % (tampón de muestra) seguido de una serie de diluciones de 0 veces a 1/3 veces a 1/9 veces de la muestra diluida. Se diluyó una lacasa estándar usando pasos de 2 veces comenzando por una concentración de 1,16 LAMU/ml y terminando con una concentración de 0,145 LAMU/ml en el tampón de muestra. Se transfirió un total de 20 µl de cada dilución, incluido el estándar de lacasa a una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo doscientos microlitros de una solución de sustrato de siringaldazina 0,22 mM (siringaldazina 0,56 mM en etanol al 96 % (Stock) diluida a 0,22 mM en tampón de muestra) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 6 minutos. Durante la incubación, la velocidad de la reacción se midió a una densidad óptica de 540 nm en un espectrofotómetro SPECTRAMAX® M5. Las concentraciones de las muestras se determinaron mediante extrapolación de la curva estándar generada.

Ejemplo 4: Ensayo líquido de HOBT-índigo carmín para determinar la actividad lacasa

[0210] Se emplea un ensayo adicional de actividad lacasa para monitorear la actividad blanqueadora de tintes (índigo carmín) de las variantes de lacasa en relación con la lacasa progenitora a través de la oxidación por oxígeno molecular, catalizado por lacasa en presencia de un mediador (hidroxibenzotriazol). Para cada reacción, se combinaron 12 µl de solución mediadora de hidroxibenzotriazola (HOBT) (Sigma-Aldrich) (37,5 mM en DMSO al 10 %) con 12 µl de solución de índigo carmín (Sigma-Aldrich) (1,0 g/ml en agua), 60 µl de acetato de sodio 100 mM, pH 5,0, $CuSO_4$ 1 mM y 60 µl de agua, y se dispensaron en placas de 96 pocillos. Las reacciones se iniciaron añadiendo 10 µl de caldo de cultivo líquido a cada pocillo, y las placas se sellaron con un sello para placas de PCR y se incubaron a 60 °C durante 30 minutos. El blanqueo de tintes se evaluó midiendo la absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro SPECTRAMAX® M5.

Ejemplo 5: Construcción del plásmido pMMar27 como vector de expresión de levadura

[0211] El plásmido pMMar27 se construyó para la expresión de la celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* Cel6A en levadura. El plásmido se generó a partir de un linaje de vectores de expresión de levadura: el plásmido pMMar27 se construyó a partir del plásmido pBM175b; el plásmido pBM175b se construyó a partir del plásmido pBM143b (WO 2008/008950) y el plásmido pJLin201; y el plásmido pJLin201 se construyó a partir del pBM143b.

[0212] EL plásmido pJLin201 es idéntico a pBM143b excepto que un sitio de *Xba* I inmediatamente aguas abajo de un gen de la variante de la lipasa de *Thermomyce lanuginosus* en pBM143b se mutó a un sitio de *Nhe* I único. Se usó un kit de mutagénesis dirigida QUIKCHANGE® II XL (Stratagene) para cambiar la secuencia de *Xba* I (TCTAGA) a una secuencia de *Nhe* I (gCTAGc) en pBM143b. La PCR estaba compuesta por 125 ng de los cebadores 999551 y 999552, 20 ng de pBM143b, tampón de reacción 1X QUIKCHANGE® (Stratagene), 3 µl de QUIKSOLUTION@ (Stratagene), 1 µl de mezcla de dNTP y 1 µl de una Pfu Ultra HF (Stratagene) de 2,5 unidades/ml en un volumen final de 50 µl. La PCR se realizó usando un termociclador EPPENDORF® MASTERCYCLER® (Eppendorf AG) programado para 1 ciclo a 95 °C durante 1 minuto; 18 ciclos cada uno a 95 °C durante 50 segundos, 60 °C durante 50 segundos y 68 °C durante 6 minutos y 6 segundos; y 1 ciclo a 68 °C durante 7 minutos. Después de la PCR, el tubo se colocó en hielo durante 2 minutos. Luego se añadió directamente un microlitro de *Dpn* I (Promega) a la mezcla reactiva y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se usó un volumen de 2 µl de la reacción digerida con *Dpn* I para transformar células ultracompetentes de *E. coli* XL10 GOLD® (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron transformantes de *E. Coli* en placas de 2XYT más ampicilina. Se aisló ADN plasmídico de varios de los transformantes usando un BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc.). Un plásmido con el cambio de *Nhe* I deseado se confirmó mediante digestión de restricción y análisis de secuenciación utilizando un analizador genético 3130XL (Applied Biosystems) y se denominó plásmido pJLin201. Para eliminar posibles errores de PCR introducidos por mutagénesis dirigida, se construyó el plásmido pBM175b clonando el fragmento que contiene el sitio de *Nhe* I de vuelta al plásmido pBM143b. Brevemente, se digirió el plásmido pJLin201 con *Nde* I y *Mlu* I y el fragmento resultante se clonó en pBM143b, previamente digerido con las mismas enzimas, usando un kit de ligación rápida (Roche Diagnostics Corp.). Brevemente, se mezclaron 7 µl del fragmento de pJLin201 digerido con *Nde* I/*Mlu* I y 1 µl del pBM143b digerido con 2 µl de tampón de dilución de ADN 5X (Roche Diagnostics Corp.), 10 µl de tampón de ligación de ADN 2X T4 (Roche Diagnostics Corp.) y 1 µl de ADN ligasa T4 (Roche Diagnostics Corp.) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se transformaron dos microlitros de la ligación en células XL1-Blue

(Stratagene) y se extendieron en placas de 2XYT más ampicilina. El ADN plasmídico se purificó a partir de varios transformantes utilizando un BIOROBOT® 9600 y se analizó mediante secuenciación de ADN usando un analizador genético 3130XL para identificar un plásmido que contenía el inserto de *pyrG* de *A. nidulans* deseado. Un plásmido con la secuencia de ADN esperada se denominó pBM175b.

[0213] El plásmido pMMar27 se construyó a partir de pBM175b y un gen amplificado de la celobiohidrolasa II Cel6A de *T. Terrestris* con protuberancias diseñadas para su inserción en pBM175b digerido. El plásmido pBM175b que contiene el gen de la variante de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* bajo el control del promotor de CUP1 contiene sitios de *Hind* III y *Nhe* I únicos para eliminar el gen de la lipasa. Se digirió el plásmido pBM175b con estas enzimas de restricción para eliminar el gen de la lipasa. Después de la digestión, el vector vacío se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TBE, donde se escindió del gel un fragmento de aproximadamente 5215 pb y se extrajo usando un kit de extracción en gel QIAQUICK® (QIAGEN Inc.). La reacción de ligación (20 µl) estaba compuesta por tampón 1X IN-FUSION® (BD Biosciences), BSA 1X (BD Biosciences), 1 µl de enzima IN-FUSION® (diluida 1:10) (BD Biosciences), 99 ng de pBM175b digerido con *Hind* III y *Nhe* I y 36 ng del producto de PCR de la celobiohidrolasa II Cel6A de *T. terrestris* purificado. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un volumen de 2 µl de la reacción IN-FUSION® se transformó en células ultracompetentes de *E. Coli* XL10-GOLD® (Stratagene). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. Se seleccionó una colonia que contenía Cel6A de *T. terrestris* insertada en el vector de pBM175b en lugar del gen de la lipasa, lo que dio como resultado pMMar27 (figura 1). El plásmido seleccionado contenía un error de PCR en la posición 228 del codón de inicio, TCT en vez de TCC, pero dio como resultado un cambio silencioso en la celobiohidrolasa II Cel6A de *T. Terrestris*.

Ejemplo 6: Construcción del vector de expresión pEvFz1

[0214] El vector de expresión pEvFz1 se construyó modificando pBM120a (patente de EE. UU. 8,263,824) para que comprenda el promotor NA2/NA2-tpi, la secuencia terminadora de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AMG) y el gen orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa de *Aspergillus nidulans* (*pyrG*) como marcador seleccionable.

[0215] El plásmido pEvFz1 se generó clonando el gen *pyrG* de *A. nidulans* de pAILo2 (WO 2004/099228) en pBM120a. Los plásmidos pBM120a y pAILo2 se digirieron con *Nsi* I durante toda la noche a 37 °C. El fragmento del vector pBM120a linealizado de 4176 pb resultante y el inserto del gen *pyrG* de 1479 pb de pAILo2 se purificaron cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % utilizando tampón TAE, se escindieron del gel y se extrajeron utilizando un kit de extracción en gel QIAQUICK®.

[0216] El inserto del gen *pyrG* de 1479 pb se ligó al fragmento de pBM120a digerido con *Nsi* I usando un kit QUICK LIGATION™ (New England Biolabs). La reacción de ligación estaba compuesta por tampón de reacción 1X QUICK LIGATION™ (New England Biolabs), 50 ng del vector pBM120a digerido con *Nsi* I, 54 ng del inserto del gen *pyrG* digerido con *Nsi* I de 1479 pb y 1 µl de ADN ligasa T4 en un volumen total de 20 µl. La mezcla de ligación se incubó a 37 °C durante 15 minutos, después a 50° C durante 15 minutos y luego se colocó en hielo.

[0217] Un µl de la mezcla de ligación se transformó en células de *Escherichia coli* químicamente competentes de ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen). Los transformantes se seleccionaron en placas de 2XYT más ampicilina. El ADN plasmídico se se purificó a partir de varios transformantes utilizando un BIOROBOT® 9600 y se analizó mediante secuenciación de ADN mediante un analizador genético 3130XL para identificar un plásmido que contenía el inserto de *pyrG* de *A. nidulans* deseado. Un plásmido con la secuencia de ADN esperada se denominó pEvFz1 (figura 2).

Ejemplo 7: Construcción del plásmido pDLHD0006 como vector de lanzadera de levadura/*E. coli*/*A. oryzae*

[0218] El plásmido pDLHD0006 se construyó como vector base para permitir la construcción de una biblioteca de casetes de expresión de *Aspergillus oryzae* utilizando clonación recombinante de levadura. El plásmido pDLHD0006 se construyó combinando tres fragmentos de ADN usando clonación recombinante de levadura: El fragmento 1 que contiene el origen de replicación pUC de *E. coli*, el marcador seleccionable de beta-lactamasa (*ampR*) de *E. coli*, el marcador seleccionable de levadura URA3 y el origen de replicación de 2 micras de levadura procedente de pMMar27 (fragmento del ejemplo 5); el fragmento 2 que contiene 2 el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes que codifican la alfa-amilasa neutra de Aspergillus niger y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, marco de lectura abierto (ORF) de lipasa y terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* procedente de pJaL1262 (WO 2013/178674); y el fragmento 3 que contiene el marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus nidulans* procedente de pEvFz1 (ejemplo 5).

Tabla II.

pDLHD0006	Contenidos de PCR	Plantilla de PCR
Fragmento 1	ori de *E. coli*/AmpR/URA/2 micrones (4,1 kb)	pMMar27

Fragmento 2	PR NA2-tpi/de lipasa/Tamg (4,5 kb)	pJaL1262
Fragmento 3	gen *pyrG* de pEvFz1 (1,7 kb)	pEvFz1

[0219] El fragmento 1 se amplificó usando los cebadores 613017 (sentido) y 613018 (antisentido) mostrados a continuación. EL cebador 613017 se diseñó para contener una región flanqueante con homología de secuencia con el fragmento 3 (minúscula) y el cebador 613018 se diseñó para contener una región flanqueante con homología de secuencia con el fragmento 2 (minúscula) para permitir la clonación recombinante de levadura entre los tres fragmentos de PCR.

[0220] El fragmento 1 se amplificó mediante PCR en una reacción compuesta por 10 ng del plásmido pMMar27, 0,5 µl de ADN polimerasa PHUSION® (New England Biolabs, Inc.), 20 pmol del cebador 613017, 20 pmol del cebador 613018, 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl del tampón 5X PHUSION® HF (New England Biolabs, Inc.) y 35,5 µl de agua. La reacción se incubó en un termociclador EPPENDORF® MASTERCYCLER® programado para 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos; y 30 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 1,5 minutos. El producto de PCR de 4,1 kb (fragmento 1) se usó directamente para la recombinación de levadura con los fragmentos 2 y 3 descritos a continuación.

[0221] El fragmento 2 se amplificó usando cebadores 613019 (sentido) y 613020 (antisentido). El cebador 613019 se diseñó para contener una región flanqueante de homología de secuencia con el fragmento 1 (minúscula) y el cebador 613020 se diseñó para contener una región flanqueante de homología de secuencia con el fragmento 3 (minúscula) para permitir la clonación recombinante de levadura entre los tres fragmentos de PCR.

[0222] El fragmento 2 se amplificó mediante PCR en una reacción compuesta por 10 ng del plásmido pJaL1262, 0,5 µl de ADN polimerasa PHUSION®, 20 pmol de cebador 613019, 20 pmol de cebador 613020, 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl del tampón 5X PHUSION® HF y 35,5 µl de agua. La reacción se incubó en un termociclador EPPENDORF® MASTERCYCLER® programado para 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos; 30 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 2 minutos; y se mantuvo a 20 °C. El producto de PCR de 4,5 kb (fragmento 2) se usó directamente para la recombinación de levadura con el fragmento 1 descrito anterior y el fragmento 3 descrito a continuación.

[0223] El fragmento 3 se amplificó usando los cebadores 613022 (sentido) y 613021 (antisentido). El cebador 613021 se diseñó para contener una región flanqueante de homología de secuencia con el fragmento 2 (minúscula) y el cebador 613022 se diseñó para contener una región flanqueante de homología de secuencia con el fragmento 1 (minúscula) para permitir la clonación recombinante de levadura entre los tres fragmentos de PCR.

[0224] El fragmento 3 se amplificó mediante PCR en una reacción compuesta por 10 ng del plásmido pEvFz1 (ejemplo 5), 0,5 µl de ADN polimerasa PHUSION®, 20 pmol del cebador 613021, 20 pmol del cebador 613022, 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl del tampón 5X PHUSION® HF y 35,5 µl de agua. La reacción se incubó en un termociclador EPPENDORF® MASTERCYCLER® programado para 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos; 30 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 2 minutos; y se mantuvo a 20 °C. El producto de PCR de 1,7 kb resultante (fragmento 3) se usó directamente para la recombinación de levadura con los fragmentos 1 y 2 descritos anteriormente.

[0225] Se usó el siguiente procedimiento para combinar los tres fragmentos de PCR mediante clonación recombinante basada en la homología de levadura. Se combinó una parte alícuota de 20 µl de cada uno de los tres fragmentos de PCR con 100 µg de ácido desoxirribonucleico monocatenario de testículos de salmón (Sigma-Aldrich), 100 µl de células de levadura competentes de la cepa YNG318 (ATCC de *Saccharomyces cerevisiae* 208973) y 600 µl de tampón PLATE (Sigma-Aldrich), y se mezclaron. La reacción se incubó a 30 °C durante 30 minutos con agitación a 200 r.p.m. Luego se continuó la reacción a 42 °C durante 15 minutos sin agitación. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 5.000 × g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se suspendió en 200 µl de agua tratada en autoclave y se dividió en dos placas de agar que contenían medio sintético definido que carecía de uridina y se incubó a 30 °C durante tres días. Las colonias de levadura se aislaron de la placa utilizando 1 ml de agua tratada en autoclave. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 13.000 × g durante 30 segundos y se añadió una parte alícuota de 100 µl de perlas de vidrio. La mezcla de células y perlas se suspendió en 250 µl del tampón P1 (QIAGEN Inc.) y luego se agitó durante 1 minuto para lisar las células. El ADN plasmídico se purificó usando un kit QIAPREP® Spin Miniprep (QIAGEN Inc.). Luego se transformó una alícuota de 3 µl del ADN plasmídico en células electrocompetentes ONE SHOT® TOP10 de *E. Coli* (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se esparcieron cincuenta µl de células transformadas en placas LB suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Cada uno de los transformantes se recogió en 3 ml del medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml y se cultivaron durante toda la noche a 37 °C con agitación a 250 r.p.m. El ADN plasmídico se purificó a partir de colonias usando un kit QIAPREP® Spin Miniprep. La secuenciación de ADN con

un analizador genético 3130XL confirmó la presencia de cada uno de los tres fragmentos en un plásmido final denominado pDLHD0006 (figura 3).

Ejemplo 8: Clonación de la lacasa de *Trametes villosa* de tipo salvaje para la expresión en una cepa de cribado de *Aspergillus oryzae*

[0226] El ADNc de la lacasa de *Trametes villosa* de tipo salvaje (SEQ ID N.º: 1 para la secuencia de ADNc y SEQ ID N.º: 2 para la secuencia de aminoácidos deducida) se clonó en un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*/A. oryzae Flp/FRT mediante clonación recombinante de levadura, lo que dio como resultado un vector pDLHD0140 (figura 4).

[0227] El vector de expresión pDLHD0140 se construyó para contener el origen de replicación pUC de *E. coli*, el marcador seleccionable de beta-lactamasa (*AmpR*) de *E. Coli*, el marcador seleccionable de levadura URA3, el origen de replicación de 2 micras de levadura, el promotor NA2-tpi, el marco de lectura abierto de lacasa de *T. villosa*, el terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus nidulans*, el OFR de flipasa de *Saccharomyces cerevisiae* de 2 µm entre el promotor de TEF1 de *Aspergillus oryzae* y el terminador de *NiaD* de *Aspergillus oryzae* y dianas de reconocimiento de flipasa de 2 µm de *Saccharomyces cerevisiae* FRT-F y FRT-F3.

[0228] El plásmido pDLHD0140 se construyó combinando dos fragmentos de ADN mediante clonación recombinante de levadura: el fragmento 1 contenía el origen de replicación pUC de *E. coli*, el marcador seleccionable de beta-lactamasa (*AmpR*) de *E. Coli*, el marcador seleccionable de levadura URA3, el origen replicación de 2 micras de levadura, el promotor NA2-tpi, el terminador de glucoamilasa de *Aspergillus n*iger, el marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus nidulans*, el ORF de flipasa de 2 µm de *Saccharomyces cerevisiae* entre el promotor de TEF1 de *Aspergillus* oryzae y el terminador de *NiaD* de *Aspergillus o*ryzae y dianas de reconocimiento de flipasa de 2 µm de *Saccharomyces cerevisiae* FRT-F y FRT-F3. El fragmento 2 contenía el marco de lectura abierto de la lacasa de *T. villosa* y secuencias flanqueantes con homología con el fragmento 1.

[0229] El fragmento 1 se amplificó usando el cebador 614604 (sentido) y el cebador 1204564 (antisentido). Estos cebadores se diseñaron para contener regiones flanqueantes de homología de secuencia con el fragmento 2 para la clonación sin ligación entre los fragmentos de PCR. El fragmento 1 se amplificó mediante PCR en una reacción compuesta por 10 ng de pDAu571 (figura 5; SEQ ID N.º: 87), 0,5 µl de ADN polimerasa PHUSION®, 20 pmol del cebador 614604, 20 pmol del cebador 1204564, 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl del tampón 5X PHUSION® HF y 35,5 µl de agua. La reacción se incubó en un termociclador EPPENDORF® MASTERCYCLER® programado para 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos; y 30 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 120 segundos. El producto de PCR de 9,7 kb resultante (Fragmento 1) se trató con 1 µl de *Dpn* I para eliminar el ADN de molde de plásmido. La *Dpn* I se añadió directamente al tubo de PCR, se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 60 minutos.

[0230] El fragmento 2 se amplificó usando el cebador 1204672 (sentido) y el cebador 1204673 (antisentido). Estos cebadores se diseñaron para contener regiones flanqueantes de homología de secuencia con el fragmento 1 para la clonación sin ligación entre los fragmentos de PCR. El fragmento 2 se amplificó mediante PCR en una reacción compuesta por 10 ng de pADI006 (figura 6), 0,5 µl de ADN polimerasa PHUSION®, 20 pmol del cebador 1204672, 20 pmol del cebador 1204673, 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl del tampón 5X PHUSION® HF y 35,5 µl de agua. La reacción se incubó en un termociclador EPPENDORF® MASTERCYCLER® programado para 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos; y 30 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 120 segundos. El producto de PCR de 1,6 kb (fragmento 2) se trató con 1 µl de *Dpn* I para eliminar el ADN de molde de plásmido. La *Dpn* I se añadió directamente al tubo de PCR, se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 60 minutos.

[0231] Se usó el siguiente procedimiento para combinar los dos fragmentos de PCR usando clonación recombinante basada en homología de levadura. Se combinó una alícuota de 10 µl de cada uno de los fragmentos de PCR con 100 µg de ácido desoxirribonucleico monocatenario de testículos de salmón (Sigma-Aldrich), 100 µl de células de levadura competentes de la cepa YNG318 de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 208973) y 600 µl de tampón PLATE (Sigma-Aldrich) y se mezclaron. La reacción se incubó a 30 °C durante 30 minutos con agitación a 200 r.p.m. Luego se continuó la reacción a 42 °C durante 15 minutos sin agitación. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 5.000 × g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se suspendió en 200 µl de agua tratada en autoclave y se dividió en dos placas de agar que contenían medio sintético definido que carecía de uridina y se incubó a 30 °C durante tres días. Las colonias de levadura se aislaron de la placa utilizando 1 ml de agua tratada en autoclave. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 13.000 × g durante 30 segundos y se añadió al tubo una alícuota de 100 µl de perlas de vidrio. La mezcla de células y perlas se suspendió en 250 µl del tampón P1 (QIAGEN Inc.) y luego se agitó durante 1 minuto para lisar las células. El ADN plasmídico se purificó usando un Kit QIAPREP® Spin Miniprep. Luego se transformó una alícuota de 3 µl del ADN plasmídico en células electrocompetentes ONE SHOT® TOP10 de *E. Coli* según las instrucciones del fabricante. Se esparcieron cincuenta µl de células transformadas en placas de 2XYT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml y se incubaron a 37 °C durante toda la

noche. Cada uno de los transformantes se recogió en 3 ml del medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml y se cultivaron durante toda la noche a 37 °C con agitación a 250 r.p.m. El ADN plasmídico se purificó usando un kit QIAPREP® Spin Miniprep. La secuenciación de ADN con un analizador genético 3130XL confirmó la presencia de los tres fragmentos en un plásmido final denominado plásmido pDLHD0140 (figura 4).

Ejemplo 9: Confirmación de la expresión de la lacasa de *Trametes villosa* de tipo salvaje de copia única en la cepa de cribado JaL1394 de *Aspergillus oryzae*

[0232] La cepa JaL1394 de *Aspergillus oryzae* (WO 2012/160093) que utiliza el sistema diana de reconocimiento de flipasa (FRT) de plásmido de *Saccharomyces cerevisiae* de 2 µm y de recombinasa (Flp) para generar un sistema de transformación dirigida de copia única de alta eficiencia se utilizó para cribar bibliotecas de variantes genéticas. El sistema de Flp-FRT de *Saccharomyces cerevisiae* es un sistema de recombinación de sitio específico que se puede usar para insertar un ADN de interés en una ubicación conocida en el genoma de un organismo huésped de interés. La cepa JaL1394 de *Aspergillus oryzae* había sido diseñada previamente para poseer secuencias diana de reconocimiento de flipasa FRT-F y FRT-F3 en el locus *amyB*, donde se había eliminado el ORF de AmyB.

[0233] JaL1394 de *Aspergillus oryzae* se transformó con el plásmido pDLHD0140 que comprende el gen de la lacasa de *T. villosa* de tipo salvaje. Se inocularon aproximadamente 10^7 esporas de JaL1394 de *A. Oryzae* en 100 ml del medio YP + glucosa al 2 % suplementado con uridina 10 mM en un matraz de agitación de 500 ml y se incubaron a 28 °C y 110 r.p.m. durante toda la noche. Se filtraron 10 ml del cultivo durante toda la noche en un filtro de vacío estéril de 125 ml y los micelios se lavaron dos veces con 50 ml de KCl 0,7 M-$CaCl_2$ 20 mM. El líquido restante se eliminó mediante filtración al vacío, lo que dejó la estera sobre el filtro. Los micelios se resuspendieron en 10 ml de KCl 0,7 M-$CaCl_2$ 20 mM y se transfirieron a un matraz de agitación estéril de 125 ml que contenía 20 mg de GLUCANEX® 200 G (Novozymes Switzerland AG) por ml y 0,2 mg de quitinasa (Sigma-Aldrich) por ml en 10 ml de KCl 0,7 M-$CaCl_2$ 20 mM. La mezcla se incubó a 37 °C y 100 r.p.m. durante 30-90 minutos hasta que se generaron protoplastos a partir de los micelios. La mezcla de protoplastos se filtró a través de un embudo estéril revestido con MIRACLOTH® (Calbiochem) en un tubo de centrífuga de plástico estéril de 50 ml para eliminar los restos de micelio. Los restos del MIRACLOTH se lavaron minuciosamente con 10 ml de KCl 0,7 M-$CaCl_2$ 20 mM y se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 10 minutos a 20-23 °C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento de protoplasto se resuspendió en 20 ml de sorbitol 1 M-$CaCl_2$ 10 mM-Tris-HCl 10 mM (pH 6,5). Este paso se repitió dos veces y el sedimento de protoplasto final se resuspendió en sorbitol 1 M-$CaCl_2$ 10 mM-Tris-HCl 10 mM (pH 6,5) para obtener una concentración final de protoplasto de 2×10^7/ml.

[0234] Los protoplastos se transformaron mediante la adición de dos µg de pDLHD0140 al fondo de un tubo de centrífuga de plástico estéril de 50 ml. Se añadieron cien µl de protoplastos al tubo seguidos de 300 µl de PEG-4000 al 60 % en $CaCl_2$ 10 mM-Tris-HCl 10 mM (pH 6,5). El tubo se mezcló suavemente a mano y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron a la transformación treinta ml de agarosa superior de COVE-N-JP que contenía ABTS 1 mM y la mezcla se transfirió a dos placas de agar con medio mínimo de 150 mm. Las placas de transformación se incubaron a 34 °C hasta que aparecieron los transformantes y se observó el color verde de ABTS alrededor de cada colonia. La conversión de ABTS a un color verde visible demostró que los transformantes producían lacasa activa de *T. villosa*.

[0235] Se recogieron transformantes individuales en nuevas placas de agar de COVE-N-gly y se cultivaron a 34 °C durante cuatro días hasta que los transformantes esporularon. Las esporas frescas se transfirieron a placas de pocillos profundos de 48 pocillos que contenían 2 ml de medio M410 que contenía $CuSO_4$ 0,25 mM, se cubrieron con un sello respirable y se cultivaron durante 4 días a 34 °C sin agitación. Después de 4 días de crecimiento, se analizó el medio de cultivo para cada transformante para determinar la actividad lacasa según los ejemplos 2, 3 y 4, y para determinar la expresión de lacasa mediante SDS-PAGE.

[0236] SDS-PAGE se realizó usando un gel SDS-PAGE CRITERION® Stain Free al 8-16 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) y se obtuvieron imágenes del gel con un generador de imágenes Stain Free Imager (Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando los siguientes ajustes: activación de 5 minutos, exposición automática de imágenes (bandas intensas), resaltado de píxeles saturados = ON (ENCENDIDO), color = Coomassie y detección de bandas, análisis de peso molecular e informes desactivados. SDS-PAGE reveló una banda de proteínas que migraba a aproximadamente 70 kDa para la lacasa de *T. villosa* de tipo salvaje.

Ejemplo 10: Construcción e identificación de variantes de expresión aumentada y actividad específica aumentada de la lacasa de *Trametes villosa*

[0237] Se construyeron bibliotecas mutantes del gen de la lacasa de *Trametes villosa* mediante mutagénesis de saturación de sitio del gen que codifica la lacasa de tipo salvaje como progenitora. Las bibliotecas mutantes del gen de la lacasa de *T. villosa* (cada fragmento de la biblioteca comprende un gen de la lacasa mutante de *T. villosa* más un marcador de selección orotidina 5'-fosfato descarboxilasa *pyrG* de *Aspergillus nidulans* y las secuencias diana de reconocimiento de la flipasa FRT-F y FRT-F3) se transformó en protoplastos de JaL1394 de *Aspergillus oryzae*, como se describe en el ejemplo 9 junto con un µg de vector pDLHD0095 que codifica el ORF

de flipasa de 2 µm de *Saccharomyces cerevisiae* entre el promotor de TEF1 de *Aspergillus oryzae* y el terminador del gen *niaD* de *Aspergillus oryzae*. Después de 4 días de recuperación de protoplastos a 34 °C en placas de agar con medio mínimo cubiertas con agarosa superior de COVE-N-JP que contenía ABTS 1 mM, se recogieron colonias individuales con halos verdes en pocillos individuales de placas de pocillos profundos de 48 pocillos que contenían 2 ml del medio M410 que contenía $CuSO_4$ 0,25 mM, se cubrieron con un sello respirable y se cultivaron durante 4 días a 34 °C sin agitación. Después de 4 días de crecimiento, se analizó la actividad lacasa en el medio de cultivo líquido, como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4, y las variantes de mayor actividad se calificaron como aciertos de expresión.

[0238] Las cepas mutantes individuales se purificaron con esporas y se cultivaron nuevamente en matraces de agitación de 125 ml en 25 ml del medio M410 que contenía $CuSO_4$ 0,25 mM durante 4 días a 34 °C con agitación a 250 r.p.m. para generar caldo fresco para volver a analizar la actividad lacasa, como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4, en relación con la cepa JaL1394 de *A. oryzae* que expresa el gen de la lacasa progenitora de *T. villosa*. Los caldos también fueron analizados mediante SDS-PAGE, como se describe en el ejemplo 9, para determinar el rendimiento de expresión aumentado del producto proteico de la lacasa de *T. villosa*.

[0239] Las mejoras relativas en el rendimiento de expresión con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 4 de cultivos en placas de pocillos profundos de 48 pocillos y en matraces de agitación para todas las variantes de sitio único en las posiciones L79, F102, V170, V175, S200, A262, V289, T292, Y302, N357, I360, Y393, S397, A485 y D507 se muestran en la siguiente tabla III y las variantes combinatorias A262G + I360V, A262G + V289I + T292D + N357D; S37C + A262G + Y939I + A485S; V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I; F102A + V175S + A262G + I360V + S397A; F102A + V175T + S200D + A262G + N357D + S397A; y A9R + L79D + L179N se muestran en la siguiente tabla IV. El análisis de SDS-PAGE de los mismos caldos demostró una banda de lacasa de *T. villosa* de mayor intensidad que la lacasa progenitora de *T. villosa* para todas las variantes, lo que se correlacionó bien con las mejoras relativas observadas en los ensayos de actividad. La banda de SDS-PAGE para la lacasa progenitora de *T. villosa* y sus variantes fue de 70 kDa, sin cambios obvios debido a la glicosilación diferencial.

Tabla III.

Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
L79A	1,3
L79C	<1
L79D	1,3
L79E	2,1
L79F	1,3
L79G	1,6
L79H	<1
L79I	1,4
L79K	<1
L79M	1,2
L79N	1,2
L79P	<1
L79Q	1,2
L79R	<1
L79S	1,6
L79T	<1
L79V	<1
L79W	1,2
L79Y	1,2
F102A	<1
F102C	<1
F102D	<1
F102E	<1
F102G	<1

F102H	<1
F102I	<1
F102K	<1
F102L	<1
F102M	<1
F102N	<1
F102P	<1
F102Q	<1
F102R	<1
F102S	<1
F102T	<1
F102V	<1
F102W	<1
F102Y	<1
V170A	1,5
V170C	<1
V170D	<1
V170E	<1
V170F	<1
V170G	<1
V170H	<1
V170I	<1
V170K	<1
V170L	<1
V170M	1,4
V170N	<1
V170P	<1
V170Q	1,6
V170R	<1
V170S	1,7
V170T	1,8
V170W	<1
V170Y	<1
V175A	<1
V175C	<1
V175D	<1
V175E	<1
V175F	<1
V175G	<1
V175H	<1
V175I	<1
V175K	<1
V175L	<1
V175M	<1
V175N	<1
V175P	<1

V175Q	<1
V175R	<1
V175S	<1
V175T	<1
V175W	<1
V175Y	<1
S200A	<1
S200C	<1
S200D	<1
S200E	<1
S200F	<1
S200G	<1
S200H	<1
S200I	<1
S200K	<1
S200L	<1
S200M	<1
S200N	<1
S200P	<1
S200Q	<1
S200R	<1
S200T	<1
S200V	<1
S200W	<1
S200Y	<1
A262C	<1
A262D	<1
A262E	<1
A262F	<1
A262G	3,8
A262H	<1
A262I	<1
A262K	<1
A262L	<1
A262M	<1
A262N	<1
A262P	<1
A262Q	<1
A262R	<1
A262S	<1
A262T	<1
A262V	<1
A262W	<1
A262Y	<1
V289A	<1
V289C	<1

V289D	<1
V289E	<1
V289F	<1
V289G	<1
V289H	<1
V289I	<1
V289K	1,9
V289L	<1
V289M	<1
V289N	<1
V289P	<1
V289Q	1,3
V289R	1,8
V289S	<1
V289T	2,0
V289W	<1
V289Y	<1
T292A	<1
T292C	<1
T292D	9,0
T292E	<1
T292F	7,1
T292G	8,3
T292H	7,3
T292I	<1
T292K	9,0
T292L	<1
T292M	<1
T292N	<1
T292P	<1
T292Q	<1
T292R	<1
T292S	<1
T292V	<1
T292W	<1
T292Y	<1
Y302A	<1
Y302C	<1
Y302D	<1
Y302E	<1
Y302F	<1
Y302G	<1
Y302H	<1
Y302I	<1
Y302K	<1
Y302L	<1

Y302M	<1
Y302N	<1
Y302P	<1
Y302Q	<1
Y302R	<1
Y302S	<1
Y302T	<1
Y302V	<1
Y302W	<1
N357A	1,2
N357C	<1
N357D	2,6
N357E	1,9
N357F	1,2
N357G	2,1
N357H	<1
N357I	<1
N357K	<1
N357L	<1
N357M	1,6
N357P	<1
N357Q	1,6
N357R	<1
N357S	1,5
N357T	1,4
N357V	1,4
N357W	<1
N357Y	1,4
I360A	3,6
I360C	<1
I360D	<1
I360E	<1
I360F	<1
I360G	<1
I360H	2,7
I360K	<1
I360L	<1
I360M	8,3
I360N	<1
I360P	<1
I360Q	<1
I360R	<1
I360S	<1
I360T	<1
I360V	7,8
I360W	<1

I360Y	<1
Y393A	<1
Y393C	<1
Y393D	<1
Y393E	<1
Y393F	<1
Y393G	<1
Y393H	<1
Y393I	<1
Y393K	<1
Y393L	<1
Y393M	<1
Y393N	<1
Y393P	<1
Y393Q	<1
Y393R	<1
Y393S	<1
Y393T	<1
Y393V	<1
Y393W	<1
S397A	<1
S397C	<1
S397E	<1
S397E	<1
S397F	<1
S397G	<1
S397H	<1
S397I	<1
S397K	<1
S397L	<1
S397M	<1
S397N	<1
S397P	<1
S397Q	<1
S397R	<1
S397T	<1
S397V	<1
S397W	<1
S397Y	<1
A485C	<1
A485D	<1
A485E	<1
A485F	<1
A485G	<1
A485H	<1
A485I	<1

A485K	<1
A485L	<1
A485M	<1
A485N	<1
A485P	<1
A485Q	<1
A485R	<1
A485S	<1
A485T	<1
A485V	<1
A485W	<1
A485Y	<1
D507A	<1
D507C	<1
D507E	<1
D507F	<1
D507G	<1
D507H	<1
D507I	<1
D507K	<1
D507L	<1
D507M	<1
D507N	<1
D507P	<1
D507Q	<1
D507R	<1
D507S	<1
D507T	<1
D507V	<1
D507W	<1
D507Y	<1

Tabla IV.

Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
A262G + I360V	4,8
A262G + V289I + T292D + N357D	4,1
S37C + A262G + Y393I + A485S	3,3
V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I	6,3
F102A + V175S + A262G + I360V + S397A	3,6
F102A + V175T + S200D + A262G + N357D + S397A	2,2
A9R + L79D + L179N	2,3

[0240] En la siguiente tabla V se muestran las mejoras relativas en la actividad específica con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 4 de cultivos en placas de pocillos profundos de 48 pocillos y en matraces de agitación para todas las variantes de sitio único en las posiciones K178, D276, A333, F418, S506 y S518 y las variantes combinatorias F418I + S506H y A21C + K178S + F418V + S518A se muestran en la siguiente tabla VI.

Tabla V.

Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
K178A	<1
K178C	<1
K178D	<1
K178E	<1
K178F	<1
K178G	<1
K178H	<1
K178I	<1
K178L	<1
K178M	<1
K178N	<1
K178P	<1
K178Q	<1
K178R	<1
K178S	<1
K178T	<1
K178V	<1
K178W	<1
K178Y	<1
D276A	<1
D276C	<1
D276E	<1
D276F	<1
D276G	<1
D276H	<1
D276I	<1
D276K	<1
D276L	<1
D276M	<1
D276N	<1
D276P	<1
D276Q	<1
D276R	<1
D276S	<1
D276T	<1
D276V	<1
D276W	<1
D276Y	<1
A333C	<1
A333D	<1
A333E	1,3
A333F	<1
A333G	<1

A333H	<1
A333I	<1
A333K	1,1
A333L	<1
A333M	<1
A333N	<1
A333P	<1
A333Q	<1
A333R	1,1
A333S	<1
A333T	<1
A333V	<1
A333W	<1
A333Y	<1
F418A	<1
F418C	<1
F418D	<1
F418E	<1
F418G	<1
F418H	<1
F418I	3,1
F418K	<1
F418L	2,4
F418M	2,7
F418N	<1
F418P	<1
F418Q	<1
F418R	<1
F418S	<1
F418T	<1
F418V	2,6
F418W	<1
F418Y	<1
S506A	<1
S506C	<1
S506D	<1
S506E	<1
S506F	<1
S506G	<1
S506H	<1
S506I	<1
S506K	<1
S506L	<1
S506M	<1
S506N	<1
S506P	<1

S506Q	<1
S506R	<1
S506T	<1
S506V	<1
S506W	<1
S506Y	<1
S518A	<1
S518C	<1
S518D	<1
S518E	<1
S518F	<1
S518G	<1
S518H	<1
S518I	<1
S518K	<1
S518L	<1
S518M	<1
S518N	<1
S518P	<1
S518Q	<1
S518R	<1
S518T	<1
S518V	<1
S518W	<1
S518Y	<1

Tabla VI.

Mejora relativa de la actividad específica con respecto a la progenitora	
Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
F418I + S506H	3,7
A21C + K178S + F418V + S518A	4,2

Ejemplo 11: Confirmación a escala de fermentación de la expresión mejorada de genes de la variante de la lacasa de *Trametes villosa* en *Aspergillus oryzae*

[0241] Se usó un proceso de fermentación para expresar las variantes de la lacasa de *Trametes villosa* A262G + I360V; A262G + V289I + T292D + N357D; S37C + A262G + Y939I + A485S; V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I; F102A + V175S + A262G + I360V + S397A; F102A + V175T + S200D + A262G + N357D + S397A; A9R + L79D + L179N; y A262G en relación con la lacasa progenitora de *T. villosa*.

[0242] El medio del matraz de agitación estaba compuesto por 50 g de sacarosa, 10 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $CaCl_2$, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de K_2SO_4, 2 g de urea, 10 g de extracto de levadura, 2 g de ácido cítrico, 0,5 ml de solución de trazas de metales y agua desionizada hasta 1 litro. La solución de metales traza estaba compuesta por 13,8 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 14,3 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 8,5 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3 g de ácido cítrico y agua desionizada hasta 1 litro.

[0243] Se añadieron cien ml de medio de matraz de agitación a un matraz de agitación de 500 ml. El matraz de agitación se inoculó con 7 ml de TWEEN® 80 al 0,01 % con esporas raspadas de un cultivo en placa sólida y se incubó a 34 °C en un agitador orbital a 200 r.p.m. durante 24 horas. Se usaron cincuenta ml del caldo de matraz de agitación para inocular un recipiente de fermentación de 3 litros.

[0244] El medio del lote de fermentación estaba compuesto por litro de 10 g de extracto de levadura, 24 g de sacarosa, 5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de ácido cítrico, 2 g de K_2SO_4, 0,25 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 ml de antiespumante y 0,5 ml de solución de metales traza. La solución de metales traza estaba compuesta por litro de 13,8 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 14,3 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 8,5 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 3 g de ácido cítrico. El medio de alimentación de fermentación estaba compuesto por maltosa.

[0245] Se añadió un total de 1,8 litros del medio del lote de fermentación a un fermentador con camisa de vidrio de tres litros. El medio de alimentación de fermentación se dosificó a una velocidad de 0 a 8,0 g/l/hr. El recipiente de fermentación se mantuvo a una temperatura de 34 °C y el pH se controló a un punto de ajuste de 6,1 +/- 0,1. Se añadió aire al recipiente a una velocidad de 1 vvm y el caldo se agitó mediante un impulsor Rushton que giraba a 1100 r.p.m. Se tomaron muestras los días 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del proceso de fermentación y se centrifugaron a 3000 x g para eliminar la biomasa. Los sobrenadantes se filtraron de forma estéril y se almacenaron a -20 °C.

[0246] Los niveles de expresión de la variante de la lacasa de *T. villosa* se determinó en relación con el gen progenitor (secuencia de ADNc) mediante el ensayo líquido de ABTS (ejemplo 2) y mediante el análisis de SDS-PAGE (ejemplo 9).

[0247] Las mejoras relativas en el rendimiento de expresión para los caldos del día 7 de varias variantes con respecto a la lacasa progenitora de *T. villosa* se muestran en la siguiente tabla VII. La variante A262G + I360V se produjo en una cantidad que era 4,8 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*, la variante A262G + V289I + T292D + N357D se produjo en una cantidad que era 4,1 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*, la variante A9R + L79D + L179N se produjo en una cantidad que era 3,3 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villos*a, la variante V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I se produjo en una cantidad que era 6,2 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*, la variante F102A + V175S + A262G + I360V + S397A se produjo en una cantidad que era 3,6 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*, la variante F102A + V175T + S200D + A262G + N357D + S397A se produjo en una cantidad que era 2,1 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*, la variante S37C + A262G + Y939I + A485S se produjo en una cantidad que era 2,2 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa* y la variante A262G se produjo en una cantidad que era 4,8 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*. El análisis de SDS-PAGE de los mismos caldos mostró una banda de lacasa de *T. villosa* de mayor intensidad que la lacasa progenitora de *T. villos*a para estas variantes, lo que se correlacionaba bien con las mejoras relativas observadas en el ensayo de actividad. El análisis de SDS-PAGE de las muestras tomadas los días 3, 4, 5, 6 y 7 mostró una mayor producción que la lacasa progenitora de *T. villos*a y cada variante día a día, donde el día 7 es el más fuerte.

Tabla VII.

Mejora relativa en la expresión con respecto a la progenitora	
Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
A262G + I360V	4,8
A262G + V289I + T292D + N357D	4,1
S37C + A262G + Y393I + A485S	3,3
V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I	6,2
F102A + V175S + A262G + I360V + S397A	3,6
F102A + V175T + S200D + A262G + N357D + S397A	2,1
A9R + L79D + L179N	2,2
A262G	4,8

[0248] Las mejoras relativas en la actividad específica para caldos del día 7 de dos variantes en comparación con la lacasa progenitora de *T. villosa* se muestran en la siguiente tabla VIII. La actividad específica se midió normalizando los valores de actividad de ABTS (medidos como en el ejemplo 2) a cantidades unitarias de proteína mediante la evaluación de la producción relativa de lacasa por unidad de volumen mediante valores de densitometría de banda de geles SDS-PAGE cargados con volúmenes iguales de caldo de muestra. La actividad específica de la variante F418I + S506H fue 5,2 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*. La actividad específica de la variante A21C + K178S + F418V + S518A era 4,9 veces mayor que la lacasa progenitora de *T. villosa*.

Tabla VIII.

Mejora relativa en actividad específica respecto a la progenitora

Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	Ensayo de ABTS
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
F418I + S506H	5,2
A21C + K178S + F418V + S518A	4,9

Ejemplo 12: Construcción e identificación de variantes de actividad específica aumentada de la variante de la lacasa de *Trametes villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I

[0249] Se construyeron bibliotecas mutantes del gen de la lacasa de *Trametes villosa* mediante mutagénesis dirigida a múltiples sitios en la columna vertebral de la variante de expresión mejorada V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I. Se prepararon bibliotecas usando oligos mutagénicos para posiciones que incluyen K178, D276, A333, F418, S506, y S518. Las bibliotecas se transformaron *E. Coli* con el posterior aislamiento de ADN plasmídico. Se usó PCR para levantar el ORF de lacasa usando los oligos 1206637 y 1206638. Se utilizó clonación recombinante de levadura para ensamblar plásmidos que contenían un gen de la lacasa mutante de *T. villosa* más un marcador de selección orotidina 5'-fosfato descarboxilasa *pyrG* de *Aspergillus nidulans* y la secuencia diana de reconocimiento de la flipasa FRT-F y FRT-F3. Las bibliotecas se transformaron en protoplastos de JaL1394 de *Aspergillus oryzae*, como se describe en el ejemplo 9. Después de 4 días de recuperación de protoplastos a 34 °C en placas de agar con medio mínimo cubiertas con agarosa superior de COVE-N-JP que contenía ABTS 1 mM, se recogieron colonias individuales con halos verdes en placas de COVE-N-gly individuales y se incubaron durante 3 días a 34 °C. Se inocularon esporas de variantes en placas de pocillos profundos de 48 pocillos que contenían 2 ml del medio M410 que contenía $CuSO_4$ 0,25 mM, se cubrieron con un sello respirable y se cultivaron durante 4 días a 34 °C sin agitación. Después de 4 días crecimiento, se analizó la actividad lacasa en el medio de cultivo líquido, como se describe en los ejemplos 2 y 3, y las variantes de mayor actividad se calificaron como aciertos.

[0250] Las cepas mutantes individuales se cultivaron nuevamente en matraces de agitación de 125 ml en 25 ml del medio M410 que contenía $CuSO_4$ 0,25 mM durante 4 días a 34 °C con agitación a 220 r.p.m. para generar caldo fresco para volver a realizar pruebas en relación con la cepa JaL1394 de *A. oryzae* que expresa el gen de columna vertebral de la variante de la lacasa de *T. villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I.

[0251] Las mejoras relativas en la actividad específica con respecto a la progenitora en caldos del día 4 de cultivos en matraces de agitación para 2 variantes caracterizadas se muestran en la siguiente tabla IX.

Tabla IX.

Mejora relativa de la actividad específica con respecto a la progenitora		
Variante de la lacasa de *Trametes Villosa*	**Ensayo de ABTS**	**Ensayo de siringaldazina**
V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I (progenitora)	1,0	1,0
V175T + S200D + A262G + D276G + I360V + Y393I + F418I + S506H	4,1	2,6
V175T + S200D + A262G + V275I + D276G + A333S + I360V + Y393I + F418I + S506H	3,7	3,1

Ejemplo 13: Confirmación a escala de fermentación de la actividad específica mejorada de los genes de la variante de la lacasa de *Trametes villosa* en *Aspergillus oryzae*

[0252] Se utilizó un proceso de fermentación para expresar las variantes de la lacasa de *Trametes villosa* V175T + S200D + A262G + D276G + I360V + Y393I + F418I + S506H y V175T + S200D + A262G + V275I + D276G + A333S + I360V + Y393I + F418I + 06H para comparar con la variante de la lacasa de *T. villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I, como se describe en el ejemplo 11.

[0253] Los niveles de expresión de la variante de la lacasa de *T. villosa* se determinaron en relación con la variante de la lacasa de *T. villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I mediante el ensayo líquido de ABTS (ejemplo 2) y mediante el ensayo líquido de siringaldazina (ejemplo 3).

[0254] Las mejoras relativas en la actividad específica para los caldos del día 7 de las dos variantes con respecto a la variante de lacasa de expresión mejorada V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I se muestran en la siguiente tabla X. La variante V175T + S200D + A262G + D276G + I360V + Y393I + F418I + S506H tenía una actividad específica que era 2,7 veces mayor que la variante de la lacasa de *T. villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I y la variante V175T + S200D + A262G + V275I + D276G + A333S + I360V + Y393I + F418I + S506H se produjo en una cantidad que era 2,1 veces mayor que la variante de la lacasa de *T. villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I.

[0255] La actividad volumétrica de la variante de lacasa V175T + S200D + A262G + D276G + I360V + Y393I + F418I + S506H aumentó 30 veces con respecto a la lacasa de tipo salvaje.

Tabla X.

Mejora relativa con respecto a la progenitora	
Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS**
V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I (progenitora)	1,0
V175T + S200D + A262G + D276G + I360V + Y393I + F418I + S506H	2,7
V175T + S200D + A262G + V275I + D276G + A333S + I360V + Y393I + F418I + S506H	2,1

Ejemplo 14: Generación y transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei*

[0256] La preparación y transformación de protoplastos se realizaron usando un protocolo modificado basado en Penttila *et al.*, 1987, *Gene* 61: 155-164. Brevemente, se cultivó la cepa RutC30 de *Trichoderma reesei* (Montenecourt y Eveleigh, 1979, *Adv. Chem. Ser.* 181: 289-301) en 25 ml del medio YP suplementado con glucosa al 2 % (p/v) y uridina 10 mM a 27 °C durante 17 horas con agitación suave a 90 r.p.m. Los micelios se recogieron mediante filtración utilizando un sistema de filtración desechable accionado por vacío (Vacuum Driven Disposable Filtration System) (Millipore) y se lavaron dos veces con agua desionizada y dos veces con sorbitol 1,2 M. Los protoplastos se generaron suspendiendo los micelios lavados en 20 ml de sorbitol 1,2 M que contenía 15 mg de GLUCANEX® 200 G (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) por ml y 0,36 unidades de quitinasa (Sigma Chemical Co.) por ml durante 15-25 minutos a 34 °C con agitación suave a 90 r.p.m. Los protoplastos se recogieron mediante centrifugación durante 7 minutos a 400 x g y se lavaron dos veces con sorbitol 1,2 M frío. Los protoplastos se contaron usando un hemocitómetro y se resuspendieron hasta una concentración final de 1 x 10^8 protoplastos por ml en STC. El exceso de protoplastos se almacenó en un contenedor de congelación criogénica 1°C (Cryo 1°C Freezing Container) (Nalgene) a -80 °C.

[0257] Aproximadamente 100 µg de un plásmido de transformación descrito en los siguientes ejemplos se digirieron con *Pme* I. La reacción de digestión se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % usando tampón TAE, donde se escindió una banda de ADN del gel y se extrajo usando un kit de extracción en gel QIAQUICK®. El ADN purificado resultante se añadió a 100 µl de la solución de protoplasto y se mezcló suavemente. Se añadió tampón PEG (250 µl), se mezcló y se incubó a 34 °C durante 30 minutos. Luego se añadió STC (3 ml), se mezcló y se extendió sobre placas de COVE. Las placas se incubaron a 28 °C durante 4-7 días.

Ejemplo 15: Construcción de pAMFS200 y pAMFS201 para la expresión de la lacasa de *Trametes villosa* en *Trichoderma reesei*

[0258] El ADNc de la lacasa de *Trametes villosa* de tipo salvaje (SEQ ID N.º: 1 para la secuencia de ADNc y SEQ ID N.º: 2 para la secuencia de aminoácidos deducida) y la variante V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I se amplificaron mediante PCR a partir de los plásmidos pDLHD0140 (ejemplo 8) y pTmmD014 (figura 7), respectivamente, usando los mismos cebadores directos e inversos específicos del gen 1209071 y 1209072. Las PCRs estaban compuestas por 1 ng de ADN de pDLHD0140 o pTmmD014, 50 pmoles de cada uno de los cebadores 1209071 y 1209072, 1 µl de una mezcla 10 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, tampón de ADN polimerasa de alta fidelidad 1X PHUSION™ Hot Start y 1 unidad de ADN polimerasa de alta fidelidad PHUSION™ Hot Start en un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó en un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 epgradient S programado para 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos; 35 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; y 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % usando tampón TAE, donde se escindieron del gel fragmentos de aproximadamente 1,6 kb y se extrajeron utilizando un kit de extracción en gel QIAQUICK® según el protocolo del fabricante.

[0259] El plásmido pMJ09 (WO 2005/047499) se digirió con *Nco* I y Pac I, se aisló mediante por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % en el tampón TBE, se escindió del gel y se extrajo usando un kit de extracción en gel QIAQUICK® según las instrucciones del fabricante.

[0260] Los productos de PCR se insertaron de forma independiente en pMJ09 digerido con *Nco* I/*Pac* I purificado en gel utilizando un kit de clonación de PCR IN-FUSION™ Advantage según el protocolo del fabricante. Cada reacción de IN-FUSION™ estaba compuesta por tampón de reacción 1X IN-FUSION™, 200 ng de pMJ09 digerido con *Nco* I/*Pac* I purificado en gel, 100 ng del producto de PCR de 1,6 kb y 1 µl de enzima IN-FUSION™ en un volumen de reacción de 10 µl. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a 50 °C. Después del período de incubación se añadieron 40 µl de TE a cada reacción. Se usó independientemente una alícuota de 2 µl de cada reacción para transformar células competentes ONE SHOT® TOP10 según el protocolo del fabricante. Las reacciones de transformación de *E. Coli* se extendieron sobre placas de 2XYT más de ampicilina. Los

transformantes se cribaron mediante secuenciación y se identificó un clon que contenía el inserto de lacasa de tipo salvaje sin errores de PCR y se denominó pAMFS200 (figura 8) y se identificó un clon que contenía la variante de lacasa V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I sin errores de PCR y se denominó pAMFS201 (figura 9). Ambos plásmidos pAMFS200 y pAMFS201 se pueden digerir con *Pme* I para la transformación de *T. Reesei*. Los plásmidos contienen un casete de expresión compuesto por el promotor del gen de la celobiohidrolasa I Cel7A de *T. reesei*, la secuencia codificante del polipéptido de la lacasa de *Trametes villosa*, el terminador del gen de la celobiohidrolasa I Cel7A de *T. reesei* y el gen de acetamidasa (amdS) de *Aspergillus nidulans*.

Ejemplo 16: Transformación de pAMFS200 y pAMFS201 en RutC30 de *Trichoderma reesei*

[0261] La preparación de protoplastos y la transformación de la cepa RutC30 de Trichoderma reesei se realizó como se describe en el ejemplo 14.

[0262] Se digirieron aproximadamente 100 µg de pAMFS200 o pAMFS201 con *Pme* I. La transformación se realizó añadiendo 5-10 µg de pAMFS200 o pAMFS201 digerido con *Pme* I a 100 µl de la solución de protoplasto de RutC30 de *Trichoderma reesei* y se mezcló suavemente. Se añadió tampón PEG (250 µl), se mezcló y se incubó a 34 °C durante 30 minutos. Luego se añadió STC (3 ml), se mezcló y se extendió sobre dos placas de COVE. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7-10 días. Se aislaron un total de 46 transformantes con pAMFS200 y 15 transformantes con pAMFS201 en placas de COVE2 + uridina 10 mM y se cultivaron a 28 °C durante 5 días. Las esporas frescas de estas placas se transfirieron a placas de pocillos profundos de 48 pocillos que contenían 2 ml de CIM que contenía $CuSO_4$ 0,25 mM, se cubrieron con un sello respirable y se cultivaron durante 3 días a 30 °C con agitación a 250 r.p.m. Después de 3 días de crecimiento, se analizó la actividad lacasa en el medio de cultivo para cada transformante según el ejemplo 2. Varios transformantes mostraron una actividad lacasa varias veces mayor que la de RutC30 de *Trichoderma reesei*. La mejora relativa en el rendimiento de expresión basada en mediciones de actividad para la variante V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 3 de una placa de pocillos profundos de 48 pocillos fue 5 veces mayor. Las tres principales cepas productoras de lacasa se purificaron con esporas una vez en placas de agar COVE2 + uridina 10 mM y se cultivaron en líquido utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Los caldos se analizaron nuevamente para determinar la actividad lacasa según el ejemplo 2 y luego se analizó la expresión de lacasa en las cepas superiores en tanques de fermentación de 2 litros.

Ejemplo 17: Confirmación a escala de fermentación de la expresión mejorada del gen de la variante de la lacasa de *Trametes villosa* en *Trichoderma reesei*

[0263] Se usó un proceso de fermentación para expresar la variante de la lacasa de *T. villosa* V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I en relación con la lacasa progenitora de *Trametes villosa.*

[0264] El medio del matraz de agitación estaba compuesto por 20 g de glucosa, 10 g de sólidos macerados de maíz, 2,08 g de KH_2PO_4, 0,36 g de $CaCl_2$, 0,42 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,45 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 ml de solución de trazas de metales de *T. reesei* y agua desionizada hasta 1 litro.

[0265] Se añadieron cien ml del medio de matraz de agitación a un matraz de agitación de 500 ml. El matraz de agitación se inoculó con dos tapones de un cultivo de placa sólida y se incubó a 28 °C en un agitador orbital a 200 r.p.m. durante 24 horas. Se usaron cincuenta ml del caldo del matraz de agitación para inocular un recipiente de fermentación de 3 litros.

[0266] El medio del lote de fermentación estaba compuesto por litro de 10 g de sólidos macerados de maíz, 30 g de celulosa, 4 g de glucosa, 2,6 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 7,4 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,8 g de KH_2PO_4, 1,8 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de K_2SO_4, 0,25 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,8 ml de antiespumante y 0,75 ml de solución de metales traza de *T. reesei*. La solución de metales traza de *T. reesei* estaba compuesta por 216 g de $FeSO_4 \cdot 6H_2O$, 58 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,4 g de H_3BO_3, 336 g de ácido cítrico y agua desionizada hasta 1 litro. El medio de alimentación de fermentación estaba compuesto por glucosa y ácido fosfórico en agua.

[0267] Se añadió un total de 1,8 litros del medio del lote de fermentación a un fermentador con camisa de vidrio de tres litros. El medio de alimentación de fermentación se dosificó a una velocidad de 0 a 6,4 g/l/hr. El recipiente de fermentación se mantuvo a una temperatura de 28 °C y el pH se controló a un punto de ajuste de 2,5 +/- 0,1. Se añadió aire al recipiente a una velocidad de 1 vvm y el caldo se agitó mediante un impulsor Rushton que giraba de 1100 a 1300 r.p.m. Se tomaron muestras los días 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del proceso de fermentación y se centrifugaron a 3000 x g para eliminar la biomasa. Los sobrenadantes se filtraron de forma estéril y se almacenaron a -20 °C.

[0268] Los niveles de expresión de la variante de la lacasa de *Trametes villosa* se determinaron en relación con la lacasa progenitora mediante el ensayo líquido de ABTS (ejemplo 2).

[0269] La mejora relativa en el rendimiento de expresión basada en mediciones de actividad para la variante V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I con respecto a la lacasa progenitora en los caldos de fermentación del día 7 fue 4 veces mayor que como se muestra en la tabla XI.

Tabla XI.

Mejora relativa con respecto a la progenitora		
Variante de la lacasa de *Trametes villosa*	**Ensayo de ABTS (placas de 48 pocillos)**	**Ensayo de ABTS (tanques de 2 litros)**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0	1,0
V175T + S200D + A262G + I360V + Y393I	5,5	4,4

Ejemplo 18: Purificación de variantes de la lacasa de *Poliporus pinsitus*

[0270] Las variantes de la lacasa de *Poliporus pinsitus* se purificaron a partir de caldos de fermentación utilizando los métodos previamente descritos en el documento WO 96/000290.

Ejemplo 19: Ensayo de blanqueo de tintes para la detección de actividad lacasa

[0271] Este ensayo se utiliza para evaluar la actividad lacasa en presencia o ausencia de un mediador. Se preparó el tampón Britton-Robinson (H_3BO_3 0,1 M, H_3PO_4 0,04 M y CH_3COOH 0,04 M) a pH variados (ajustados a 5,0, 7,0 y 9,0 con NaOH) para obtener un perfil de actividad. Se prepararon soluciones de tintes disolviendo tintes de índigo carmín y de Negros Reactivo en agua a 0,43 mM y 0,2 mM, respectivamente. Las soluciones mediadoras se prepararon disolviendo cada uno de los siguientes mediadores a 10 mM en agua: siringaldehído, metilsiringato, hidroxibenzotriazol, ácido 10-fenotiazina-propiónico y 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi. Se diluyó un estándar de lacasa usando pasos de 2 veces comenzando con una concentración de 0,06 LAMU/ml y terminando con una concentración de 0,0075 LAMU/ml en el tampón de muestra. Las reacciones se ensamblaron añadiendo a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos 20 µl de caldo o solución estándar de enzima, 100 µl de tampón Britton-Robinson y 20 µl de solución mediadora. Las reacciones se iniciaron añadiendo 100 µl de la solución de tinte a cada pocillo. A continuación, la placa se transfirió rápidamente a un espectrofotómetro SPECTRAMAX® M5 (Molecular Devices), se premezcló durante 5 segundos y se registró la disminución de la absorbancia a la longitud de onda apropiada para el tinte (610 nm para índigo carmín; 600 nm para Negro Reactivo 5) durante 15 minutos con intervalos de 9 segundos a 25 °C.

[0272] En este ensayo se pueden utilizar ambas soluciones de enzimas purificadas y caldos de fermentación crudos. La decoloración de ambos tintes se puede ver a simple vista. El ensayo se puede realizar en ausencia de mediador. Potencialmente se pueden utilizar otros mediadores y colorantes, siguiendo el mismo protocolo.

Ejemplo 20: Clonación de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* de tipo salvaje para la expresión en una cepa de cribado de *Aspergillus oryzae*

[0273] El ADNc de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* de tipo salvaje (SEQ ID N.º: 92 para la secuencia de ADNc y SEQ ID N.º: 93 para la secuencia de aminoácidos deducida) se clonó en un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*/*A. oryzae*/Flp/FRT mediante clonación recombinacional de levadura, lo que dio como resultado el vector pDLHD0199 (figura 10).

[0274] El vector de expresión pDLHD0199 se construyó como se describe en el ejemplo 8 para el vector pDLHD0140. El fragmento 2 se amplificó usando el cebador 1217524 (sentido) y el cebador 1217525 (antisentido).

Ejemplo 21: Clonación de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* de tipo salvaje para la expresión en una cepa de cribado de *Aspergillus oryzae*

[0275] El ADNc de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* de tipo salvaje (SEQ ID N.º: 94 para la secuencia de ADNc y SEQ ID N.º: 95 para la secuencia de aminoácidos deducida) se clonó en un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*/*A. oryzae*/Flp/FRT mediante clonación recombinante de levadura, lo que dio como resultado el vector pDLHD0201 (figura 11).

[0276] El vector de expresión pDLHD0201 se construyó como se describe en el ejemplo 8 para el vector pDLHD0140. EL fragmento 2 se amplificó usando el cebador 1217528 (sentido) y el cebador 1217529 (antisentido).

Ejemplo 22: Confirmación de la expresión de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* de tipo salvaje en copia única en la cepa de cribado JaL1394 de *Aspergillus oryzae*

[0277] Como se describe en el ejemplo 9, JaL1394 de *Aspergillus oryzae* se transformó con el plásmido pDLHD0199 que comprende el gen de la lacasa de *P. cinnabarinus* de tipo salvaje. Las placas de transformación que contienen ABTS se incubaron a 34 °C hasta que aparecieron los transformantes y se observó el color verde de ABTS alrededor de cada colonia. La conversión de ABTS a un color verde visible demostró que los transformantes producían lacasa activa de *P. cinnabarinus*.

[0278] Posteriormente se cultivaron transformantes individuales y se analizó su actividad lacasa según los ejemplos 2, 3, 4 y 9.

Ejemplo 23: Confirmación de la expresión de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* de tipo salvaje en copia única en la cepa de cribado JaL1394 de *Aspergillus oryzae*

[0279] Como se describe en el ejemplo 9, JaL1394 de *Aspergillus oryzae* se transformó con el plásmido pDLHD0201 que comprende el gen de la lacasa de *M. thermophila* de tipo salvaje. Las placas de transformación que contienen ABTS se incubaron a 34 °C hasta que aparecieron los transformantes y se observó el color verde de ABTS alrededor de cada colonia. La conversión de ABTS a un color verde visible demostró que los transformantes producían lacasa activa de *M. thermophila*.

[0280] Posteriormente se cultivaron transformantes individuales y se analizó su actividad lacasa según los ejemplos 2, 3, 4 y 9.

Ejemplo 24: Construcción e identificación de variantes de expresión aumentada y actividad específica aumentada de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*

[0281] Las variantes del gen de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* se construyeron mediante mutagénesis de saturación de sitio. Las variantes del gen de la lacasa de *P. cinnabarinus* se transformaron en protoplastos de JaL1394 de *Aspergillus oryzae*, como se describe en el ejemplo 10. Los transformantes se cultivaron y analizaron para determinar la actividad y expresión de lacasa, como se describe en los ejemplos 2, 3, 4, 9 y 10, y las variantes de mayor actividad se calificaron como aciertos de expresión.

[0282] Las mejoras relativas en el rendimiento de expresión con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 4 de cultivos en placas de pocillos profundos de 48 pocillos y matraces de agitación para las variantes en las posiciones L79, A170, A262, V289, N292, N357 e I360 se muestran en la siguiente tabla XII. El análisis de SDS-PAGE de los mismos caldos demostró una banda de lacasa de *P. cinnabarinus* de mayor intensidad que la lacasa de *P. cinnabarinus* de tipo salvaje para todas las variantes, lo que se correlacionó bien con las mejoras relativas observadas en los ensayos de actividad.

Tabla XII.

Variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
L79E	<1
L79F	<1
L79G	2,6
L79S	<1
A170T	<1
A262G	1,4
T289K	1,7
A292K	<1
N357D	<1
N357G	1,3
N357M	1,1
N357S	<1
I360M	1,8

[0283] Las mejoras relativas en la actividad específica con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 4 de cultivos en placas de pocillos profundos de 48 pocillos y en matraces de agitación para las variantes en las posiciones P333 y F418 se muestran en la siguiente tabla XIII.

Tabla XIII.

Mejora relativa de la actividad específica con respecto a la progenitora	
Variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
P333E	<1
F418I	6,5
F418V	5,9

Ejemplo 25: Construcción e identificación de variantes de expresión aumentada y actividad específica aumentada de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*

[0284] Las variantes del gen de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* se construyeron mediante mutagénesis de saturación de sitio. Las variantes el gen de la lacasa de *M. thermophila* se transformaron en protoplastos de JaL1394 de *Aspergillus oryzae*, como se describe en el ejemplo 10. Los transformantes se cultivaron y analizaron para determinar la actividad y expresión de lacasa, como se describe en los ejemplos 2, 3, 4, 9 y 10, y las variantes de mayor actividad se calificaron como aciertos de expresión.

[0285] Las mejoras relativas en el rendimiento de expresión con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 4 de cultivos en placas de pocillos profundos de 48 pocillos y en matraces de agitación para variantes en las posiciones S220, G317, L344, R349, D437 y L440 se muestran en la siguiente tabla XIV. El análisis de SDS-PAGE de los mismos caldos demostró una banda de lacasa de *M. thermophila* de mayor intensidad que la lacasa de *M. thermophila* de tipo salvaje para todas las variantes, lo que se correlacionó bien con las mejoras relativas observadas en los ensayos de actividad.

Tabla XIV.

Variante de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
S220T	1,3
G317A	<1
L344K	1,9
L344T	1,1
R349K	1,1
D437G	<1
D437M	<1
D437S	1,0
L440M	1,6

[0286] Las mejoras relativas en la actividad específica con respecto a la lacasa progenitora en caldos del día 4 de cultivos en placas de pocillos profundos de 48 pocillos y en matraces de agitación para variantes en la posición M480 se muestran en la siguiente tabla XV.

Tabla XV.

Mejora relativa de la actividad específica con respecto a la progenitora	
Variante de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*	**Ensayo de ABTS**
Progenitora (de tipo salvaje)	1,0
M480I	<1
M480V	<1

REIVINDICACIONES

1. Variante de lacasa aislada, que comprende sustituciones en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad lacasa y donde la variante tiene al menos un 90 %, pero menos de un 100 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma; donde la variante comprende las sustituciones A9R+L79D+L179N, donde el rendimiento de expresión de la variante aumenta al menos 2 veces en comparación con la progenitora que tiene la secuencia SEQ ID N.º: 2.

2. Variante según la reivindicación 1, donde la variante tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

3. Variante según la reivindicación 1 o 2, que comprende, además, una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 89, 151, 286, 307, 313, 339 y 355 del polipéptido de longitud completa de SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad lacasa.

4. Variante según la reivindicación 3, donde la una o más sustituciones se selecciona(n) del grupo que consta de F89A,V,L,I; N151D,E,R,K; F286R,H,V; A307P,H,G; T313N,T,S; V339W,T,S; y G355R.

5. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el rendimiento de expresión de la variante aumenta al menos 2,25 veces, al menos 2,50 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,00 veces, al menos 3,25 veces, al menos 3,50 veces, al menos 3,75 veces, al menos 4 veces, al menos 4,25 veces, al menos 4,50 veces, al menos 4,75 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces o al menos 40 veces en comparación con la progenitora.

6. Polinucleótido aislado que codifica la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6.

8. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6.

9. Método para producir una variante de lacasa según la reivindicación 1, que comprende:

(a) cultivar la célula huésped recombinante según la reivindicación 8 en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y, opcionalmente
(b) recuperar la variante.

10. Método para obtener una variante de lacasa, que comprende: (a) introducir sustituciones en una lacasa progenitora en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 9, 21, 37, 79, 102, 170, 175, 178, 179, 200, 262, 275, 276, 289, 292, 333, 357, 360, 393, 397, 418, 485, 506 y 518 del polipéptido de longitud completa de SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad lacasa y, opcionalmente (b) recuperar la variante; donde la variante tiene al menos un 90 %, pero menos de un 100 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma; donde la variante comprende las sustituciones A9R+L79D+L179N; y donde el rendimiento de expresión de la variante aumenta al menos 2 veces en comparación con la progenitora que tiene la secuencia SEQ ID N.º: 2.

11. Método según la reivindicación 10, que comprende, además, una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 89, 151, 286, 307, 313, 339 y 355 del polipéptido de longitud completa de SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad lacasa.

12. Método según la reivindicación 11, donde la una o más sustituciones se selecciona(n) del grupo que consta de F89A,V,L,I; N151D,E,R,K; F286R,H,V; A307P,H,G; T313N,T,S; V339W,T,S; y G355R.

13. Composición enzimática, formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

14. Uso de la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para conversión de celulosa, modificación de lignina, fortalecimiento del papel, inhibición de la transferencia de tintes en detergentes, polimerización de fenol, teñido del cabello, blanqueo de textiles, abrasión de tejidos, tratamiento de aguas residuales y desintoxicación de material celulósico pretratado.

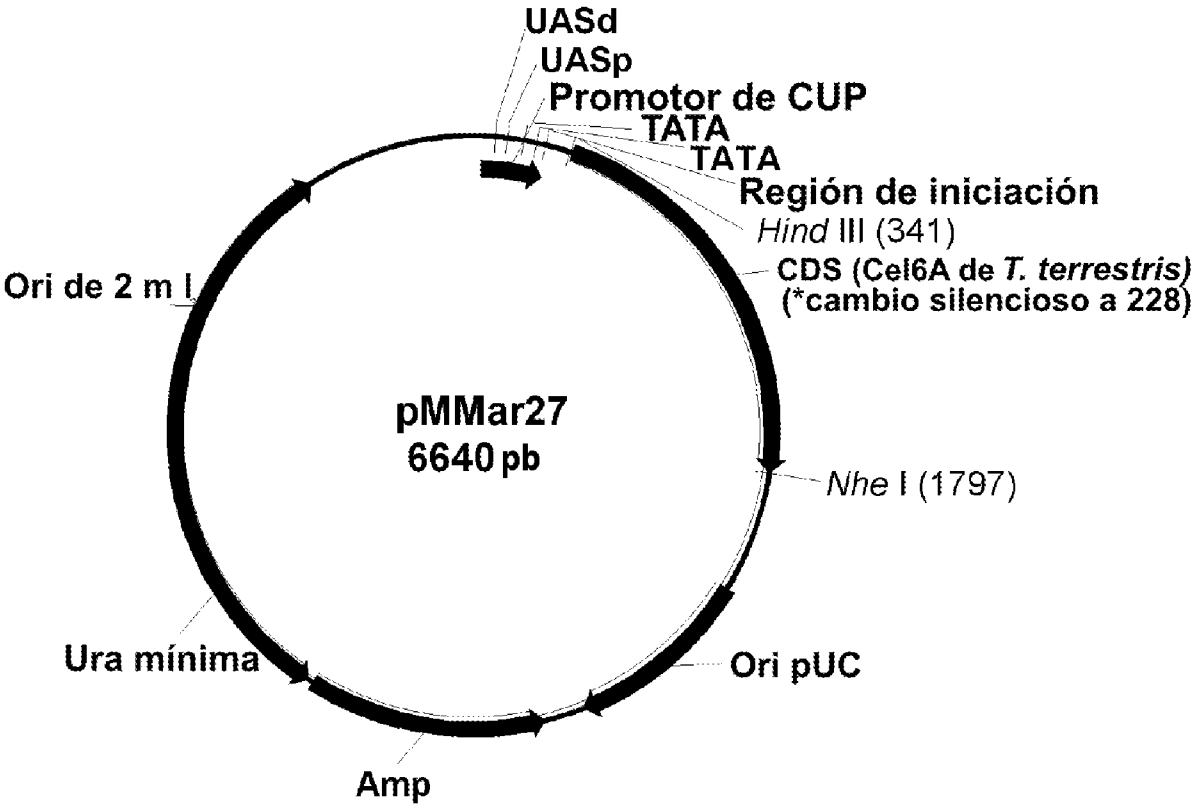

UASd
UASp
Promotor de CUP
TATA
TATA
Región de iniciación
Hind III (341)
CDS (Cel6A de T. terrestris)
(*cambio silencioso a 228)
Ori de 2 m I
pMMar27
6640 pb
Nhe I (1797)
Ura mínima
Ori pUC
Amp

FIG. 1

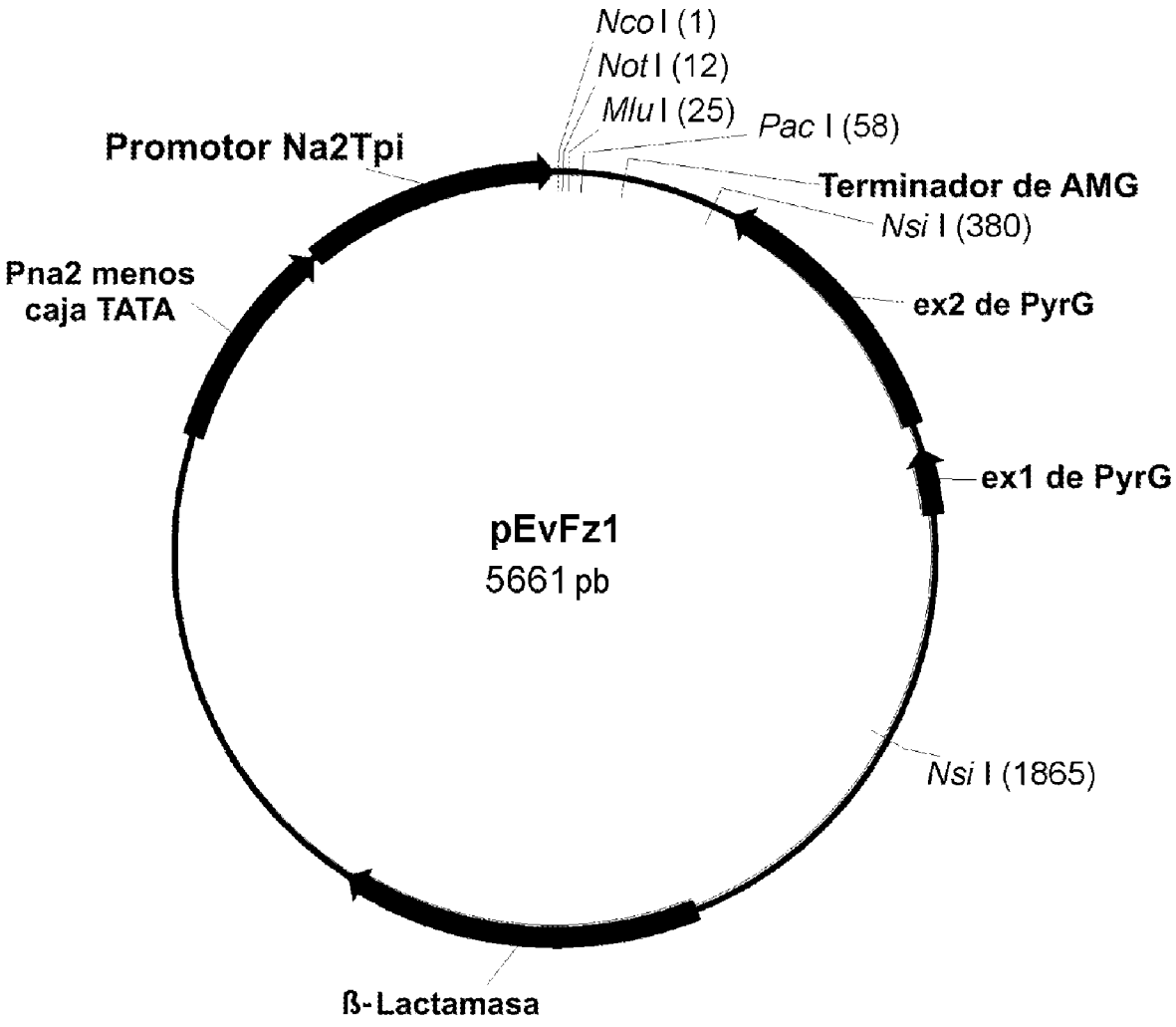

NcoI (1)
NotI (12)
MluI (25)
PacI (58)
Promotor Na2Tpi
Terminador de AMG
NsiI (380)
Pna2 menos caja TATA
ex2 de PyrG
ex1 de PyrG
pEvFz1
5661 pb
NsiI (1865)
ß-Lactamasa

FIG. 2

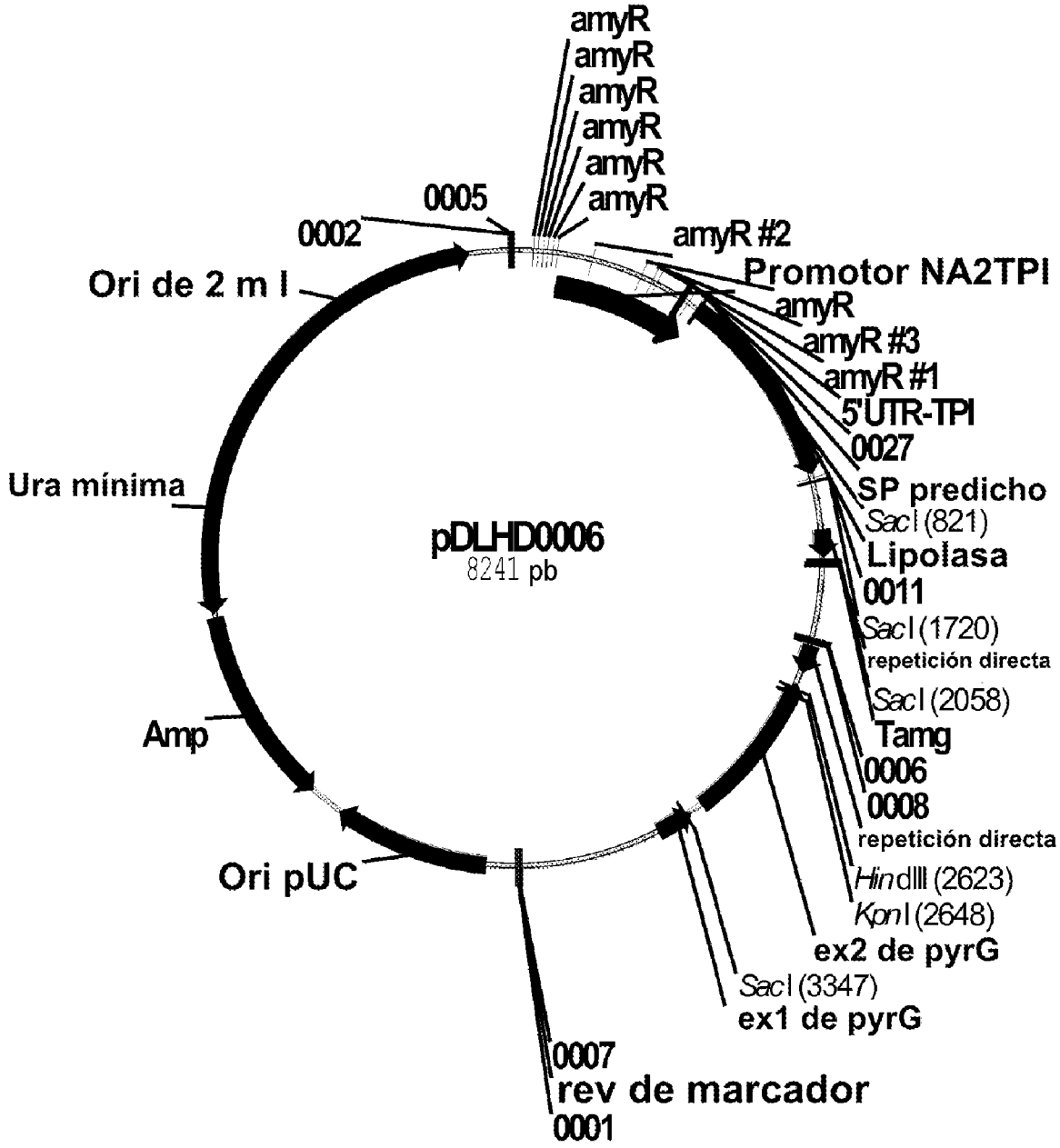

amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
0005
0002
amyR #2
Promotor NA2TPI
Ori de 2 m l
amyR
amyR #3
amyR #1
5'UTR-TPI
0027
SP predicho
Ura mínima
SacI (821)
pDLHD0006
8241 pb
Lipolasa
0011
SacI (1720)
repetición directa
SacI (2058)
Amp
Tamg
0006
0008
repetición directa
HindIII (2623)
KpnI (2648)
Ori pUC
ex2 de pyrG
SacI (3347)
ex1 de pyrG
0007
rev de marcador
0001

FIG. 3

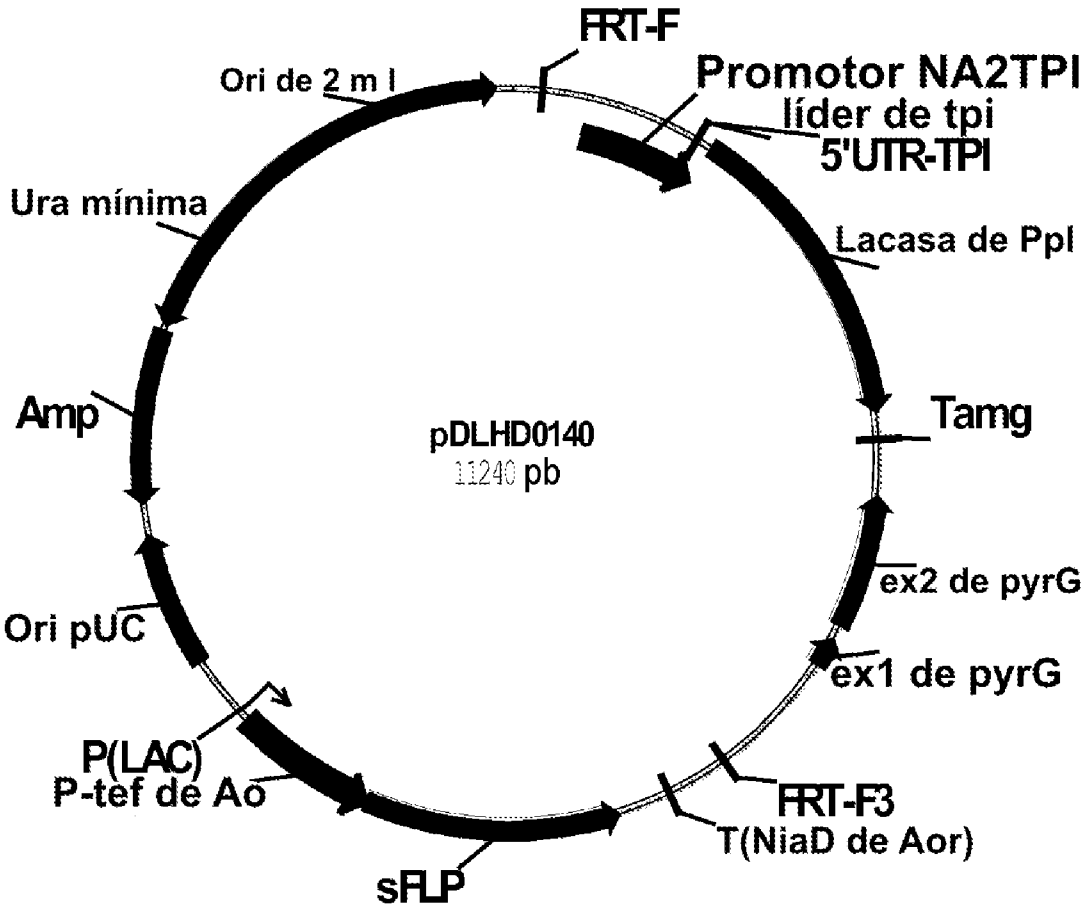

FRT-F
Promotor NA2TPI
líder de tpi
5'UTR-TPI
Lacasa de Ppl
Tamg
ex2 de pyrG
ex1 de pyrG
FRT-F3
T(NiaD de Aor)
sFLP
P(LAC)
P-tef de Ao
Ori pUC
Amp
Ura mínima
Ori de 2 m l
pDLHD0140
11240 pb

FIG. 4

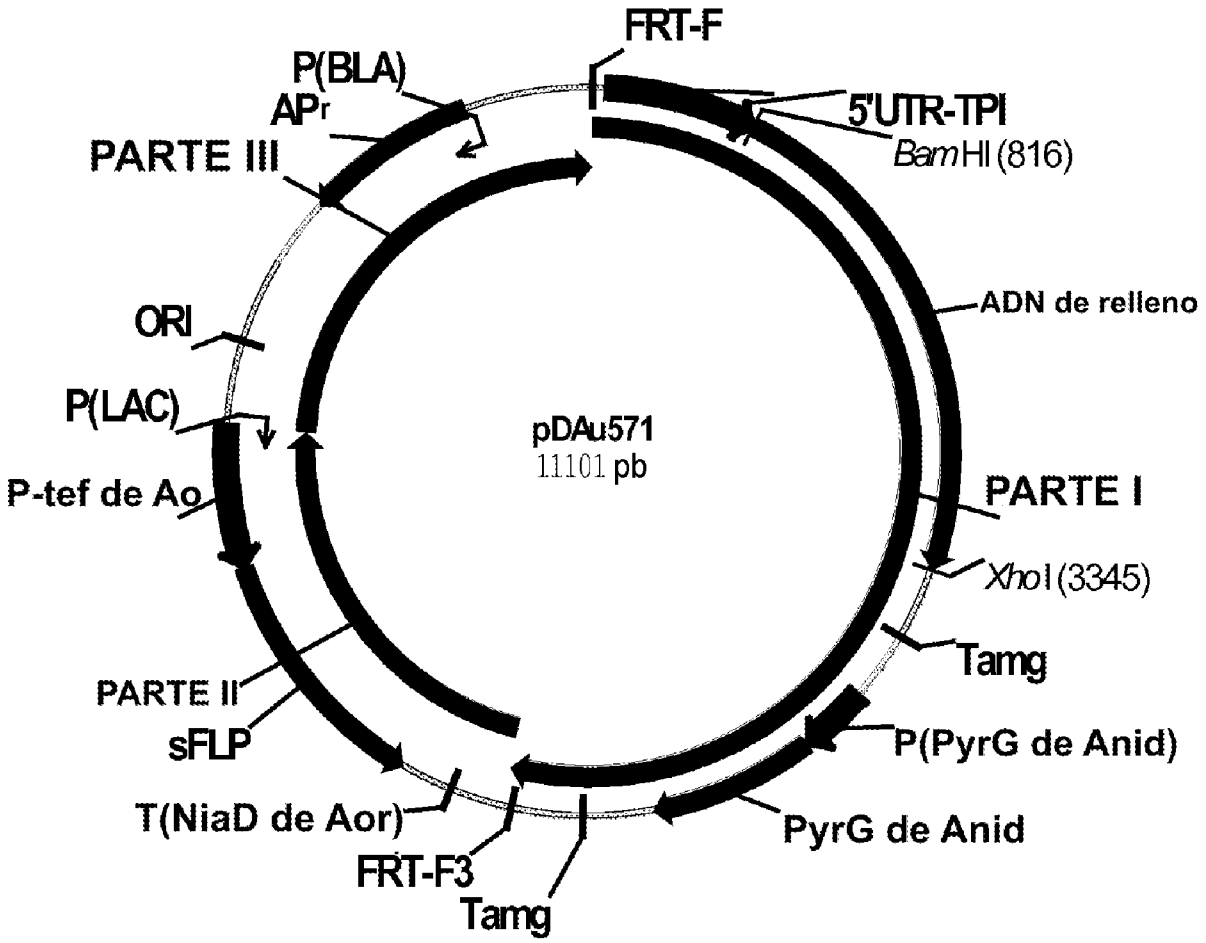

FRT-F
P(BLA)
APr
5'UTR-TPI
BamHI (816)
PARTE III
ADN de relleno
ORI
P(LAC)
pDAu571
11101 pb
P-tef de Ao
PARTE I
XhoI (3345)
Tamg
PARTE II
sFLP
P(PyrG de Anid)
T(NiaD de Aor)
PyrG de Anid
FRT-F3
Tamg

FIG. 5

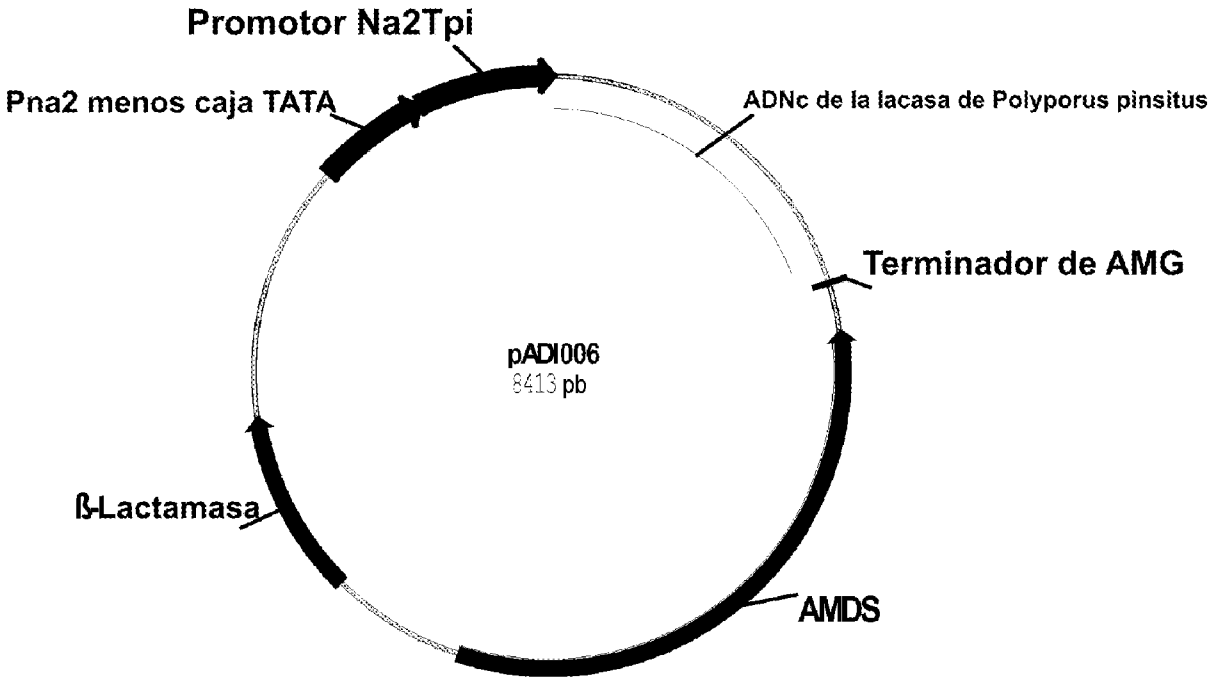

Promotor Na2Tpi
Pna2 menos caja TATA
ADNc de la lacasa de Polyporus pinsitus
Terminador de AMG
pADI006
8413 pb
ß-Lactamasa
AMDS

FIG.6

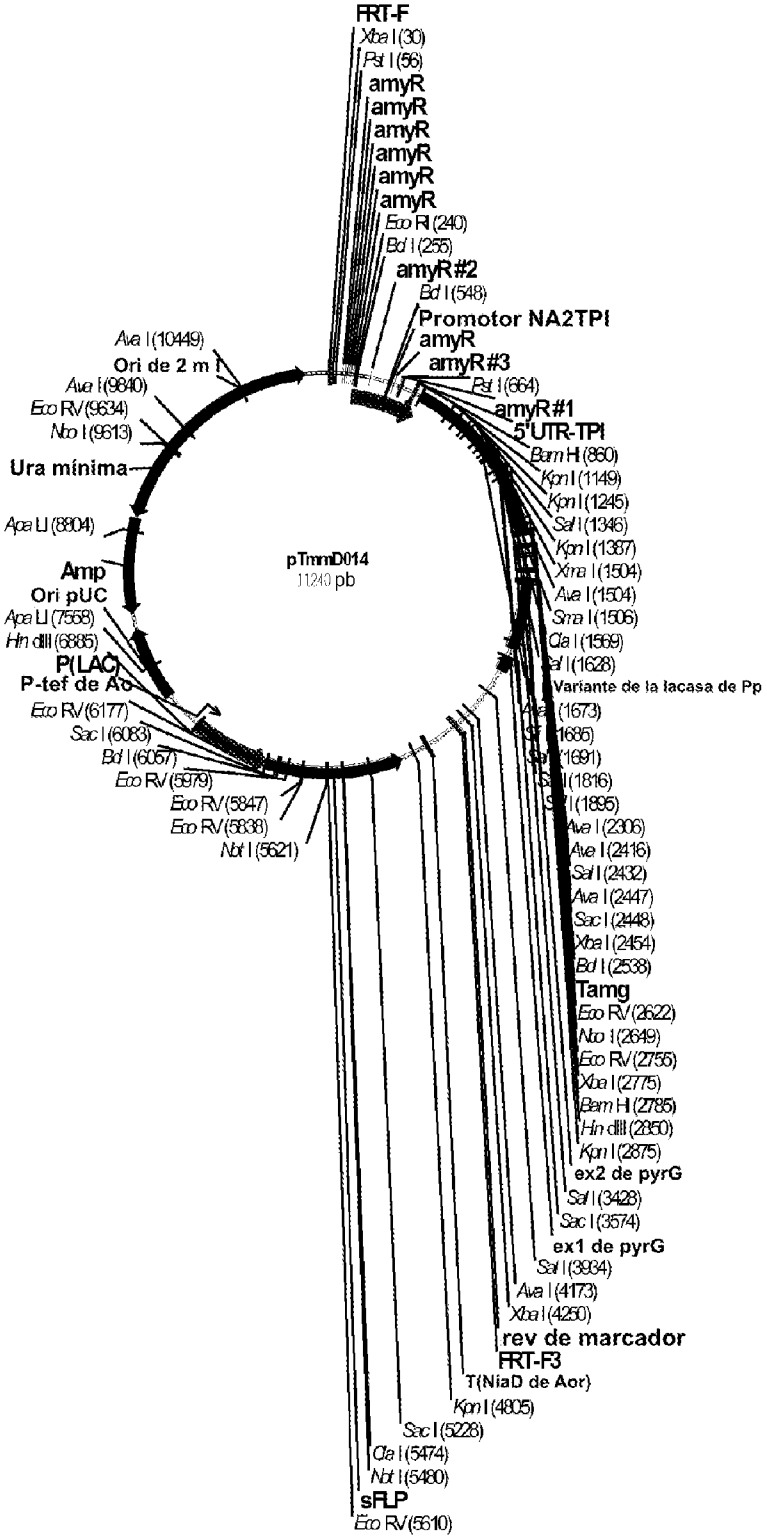

pTmmD014
11240 pb
FRT-F
Xba I (30)
Pst I (56)
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
Eco RI (240)
Bcl I (255)
amyR#2
Bcl I (548)
Promotor NA2TPI
amyR
amyR#3
Pst I (664)
amyR#1
5'UTR-TPI
BamH I (850)
Kpn I (1149)
Kpn I (1245)
Sal I (1346)
Kpn I (1387)
Xma I (1504)
Ave I (1504)
Sma I (1506)
Cla I (1569)
Sal I (1628)
Variante de la lacasa de Pp
Ave I (1673)
Sal I (1691)
Ave I (2306)
Ave I (2416)
Sal I (2432)
Ave I (2447)
Sac I (2448)
Xba I (2454)
Bcl I (2538)
Tamg
Eco RV (2622)
Nco I (2649)
Eco RV (2755)
Xba I (2775)
BamH I (2785)
Hin dIII (2850)
Kpn I (2875)
ex2 de pyrG
Sal I (3428)
Sac I (3574)
ex1 de pyrG
Sal I (3934)
Ave I (4173)
Xba I (4250)
rev de marcador
FRT-F3
T(NiaD de Aor)
Kpn I (4805)
Sac I (5228)
Cla I (5474)
Not I (5480)
sFLP
Eco RV (5610)
Not I (5621)
Eco RV (5838)
Eco RV (5847)
Eco RV (5979)
Bcl I (6057)
Sac I (6083)
Eco RV (6177)
P-tef de Aor
P(LAC)
Hin dIII (6885)
Ape LI (7558)
Ori pUC
Amp
Ape LI (8804)
Ura mínima
Eco RV (9613)
Nco I (9634)
Ave I (9840)
Ori de 2 m
Ave I (10449)

Fig. 7

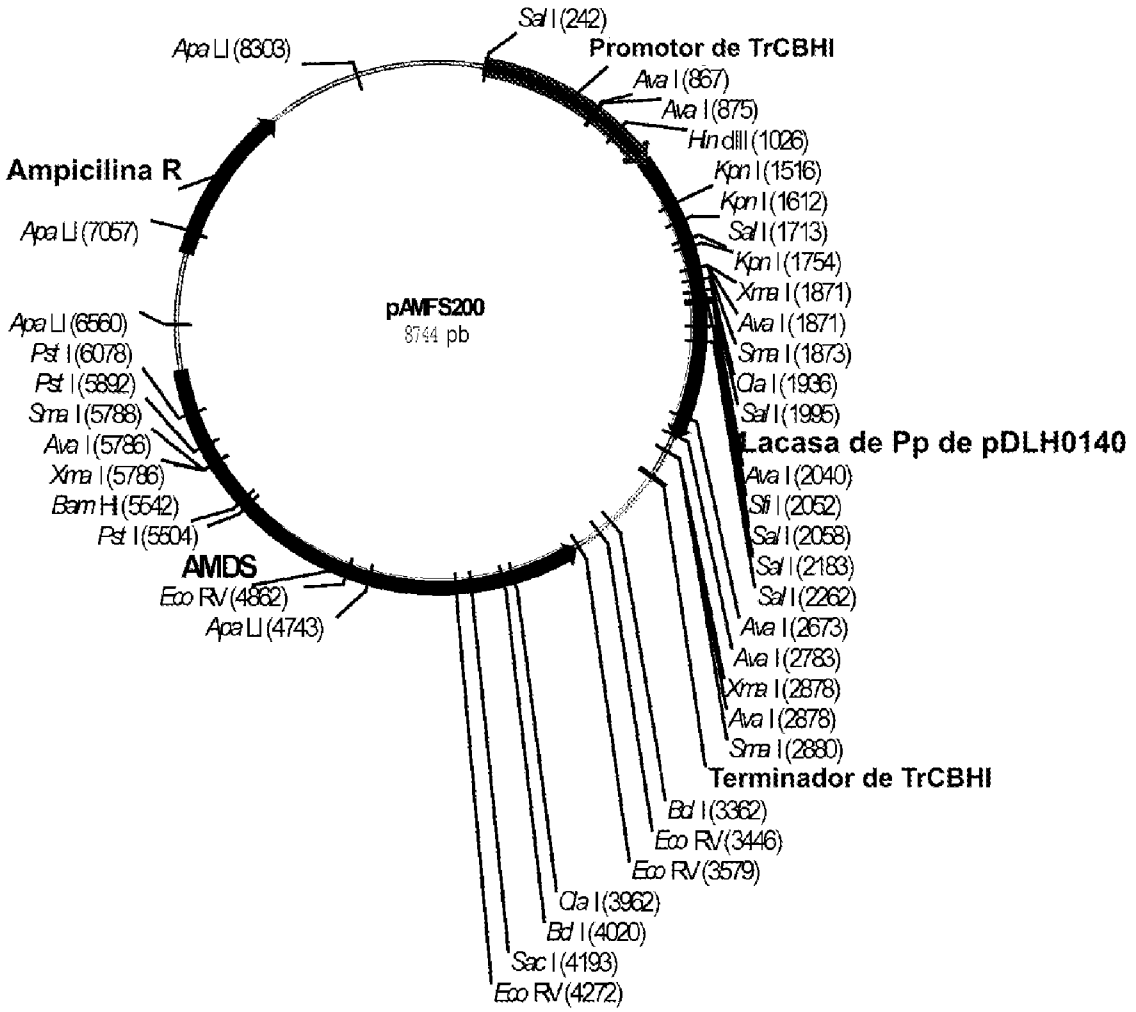

pAMFS200
8744 pb
Sal I (242)
Promotor de TrCBHI
Ava I (867)
Ava I (875)
Hin dIII (1026)
Kpn I (1516)
Kpn I (1612)
Sal I (1713)
Kpn I (1754)
Xma I (1871)
Ava I (1871)
Sma I (1873)
Cla I (1936)
Sal I (1995)
Lacasa de Pp de pDLH0140
Ava I (2040)
Sfi I (2052)
Sal I (2058)
Sal I (2183)
Sal I (2262)
Ava I (2673)
Ava I (2783)
Xma I (2878)
Ava I (2878)
Sma I (2880)
Terminador de TrCBHI
Bcl I (3362)
Eco RV (3446)
Eco RV (3579)
Cla I (3962)
Bcl I (4020)
Sac I (4193)
Eco RV (4272)
Apa LI (4743)
Eco RV (4862)
AMDS
Pst I (5504)
Bam HI (5542)
Xma I (5786)
Ava I (5786)
Sma I (5788)
Pst I (5892)
Pst I (6078)
Apa LI (6560)
Apa LI (7057)
Ampicilina R
Apa LI (8303)

Fig. 8

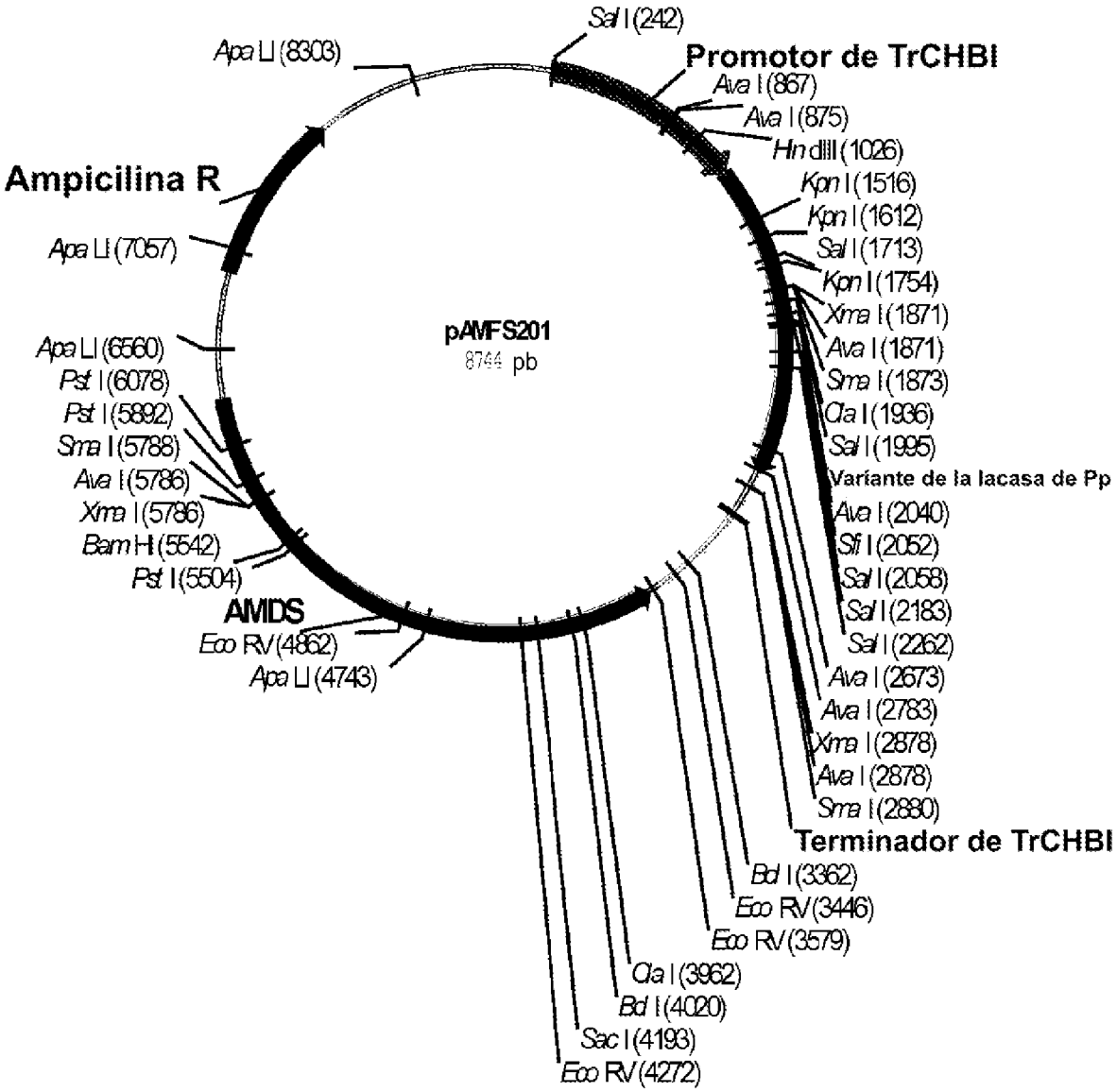

Sal I (242)
Promotor de TrCHBI
Ava I (867)
Ava I (875)
Hin dIII (1026)
Kpn I (1516)
Kpn I (1612)
Sal I (1713)
Kpn I (1754)
Xma I (1871)
Ava I (1871)
Sma I (1873)
Cla I (1936)
Sal I (1995)
Variante de la lacasa de Pp
Ava I (2040)
Sfi I (2052)
Sal I (2058)
Sal I (2183)
Sal I (2262)
Ava I (2673)
Ava I (2783)
Xma I (2878)
Ava I (2878)
Sma I (2880)
Terminador de TrCHBI
Bcl I (3362)
Eco RV (3446)
Eco RV (3579)
Cla I (3962)
Bcl I (4020)
Sac I (4193)
Eco RV (4272)
Apa LI (4743)
Eco RV (4862)
AMDS
Pst I (5504)
BamH I (5542)
Xma I (5786)
Ava I (5786)
Sma I (5788)
Pst I (5892)
Pst I (6078)
Apa LI (6560)
Apa LI (7057)
Ampicilina R
Apa LI (8303)
pAMFS201
8744 pb

Fig. 9

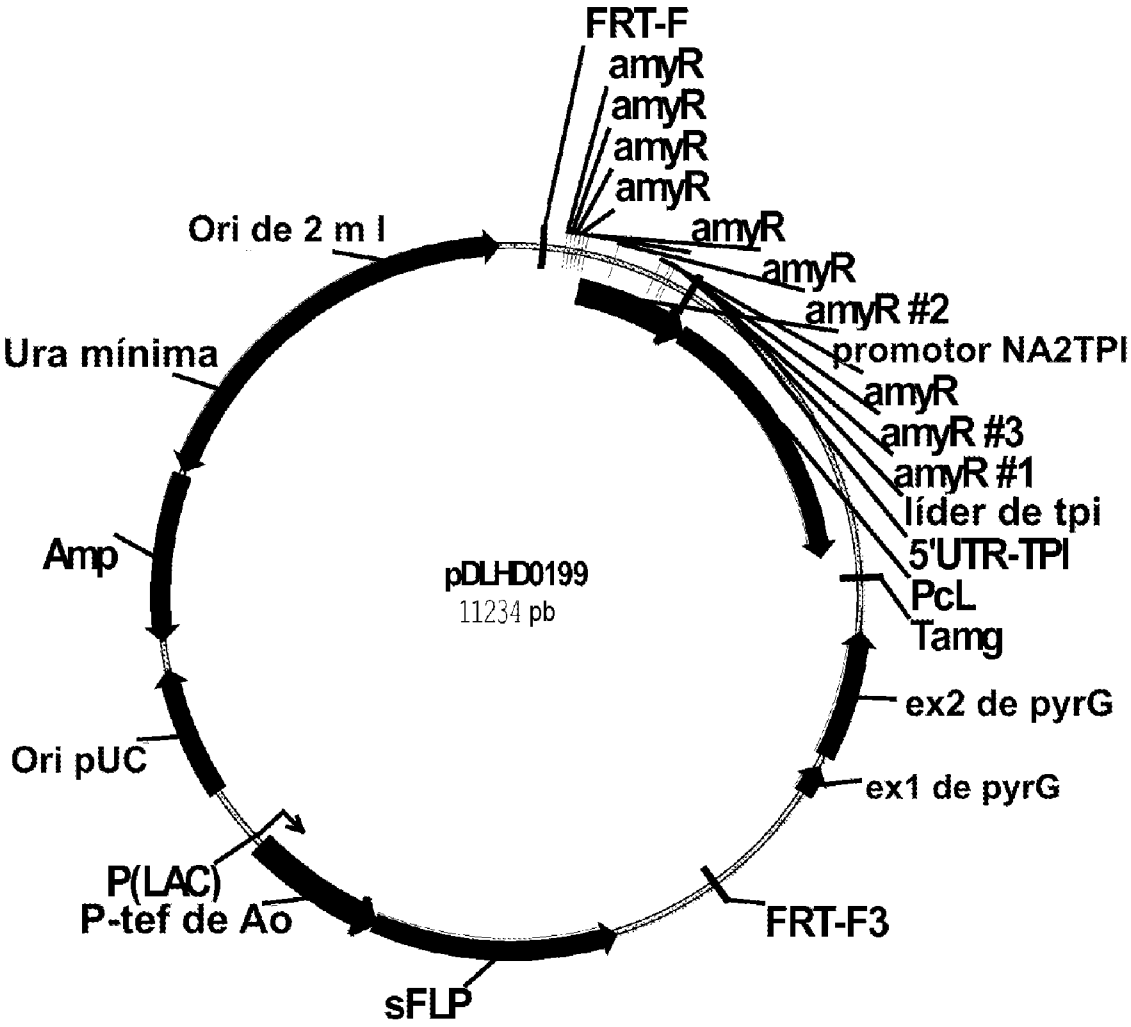

FRT-F
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR #2
promotor NA2TPI
amyR
amyR #3
amyR #1
líder de tpi
5'UTR-TPI
PcL
Tamg
ex2 de pyrG
ex1 de pyrG
FRT-F3
sFLP
P(LAC)
P-tef de Ao
Ori pUC
Amp
Ura mínima
Ori de 2 m l
pDLHD0199
11234 pb

Fig. 10

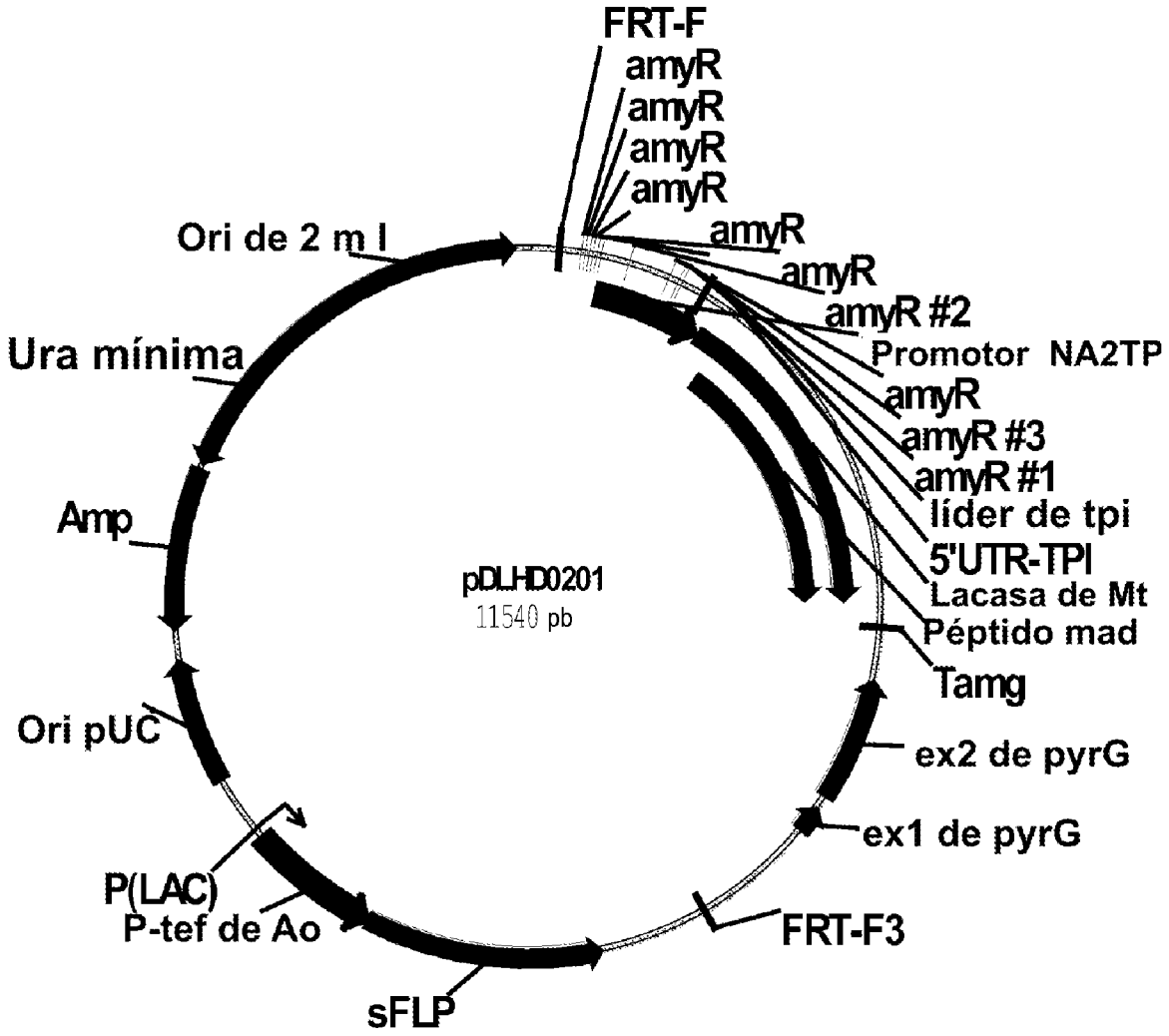

FRT-F
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR
amyR #2
Promotor NA2TP
amyR
amyR #3
amyR #1
líder de tpi
5'UTR-TPI
Lacasa de Mt
Péptido mad
Tamg
ex2 de pyrG
ex1 de pyrG
FRT-F3
sFLP
P-tef de Ao
P(LAC)
Ori pUC
Amp
Ura mínima
Ori de 2 m l
pDLHD0201
11540 pb

Fig. 11