



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 197**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C09B 67/00** (2006.01)  
**C12R 1/645** (2006.01)  
**C12R 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00905340 .6**  
86 Fecha de presentación : **25.02.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1156106**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2001**

54 Título: **Una enzima con actividad de degradación de colorantes y procedimiento de degradación de colorantes por medio de la mencionada enzima.**

30 Prioridad: **26.02.1999 JP 11-50562**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **Meiji Seika Kaisha, Ltd.**  
**4-16, Kyobashi 2-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP**

72 Inventor/es: **Syoda, Makoto;**  
**Sugano, Yasushi y**  
**Kubota, Hidetoshi**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 280 197 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Una enzima con actividad de degradación de colorantes y procedimiento de degradación de colorantes por medio de la mencionada enzima.

### Campo técnico

La presente invención hace referencia a una enzima peroxidasa novedosa con una elevada actividad de degradación de colorantes, a la información genética de la misma y a un método para degradar y decolorar colorantes utilizando la misma.

### Técnica antecedente

Muchos de los diversos colorantes sintéticos descargados a partir de los procedimientos de tinción de productos de fibra y a partir de procedimientos de producción de tintes son sustancias ligeramente biodegradables, que implican mucha dificultad en la degradación de las mismas en la naturaleza. Debido a que semejante agua residual coloreada es peligrosa para la naturaleza, las regulaciones sobre el agua residual se han hecho más severas.

En los campos de la industria de la tinción y la industria de producción de tintes, el agua residual que contiene colorantes se ha tratado convencionalmente, principalmente mediante métodos físicos o químicos tales como la adsorción, la concentración, la transformación química y la incineración. Aunque estos métodos de tratamiento son eficaces, estos métodos implican desventajosamente una contaminación secundaria debida a la generación de subproductos peligrosos y a la descarga del gas de efecto invernadero vía elevado nivel de consumo de energía.

Recientemente, se ha centrado la atención en un método de tratamiento que utiliza activamente biotecnología con microorganismos o enzimas, como una alternativa de los métodos de tratamiento. Ya se ha informado sobre numerosas cepas microbianas capaces de degradar colorantes y sustancias coloreadas. Por ejemplo, se enumera *Phanerochaete chrysosporium* como especie de hongo blanco de la podredumbre, que es conocido como uno de los hongos degradadores de la lignina.

No obstante, todos los microorganismos degradadores de los colorantes conocidos hasta ahora tienen una actividad de degradación de solamente uno o varios tipos de colorantes, de manera que la capacidad de los microorganismos para tratar los colorantes vía degradación está limitada naturalmente. Por lo tanto, se ha deseado el desarrollo de un método eficaz para tratar el agua residual que contiene colorantes.

Algunos de los autores de la presente invención han aislado un microorganismo capaz de degradar los colorantes de tipo azo y de tipo antraquinona, a saber *Geotrichum candidum* Dec 1 [que fue consignado internacionalmente en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Ministry of International Trade and Industry, en 1-1-3, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón [transferido en 17 de Febrero, 2000 de la consigna original (FERM P-15348); el número de acceso era FERM BP-7033] de la naturaleza y han desarrollado un método de degradación y decoloración de una gama más amplia de colorantes mediante tratamiento microbiano (Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 9-173051).

Se ha supuesto que la excelente capacidad de la cepa *Geotrichum candidum* Dec 1 para degradar los colorantes se puede basar posiblemente en la actividad peroxidasa de la cepa fúngica, pero no se ha encontrado ningún caso de aislamiento específico o identificación de tal enzima. Por eso, la información genética de la misma no ha sido elucidada en absoluto.

La presente invención se ha logrado por la demanda industrial como se ha mencionado antes. Un objeto de la invención es describir una enzima aplicable a un tratamiento más eficaz del agua residual que contiene colorantes y un método para degradar y decolorar colorantes utilizando las enzimas.

La cepa *Geotrichum candidum* Dec 1 ejerce una actividad de degradación de una amplia gama de colorantes y también tiene una estabilidad enzimática destacada. Por lo tanto, la cepa fúngica *per se* o después de la inmovilización sobre un portador apropiado puede ser utilizada para degradar colorantes.

Con el fin de potenciar la aplicabilidad industrial, no obstante, el tratamiento de las aguas residuales que contienen colorantes, concretamente la degradación de los colorantes se debe lograr esencialmente de una manera económicamente eficaz.

Para ese fin es útil emplear una enzima de degradación de colorantes poseída por dicho microorganismo por medio del aislamiento y la purificación en lugar del uso del microorganismo *per se*, para elucidar adicionalmente la constitución genética del mismo para llevar a cabo la producción en masa de la enzima y utilizarlos combinados.

Los autores de la presente invención han realizado investigaciones con el fin de lograr el propósito. Debido a que la cepa *Geotrichum candidum* Dec 1 emplea un amplio espectro de decoloración sobre diversos colorantes, los autores de la invención han realizado investigaciones adicionales centrando su atención en las enzimas de degradación de colorantes producidas por el hongo. Los autores de la invención han aislado e identificado con éxito una de las

## ES 2 280 197 T3

enzimas, han elucidado el gen que codifica la enzima y han desarrollado un sistema de expresión en masa de la enzima.

### Descripción de la invención

El primer aspecto de la invención es el uso de una peroxidasa (abreviada a veces más adelante como DyP) derivada de la cepa *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033), que tiene las siguientes propiedades:

- a) una propiedad de degradación y decoloración de colorantes;
- b) un peso molecular de 60 kDa, mediante un análisis del peso molecular utilizando SDS-PAGE;
- c) un peso molecular de 55 kDa, mediante un análisis del peso molecular utilizando la filtración en gel; y
- d) pI (punto isoeléctrico) de 3,8, mediante el análisis de isoelectroenfoque para degradar compuestos fenólicos.

El segundo aspecto de la invención es el uso de la enzima del primer aspecto, que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO. 7 de la lista de secuencias.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa los resultados de la electroforesis en SDS de la enzima DyP de la invención. En la figura, las cifras numéricas de la izquierda muestran el peso molecular, mientras las cifras numéricas superiores 1 a 5 representan independientemente el marcador de peso molecular, la solución de enzima bruta, la solución de enzima después de la cromatografía de intercambio iónico, la solución de enzima después de la cromatografía hidrófoba y la solución de enzima después de la cromatografía de intercambio iónico, en este orden.

La Fig. 2 representa los resultados del isoelectroenfoque de la enzima DyP de la invención. En la figura, las cifras numéricas de la derecha muestran los puntos isoeléctricos (pI), mientras las cifras numéricas superiores 1 a 3 representan independientemente la solución de enzima bruta, la DyP purificada y el marcador de punto isoeléctrico, en este orden.

La Fig. 3 es un gráfico que representa la relación entre la actividad enzimática de la enzima de la invención DyP y la temperatura.

La Fig. 4 muestra la comparación entre la estructura primaria en la proximidad del resto Arginina (Arg) y el resto Histidina (His) situado en el centro de la actividad. En la figura, el cuadrado vacío ( $\square$ ) muestra la posición del resto Arg proximal, mientras el círculo vacío ( $\circ$ ) muestra la posición del resto His proximal y el círculo relleno ( $\bullet$ ) muestra la posición del resto His distal.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

La invención se describe ahora con detalle más abajo.

La peroxidasa de la invención deriva de la cepa *Geotrichum candidum* Dec 1. Los autores de la presente invención aislaron y purificaron la enzima como sigue.

#### *Preparación del caldo de cultivo*

Según los métodos generales, la cepa *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033) fue cultivada en un medio de cultivo líquido. Se puede utilizar cualquier medio de cultivo líquido de cualquier composición, con tal que la cepa *Geotrichum candidum* Dec 1 pueda crecer en el medio de cultivo líquido. Un ejemplo preferible es el medio de cultivo de patata-dextrosa (algunas veces abreviado como PD más abajo) fabricado por Difco, Co., Ltd. Con el fin de promover la inducción de la enzima pretendida, adicionalmente, se pueden añadir colorantes al medio de cultivo.

Las condiciones de cultivo de la cepa fúngica pueden ser determinados satisfactoriamente a la luz del tipo de medio de cultivo utilizado. Cuando se selecciona el medio de cultivo PD, por ejemplo, la cepa fúngica se cultiva a 15-37°C, preferiblemente a 30°C durante 3 a 8 días.

El caldo de cultivo recuperado de este modo se somete a las siguientes etapas en forma de sustancia de partida para la purificación de la enzima de degradación de colorante.

#### *Purificación de enzima de degradación de colorante*

La enzima de degradación de colorante va a ser purificada a continuación. Las condiciones de purificación no están específicamente limitadas. Con el fin de proteger la actividad de la enzima de la inactivación, se manipula el caldo de cultivo preferiblemente a una temperatura baja, concretamente en un refrigerador.

## ES 2 280 197 T3

Específicamente, los microorganismos se separan primero del caldo de cultivo, del que se recupera el sobrenadante. En ese caso, se pueden utilizar satisfactoriamente procedimientos de separación tales como la filtración, centrifugación y filtración con membrana. Preferiblemente, no obstante, los microorganismos se separan por centrifugación, seguido de filtración con un filtro de vidrio. Los polisacáridos contaminantes se separan realizando una combinación de las mismas, para recuperar una solución de enzima bruta con una elevada pureza.

Con posterioridad, la solución de enzima bruta recuperada se puede someter a aislamiento, utilizando la actividad de degradación de colorante descrita más abajo como marcador. Antes de semejante aislamiento, sin embargo, se pueden llevar a cabo la concentración y la eliminación de las sales con el fin de permitir fácilmente la separación, para preparar una solución de enzima bruta concentrada.

La concentración se puede realizar mediante métodos de uso general, por ejemplo ultra-filtración, precipitación por adición de sal, y evaporación. Preferiblemente, la concentración se puede llevar a cabo mediante ultra-filtración. Adicionalmente, la eliminación de las sales se puede llevar a cabo mediante diálisis, ultra-filtración y electro-diálisis.

A partir de la solución de enzima bruta concentrada recuperada se puede aislar después la enzima de degradación de colorante pretendida, utilizando la actividad de degradación de colorante como marcador.

En cuanto al método para ello, se pueden utilizar la cromatografía en columna de resina de intercambio iónico, la cromatografía en columna hidrófoba, la cromatografía en columna con filtración en gel y similares.

Se puede utilizar uno de estos tipos de cromatografía en columna o una combinación de diversos tipos de las mismas, para recoger las fracciones activas para aislar y purificar la enzima de degradación de colorante.

Mediante los procedimientos, los autores de la invención recuperaron la enzima purificada pretendida. La enzima purificada (producto activo 205 veces) está en una única banda de la electroforesis en gel de poliacrilamida (abreviada a veces más abajo como SDS-PAGE). La enzima es la enzima de degradación de colorante, peroxidasa en el primer aspecto de la invención. Los autores de la invención designaron la enzima como DyP.

### *Propiedades de la enzima DyP de degradación de colorante purificada*

Las propiedades de la enzima de la invención DyP purificada mediante los procedimientos fueron medidas según los siguientes principios.

Primero, el peso molecular se midió mediante SDS-PAGE y cromatografía de filtración en gel.

Para la medición mediante SDS-PAGE, se puede utilizar un kit normalizado de peso molecular para electroforesis asequible comercialmente como patrón de peso molecular.

Un ejemplo de los mismos incluye Combitek fabricado por Boehringer Mannheim Yamanouchi, Co., Ltd. El kit comprende  $\alpha$ -2-macroglobulina (peso molecular de 170 kDa), fosforilasa B (peso moléculas 97,4 kDa), glutamato deshidrogenasa (peso molecular de 55,4 kDa), lactato deshidrogenasa (peso molecular de 36,5 kDa), e inhibidor de tripsina (peso molecular de 20,1 kDa).

Como se muestra en la Fig. 1 que representa los resultados de la medición, el peso molecular de la enzima DyP de la invención es de 60 kDa.

Para el análisis del peso molecular de la enzima mediante cromatografía de filtración en gel, adicionalmente, los autores de la invención utilizaron una columna Sephacryl S-200 y la proteína de peso molecular normalizado (fabricada por BIO-RAD, CO., LTD.).

Por consiguiente, se analizó que el peso molecular de la enzima PyD de la invención era de 55 kDa.

Después, se midió el punto isoeléctrico de la enzima de la invención. El punto isoeléctrico se midió mediante isoelectroenfoque.

Por consiguiente, el punto isoeléctrico de la enzima DyP fue analizado como pI = 3,8, como se muestra en la Fig. 2.

### *Espectro de degradación de colorante de la enzima DyP de degradación de colorante*

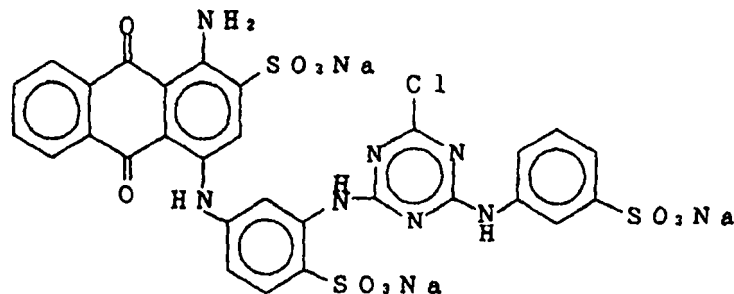
La enzima DyP de degradación de colorante de la invención tiene una actividad enzimática sobre los colorantes de tipo azo y de tipo antraquinona, en particular, entre los colorantes, y tiene capacidad para degradar y decolorar estos pigmentos.

Los colorantes de tipo antraquinona incluyen por ejemplo azul reactivo 5, azul reactivo 19 y azul reactivo 114 (todos fabricados por Nippon Kayaku Co., Ltd.); sulfonato de 1-amino-4-(3-amino-4-sodio-sulfoanilino)-2-sodio-an-

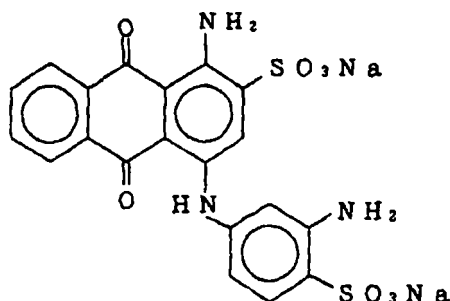
## ES 2 280 197 T3

traquinona (a veces abreviada como AQ-1 más adelante) y sulfonato de 1-amino-4-metilamino-2-sodio-antraquinona (a veces abreviada como AQ-2 más adelante).

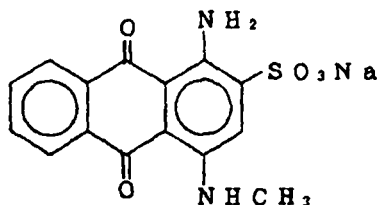
En la presente memoria, azul reactivo 5 es el compuesto representado por la siguiente fórmula química.



AQ-1 es el compuesto representado por la siguiente fórmula química.



AQ-2 es el compuesto representado por la siguiente



Adicionalmente, los colorantes de tipo azo incluyen por ejemplo negro reactivo 5, rojo reactivo 33, amarillo reactivo 2 y azul reactivo 182 (todos fabricados por Nippon Kayaku Co., Ltd.).

Además de los colorantes, la enzima DyP de degradación de colorantes tiene la capacidad de degradar compuestos fenólicos tales como 2,6-dimetoxifenol y guayacol, que son conocidos como sustratos de la manganeso peroxidasa (a veces abreviada como MnP más adelante). Como se muestra en los siguientes ejemplos, no se observa efecto de los compuestos de manganeso añadidos a la solución de reacción sobre la promoción de la actividad de la enzima.

Alternativamente, no se observa reacción de DyP con el alcohol veratrílico conocido como sustrato de la ligninoperoxidasa (abreviada a veces más adelante como LiP).

Como se ha descrito antes, sorprendentemente, DyP emplea una especificidad de sustrato diferente de la de MnP y LiP conocida hasta ahora. De este modo, DyP puede ser mencionada como una peroxidasa que difiere de las enzimas conocidas.

### *Temperatura de reacción óptima de la enzima DyP de degradación de colorante*

La temperatura de reacción óptima de la enzima DyP de degradación de colorante de la invención está entorno a los 30°C, como se muestra en la Fig. 3. La enzima DyP ejerce una actividad de degradación de colorante estable en un intervalo de temperatura de 15°C a 35°C. No obstante, la actividad de la enzima disminuye rápidamente a una temperatura por encima de 35°C.

## ES 2 280 197 T3

### *Estabilidad frente a la temperatura de la enzima DyP de degradación de colorante*

Después de que la enzima DyP de degradación de colorante de la invención se almacenara a una temperatura establecida durante un período de tiempo establecido, se evaluó la razón de la actividad restante con posterioridad. Específicamente, se almacenó una solución de la enzima DyP de degradación de colorante en tampón citrato 25 mM a 30°C o 40°C durante 14 días.

Por consiguiente, la actividad enzimática de DyP restante era del 63% cuando se almacenaba la DyP a 30°C; y la actividad era del 41% cuando la DyP se almacenaba a 40°C.

Con el fin de comparar la estabilidad frente a la temperatura con la de otras peroxidasas, se almacenaron soluciones de enzimas individuales en tampón citrato 25 mM a 60°C durante 3 horas, utilizando peroxidasa de rábano picante asequible comercialmente (fabricada por Wako Chemical Co., Ltd.; abreviada a veces más adelante como HRP) como control. Con posterioridad, se compararon las actividades enzimáticas restantes entre sí.

Por consiguiente, se demostró que el 65% de la actividad de la enzima DyP de degradación de colorante de la invención permanecía, pero solamente permanecía el 10% de la actividad de la HRP.

Los resultados muestran que la enzima DyP de degradación de colorante tiene una estabilidad térmica mayor, en comparación con las peroxidasas conocidas actualmente.

Las características de la enzima DyP de degradación de colorante novedosa según la invención se han descrito antes.

La enzima DyP de degradación de colorante de la invención emplea un intervalo más amplio de actividad de degradación, en comparación con cualquiera de las enzimas de degradación de colorante referidas en la actualidad, y también tiene una estabilidad enzimática importante, como se muestra claramente en las características de la enzima.

En el sexto aspecto de la invención, por tanto, el uso de la enzima DyP de degradación de colorante permite la degradación y la decoloración eficaz de tales colorantes.

Con el fin de aumentar la aplicabilidad industrial de la enzima DyP de degradación de colorante, esencialmente, se debe lograr de manera económica una degradación del agua residual que contiene los colorantes y de los colorantes eficaz.

Un ejemplo incluye un método en el que se utiliza DyP después de la inmovilización. El método comprende inmovilizar la DyP por medio de la adsorción o de la unión covalente sobre portadores de inmovilización, tales como una resina de intercambio iónico, un gel polimérico sintético, carbón activado de origen natural y zeolita, y utilizar la DyP resultante como biorreactor. Para crear un biorreactor altamente activo, es más útil este método que el método en el que se utiliza el microorganismo *per se* después de la inmovilización.

Como medio para producir la enzima más económicamente, se aísla el gen que codifica la enzima pretendida, que después se introduce en un microorganismo anfitrión capaz de expresar la enzima a una escala masiva, de manera que se puede recuperar la DyP con una mayor pureza más eficazmente de una manera más estable.

En comparación con el caso en el que se utiliza el microorganismo *per se*, una comparación de los mismos permite la preparación de un biorreactor con un resultado de coste mucho más excelente.

### *Esquema de aislamiento del gen que codifica la enzima DyP de degradación de colorante*

A partir de las consideraciones anteriores, los autores de la invención llevaron a cabo los siguientes procedimientos con el fin de obtener la información genética de la DyP de la invención.

El método concreto para el aislamiento del gen se describe esquemáticamente más abajo.

Primero, se llevó a cabo la hidrólisis parcial de la enzima DyP de degradación de colorante de la invención purificada mediante el método anteriormente mencionado permitiendo que la tripsina (fabricada por Wako Chemical Co., Ltd.) reaccione con la enzima.

Se purificaron los cinco tipos de fragmentos parcialmente hidrolizados. Después de eso se determinaron las secuencias de aminoácidos de los fragmentos individuales, para preparar sintéticamente el gen codificador correspondiente a cada una de las secuencias de aminoácidos.

Con posterioridad, el gen amplificado mediante PCR fue recuperado mediante PCR utilizando la secuencia codificadora resultante como cebador y el ADNc derivado de *Geotrichum candidum* como molde.

El gen amplificado resultante se marcó utilizando el estuche de detección de marcaje DIG (fabricado por Boehringer Mannheim, Co., Ltd.).

## ES 2 280 197 T3

Mediante métodos generales en los que se utiliza el gen amplificado marcado como sonda, se realizó una hibridación en placa con la genoteca de ADNc derivado de *Geotrichum candidum* Dec 1 preparado utilizando el fago lambda  $\lambda$ gt10.

5 A partir de algunas colonias hibridadas recuperadas de este modo se cortaron los genes pretendidos, que después fueron integrados en el plásmido pUC18, para su posterior secuenciación. Esto se utilizó como molde para la siguiente PCR.

### 10 *Determinación de la secuencia de aminoácidos parcial de la enzima DyP de degradación de colorante*

Con el fin de preparar un cebador para el gen que codifica DyP, se purificó DyP.

15 La purificación de DyP se puede realizar mediante métodos habituales. Los métodos incluyen por ejemplo un método de purificación que comprende la electrotransferencia desde el gel de SDS-PAGE y un método de purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Después de que la DyP fuera desnaturalizada mediante los métodos corrientes, se realizó la hidrólisis parcial de la misma utilizando tripsina. Los péptidos parcialmente digeridos formados de este modo se fraccionaron mediante HPLC. Por consiguiente, se recuperaron cinco fragmentos. La secuencia de aminoácidos de cada uno de los fragmentos 20 fue determinada mediante el método de Edman con un secuenciador de proteínas. Entre las secuencias de aminoácidos de los cinco fragmentos resultantes, la primera secuencia era Trp Lys. Las secuencias de aminoácidos de la segunda y siguientes se muestran en la lista de secuencias, donde la segunda se muestra en el SEQ ID NO. 1; la tercera se muestra en el SEC ID NO. 2; la cuarta se muestra en el SEQ ID NO. 3, y la quinta se muestra en el SEQ ID NO. 4.

25 Entre estas secuencias de aminoácidos, se seleccionaron como cebadores de la PCR una secuencia parcial (SEQ ID NO. 5) del SEQ ID NO. 3 y una secuencia parcial (SEQ ID NO. 6) del SEQ ID NO. 4.

### *Preparación de sondas*

30 Se preparó sintéticamente el ADN que codificaba los dos tipos de secuencias de aminoácidos mediante el siguiente método.

Por medio de una PCR en que se utilizaban los genes cebadores resultantes y el ADNc derivado de *Geotrichum candidum* Dec 1 como molde de la PCR, se puso en práctica una amplificación del gen de la primera etapa. Por 35 consiguiente, se recuperaron cebadores de 200 pb nuevos que correspondían a los dos cebadores.

Ambos extremos de los cebadores fueron sometidos a tratamiento con ADN polimerasa de T4, para preparar sintéticamente sitios de ligación al plásmido. Después, los cebadores fueron ligados al sitio *HincII* de pUC 18 en forma de un vector de expresión de *E. coli*, para recuperar un plásmido recombinante. 40

El plásmido recombinante fue amplificado, utilizando la cepa JM 109 de *E. coli*. A partir del plásmido resultante se cortó el gen codificador. Mediante una segunda PCR, se secuenció el ADN resultante (véanse las posiciones 1012 a 1181 del SEQ ID NO. 8 de la lista de secuencias).

### 45 *Clonación del gen DyP que codifica la enzima DyP de degradación de colorante*

Se preparó ARN según los métodos habituales a partir de la cepa Dec 1 de *Geotrichum candidum* cultivada por separado. Del ARN resultante se purificó ARN poli(A)<sup>+</sup>. Con posterioridad, se utilizó el ARN poli(A)<sup>+</sup> para preparar ADNc con un kit de ADNc (fabricado por TaKaRa). 50

Una vez que el ADNc recuperado se hubo sometido a ligación con el kit de la polinucleótido quinasa de T4, se fraccionó el ADN de 1.200 a 2.000 pb mediante electroforesis.

Adicionalmente, el ADN fue insertado en el sitio *EcoRI* del fago lambda  $\lambda$ gt10, para empaquetarlo en el fago  $\lambda$ . 55 El fago recuperado se utilizó para la infección de *E. coli*.

Se escrutaron las colonias que hibridaban con la sonda marcada preparada previamente. Como resultado, se obtuvieron 11 candidatos.

60 Los resultados de la medición descrita antes indican que la PyD de la invención tiene un peso molecular de 60 kDa a un contenido en cadena de azúcar del 17%, de manera que se estimaba que la secuencia de aminoácidos primaria era de 49,8 kDa. Adicionalmente, se estimaba que el marco de lectura abierto del gen que codificaba la DyP comprendía 460 aminoácidos, esto es 1.380 pb.

65 Independientemente utilizando los genes codificadores de los 11 candidatos recuperados, se llevó a cabo la PCR de nuevo para evaluar el tamaño del fragmento del ADNc insertado. En otras palabras, se escrutaron los genes de aproximadamente 1.380 pb.

## ES 2 280 197 T3

Por consiguiente, se recuperó el clon 92 que portaba el ADNc de un tamaño de 1.600 pb. El ADNc se cortó con *Bam*HI del plásmido recombinante, que después se integró en pUC18. El plásmido resultante se denominó pB92. Se verificó que el clon 92 tenía una actividad de degradación de colorante basada en la enzima DyP de degradación de colorante.

### 5 *Secuencia de ADN del gen pB92*

Se secuenció pB92 con un secuenciador de ADN. Como consecuencia, se encontró que el marco de lectura abierto de pB92 comprendía 498 aminoácidos, esto es 1.494 pb y tenía un peso molecular de 53.306.

10 Esto indica que pB92 porta el gen DyP. La secuencia de aminoácidos de DyP y la secuencia de nucleótidos del gen DyP, portadas en pB92, se muestran como SEQ ID NOS. 7 y 8, respectivamente. En otras palabras, la DyP que tenía la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID NO. 7 en la lista de secuencias es la enzima descrita en el segundo aspecto de la invención, mientras el gen que tiene la secuencia de nucleótidos descrita como SEQ ID NO. 8 en la lista de secuencias es el gen del tercer aspecto de la invención.

20 En la presente memoria, cuando el gen del tercer aspecto de la invención (véase SEQ ID NO. 8 en la lista de secuencias) es modificado con una deleción, sustitución, adición y similar en una parte de la secuencia también está incluido en el alcance de la invención, con tal que el gen modificado resultante tenga los mismos efectos que el gen de la invención.

Adicionalmente, pB92 como vector plasmídico que porta estos genes es descrito en el cuarto aspecto de la invención.

25 Además, se describe un transformante recuperado transfectando *E. coli* con pB92 en el quinto aspecto de la invención. Cuando se utiliza el transformante, la enzima DyP de degradación de colorante de la invención puede ser producida eficazmente.

30 A continuación se describirá la invención más específicamente en los ejemplos de más abajo. No obstante, la invención no está limitada a los ejemplos.

### Ejemplo 1

#### 35 *Purificación y propiedades de la enzima DyP de degradación de colorante*

##### *Purificación de la enzima DyP de degradación de colorante*

40 Se colocaron 150 ml de medio de cultivo PD (medio de cultivo de patata-dextrosa, fabricado por Difco, Co., Ltd.) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, en el cual se habían inoculado 5 ml de la suspensión de esporas de la cepa Dec 1 de *Geotrichum candidum* (FERM BP-7033). Después, se inició el cultivo. El cultivo continuó a 30°C y 120 rpm durante 6 días.

45 Después de cultivar, se enfrió el caldo de cultivo a 4°C y se centrifugó a 7.200 x g durante 20 minutos. Se utilizaron 4.380 ml del sobrenadante resultante para los siguientes procedimientos.

El sobrenadante se filtró a través de un filtro de vidrio (GC50, fabricado por Toyo Roshi Co., Ltd.), para separar los polisacáridos contenidos en él.

50 Después, el producto filtrado se sometió a ultrafiltración sobre una membrana de ultrafiltración (YM10) fabricada por Amicon, Co., Ltd., para concentrar el producto filtrado a 60 ml. El producto concentrado se sometió a diálisis frente a tampón piperazina 25 mM (pH 5,5) y después se concentró a 17,2 ml, utilizando Centiprep 10 fabricado por Amicon, Co., Ltd.

55 El producto concentrado de 17,2 ml se cargó en una columna Super Q 650 M de 2,8 x 6,0 cm (fabricada por Tosoh Co., Ltd.), que se había equilibrado preliminarmente con tampón piperazina 25 mM (pH 5,5). Con posterioridad, la columna se enjuagó con 200 ml del mismo tampón, seguido de elución sobre un gradiente lineal de 0 a 0,4 M.

60 Las fracciones con actividad de degradación de colorante se recogieron y se concentraron a 2,8 ml, utilizando Centiprep10 fabricado por Amicon, Co., Ltd. El producto concentrado se cargó sobre Butyl Toyopearl de 1,6 x 6,5 cm (fabricado por Tosoh Co., Ltd.), que se equilibró preliminarmente con tampón citrato 25 mM (pH 5,5) y sulfato de amonio 0,8 M. Con posterioridad, la columna se enjuagó con 50 ml del mismo tampón, seguido de elución en un gradiente lineal de sulfato de amonio desde 0,8 M a 0, para recoger una fracción con la actividad de degradación de colorante, que era la DyP definida.

65 La DyP fue sometida a diálisis frente a tampón citrato 25 mM, para recuperar la DyP purificada a 1,5 mg. La solución de DyP purificada se almacenó a 4°C.

## ES 2 280 197 T3

### *Propiedades de la enzima de degradación de colorante*

Se midieron el peso molecular y el punto isoeléctrico de la enzima de degradación de colorante PyD recuperada mediante los procedimientos anteriores.

5

El peso molecular fue determinado mediante electroforesis en SDS-PAGE y el método de filtración en gel.

Para la electroforesis en SDS-PAGE, se utilizaron gel de poliacrilamida al 10% fabricado por Atto Co., Ltd. En cuanto al control de peso molecular, se utilizó adicionalmente, Combitheck fabricado por Boehringer Mannheim Yamanouchi, Co., Ltd.

10

Por consiguiente, el peso molecular de DyP analizado era de 60 kDa.

Para la filtración en gel, alternativamente, se utilizó una columna Sephacryl S-200 de 3,1 x 95 cm después de equilibrar con tampón citrato 25 mM (pH 5,0), junto con el kit de proteínas normalizado fabricado por BIO-RAD Co., Ltd.

15

Por consiguiente, el peso molecular de DyP analizado era de 55 kDa.

Para la medición del isoelectroenfoco, se utilizó un kit de calibración de bajo pI de Multiphor II 2-D para pH 2,5 a pH 6,5, fabricado por Pharmacia, Co. Por consiguiente, el punto isoeléctrico de DyP analizado era de 3,9.

20

### *Análisis de la actividad de degradación de colorante*

El espectro de degradación de colorante de la DyP purificada fue examinado para nueve tipos de colorantes y tres compuestos modelo. La actividad de la DyP purificada para degradar estos colorantes o compuestos modelo fue sometida a ensayo midiendo las velocidades de degradación.

25

En cuanto a los colorantes, se hizo uso de azul reactivo 5, 19 y 114; AQ-1 y AQ-2; negro reactivo 5, rojo reactivo 33, amarillo reactivo 2, y azul reactivo 182.

30

Como compuestos modelo, adicionalmente, se hizo uso de 2,6-dimetoxifenol, guayacol y alcohol veratrílico.

La actividad de degradación de colorante se midió como sigue.

35

Se añadió peróxido de hidrógeno acuoso 0,2 a 0,4 mM a una solución mixta de 3 ml de tampón citrato 25 mM (ajustado al pH óptimo para la degradación de cada uno de los colorantes) conteniendo cada colorante un pH establecido (30 a 120 ppm) y 1 ml de solución de DyP 1,86 nM, para iniciar la reacción enzimática. La reacción se realizó a 30°C durante un período de tiempo establecido, para analizar la velocidad de reacción.

40

Se definió 1 U de actividad de degradación de colorante como la actividad para decolorar 1  $\mu$ mol de azul reactivo 5 o AQ-2 durante 1 minuto. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 280 197 T3

TABLA 1

*Actividad DyP de degradación de colorante y compuesto modelo*

Indice de color	Cromógeno	$\lambda$ max	pH opt.	Concentración inicial (ppm)	Actividad decolorante (ppm/min)
Azul reactivo 5	AQ	600	3,2	100	19,8
Azul reactivo 19	AQ	590	3,2	70	13,1
Azul reactivo 114	AQ	620	4,0	100	7,8
AQ-1	AQ	600	3,2	60	5,4
AQ-2	AQ	635	3,0	50	19,5
Negro reactivo 5	AZ	598	3,2	30	0,1
Rojo reactivo 33	AZ	500	3,2	50	0,4
Amarillo reactivo 2	AZ	390	3,2	100	0,5
Azul reactivo 182	AZ	610	4,0	120	20,9

En cuanto al 2,6-dimetoxifenol utilizado como compuesto modelo, alternativamente, se midió colorimétricamente la absorbancia a 470 nm, que emerge vía oxidación.

Es decir, se hizo reaccionar una solución mixta de DyP 2,79 nM y 2,6-dimetoxifenol 0,2 mM con tampón citrato 25 mM (pH 4,5) conteniendo peróxido de hidrógeno 0,2 mM.

En cuanto al guayacol, se utilizó guayacol 1 mM en lugar de 2,6-dimetoxifenol 0,2 mM, para la medición de la absorbancia a 465 nm.

Los resultados sobre los compuestos modelo se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

*Actividad DyP de degradación de compuestos modelo*

Compuesto	Grupo	pH	Concentración inicial (mM)	Velocidad de oxidación ( $\Delta$ DO/min)
2,6-dimetoxifenol	fenólico	4,5	0,2	0,29
Guayacol	fenólico	4,0	1,0	0,29
Alcohol veratrílico	no fenólico	-	0,5	ND

## ES 2 280 197 T3

Los resultados de la Tabla 1 indican los descritos más abajo.

La enzima DyP de degradación de colorante ejerce una elevada actividad para degradar los pigmentos de tipo antraquinona. Específicamente, la enzima ejerce una excelente actividad de degradación sobre el Azul reactivo 5, el azul reactivo 19 y la AQ-2, de manera que la enzima puede degradar eficazmente estos pigmentos.

Adicionalmente, la enzima ejerce una actividad de degradación de los pigmentos de tipo azo. La enzima degradaba eficazmente el Azul reactivo 182, en particular. La enzima tiene la capacidad de degradar otros pigmentos de tipo azo, Negro reactivo 5, Rojo reactivo 33 y Amarillo reactivo 2.

Esto demuestra claramente que la DyP tiene una acción de degradación de los pigmentos de tipo antraquinona y de los pigmentos de tipo azo.

Alternativamente, la actividad de la DyP sobre los compuestos modelo es la siguiente, basándose en los resultados de la Tabla 2.

Primero, el 2,6-dimetoxifenol y el guayacol que tienen grupos hidroxilo fenólicos podían ser degradados eficazmente por la DyP. Alternativamente, la DyP no podía degradar nunca el alcohol veratrílico conocido como sustrato de la lignino-peroxidasa.

Esto indica claramente que la DyP tiene una actividad enzimática específicamente elevada sobre los compuestos que tienen grupos hidroxilo fenólicos.

### *Temperatura óptima de la enzima DyP de degradación de colorante*

La temperatura óptima de la DyP fue determinada examinando la actividad decolorante (degradación) del Azul reactivo 5 a una temperatura establecida. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

La Fig. 3 indica que la DyP ejerce una elevada actividad peroxidasa en el intervalo de 20 a 35°C, y también indica que la temperatura óptima es de 30°C.

### Ejemplo 2

#### *Efecto de los iones metálicos sobre la actividad de la enzima DyP de degradación de colorante*

Iones calcio, cinc, cobre (divalente), potasio, hierro (divalente) y sodio cada uno 5 mM se encontraban concurrentemente presentes en una solución de reacción que comprendía DyP y 100 ppm de Azul reactivo 5, con el fin de examinar los efectos de estos iones metálicos sobre la actividad relativa de la enzima DyP.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

*Influencia de los cationes metálicos sobre la actividad de DyP para degradar tintes*

Ión metálico	Concentración (mM)	Actividad específica (%)
Sin adición	-	100
Ca <sup>++</sup>	5	81
Zn <sup>++</sup>	5	69
Cu <sup>++</sup>	5	75
K <sup>+</sup>	5	81
Na <sup>+</sup>	5	81
Fe <sup>++</sup>	0,2	50

La Tabla 3 demuestra que la enzima mostraba una actividad relativa de aproximadamente el 80%, cuando se añadían iones, en comparación con el caso sin adición. Concretamente, el ión hierro divalente presente concurrentemente a 0,2 mM inhibía la actividad en un 50%.

## ES 2 280 197 T3

Esto indica que la presencia concurrente de los iones metálicos afecta adversamente a la actividad enzimática de DyP.

### Ejemplo 3

5

#### *Determinación del gen que codifica DyP y de la secuencia de aminoácidos del mismo*

##### *Determinación de la secuencia de aminoácidos parcial de la enzima DyP de degradación de colorante*

10 Según el método de Laemmli (Laemmli, U.K. Nature (Londres), 227, 680-685 (1970)), la cepa Dec 1 de *Geotrichum candidum* (FERM BP-7033) fue sometida a SDS-PAGE, para separar la DyP purificada.

15 Con posterioridad, la DyP fue sometida a electrotransferencia sobre una membrana de poli(fluoruro de vinilo) (abreviado a veces más adelante como PVDF) según el método de Towbin (Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Proc. Natl. Sci. USA, 76, 4350-4354 (1979)).

20 La membrana de PVDF fue tratada con Coomassie Brilliant Blue (CBB-250), a partir de la cual se cortó después solamente la membrana correspondiente a la porción de la banda coloreada de la DyP. Después la banda fue transferida a un tubo de ensayo de 1,5 ml. Se añadieron 50  $\mu$ l de metanol al tubo de ensayo, seguido de la adición de 200  $\mu$ l de tampón reductor (tampón, pH 8,5, conteniendo sal hidrócloruro de guanidina 8 M, tampón Tris 0,5 M, etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA-2Na) al 0,3% y acetonitrilo al 5%), para un sacudimiento gradual, del que se separó el tampón reductor.

25 Después, se añadieron 50  $\mu$ l de tampón reductor que contenía 1 mg de ditiotreitól a la proteína de la membrana de PVDF, que después se dejó a 25°C durante una hora. Después de eso la membrana de PVDF fue transferida a un vaso de precipitado cónico de 200 ml, seguido de enjuagado sucesivo individualmente con 100 ml de agua durante 5 minutos, 100 ml de acetonitrilo al 2% durante 5 minutos y 100 ml de SDS al 0,1% durante 5 minutos.

30 Después, la membrana de PVDF fue transferida a un tubo de ensayo nuevo de 1,5 ml, seguido de la adición de 500  $\mu$ l de polivinilpirrolidona PVP-40 (abreviado a veces más adelante como PVP-40) que contenía 1 mg de metionina según el método de Iwamatsu (Iwamatsu, A. Electrophoresis, 13, 142-147 (1992)), y la mezcla resultante se dejó estar a la temperatura ambiente durante 30 minutos.

35 Después de enjuagar adicionalmente la membrana de PVDF con 100 ml de solución de acetonitrilo al 10%, ésta se enjuagó tres veces con 500  $\mu$ l de tampón de degradación (bicarbonato de amonio 100 mM, cloruro de calcio 10 mM, pH 7,8). Después las soluciones enjuagadas se descartaron. Continuamente, se añadieron 500  $\mu$ l del mismo tampón de degradación excepto que contenía 1 pmol de tripsina, y después se llevó a cabo la reacción enzimática a 25°C durante 12 horas.

40 Después el oligopéptido eluido de la membrana de PVDF a la solución de reacción se liofilizó, el oligopéptido liofilizado se disolvió después en 100  $\mu$ l de tampón de degradación, seguido de elución en un gradiente lineal de 0-50% (100 minutos, 0,8 ml/min) de alcohol isopropílico-acetonitrilo (7:3 v/v) que contenía ácido trifluoroacético al 0,02% mediante HPLC (columna: Capcell-Pak C-18, 4,6 x 150 mm), para fraccionar las fracciones individuales.

45

Se determinaron las estructuras de los péptidos parcialmente degradados fraccionados y purificados con un sistema de secuenciación de proteínas (Shimadzu, PPSQ-21).

##### *Preparación de una genoteca de ADNc*

50

Para el propósito de la extracción de ARN, se sometió el caldo de cultivo de la cepa Dec 1 de *Geotrichum candidum* a centrifugación, para separar 25 ml de hifas de la cepa. Esto se colocó en un tubo de centrifuga, seguido de adición de nitrógeno líquido para congelar las hifas, y después se liofilizó durante 12 horas para recuperar un polvo.

55 Sobre el polvo resultante de las hifas se vertió de nuevo nitrógeno líquido, para pulverizar las hifas, a lo que se añadieron de nuevo 10 ml de una solución de guanidinio (que contenía isotiocianato de guanidinio, acetato de sodio 20 mM, pH 5,2, DTT 0,1 mM y N-lauroilsarcosina al 0,5%), para la homogeneización. Después esto se centrifugó (1.500 x g) para obtener el sobrenadante.

60 El ARN resultante se separó mediante el método de ultra-centrifugación con cloruro de cesio (Ullrich), seguido de fraccionamiento de ARN poli(A)<sup>+</sup> utilizando una columna de celulosa con oligo(dT). El ARN poli(A)<sup>+</sup> resultante se utilizó para preparar sintéticamente ADNc con un kit de síntesis de ADNc (TaKaRa; Gulbler-Hoffman).

65 En el ADNc resultante se insertó un adaptador (*EcoRI-NotI-BamHI*), utilizando un kit de ligación de ADN. Ambos extremos ligados fueron fosforilados con polinucleótido quinasa de T4, para separar el ADNc mediante electroforesis en agarosa.

## ES 2 280 197 T3

Adicionalmente, el ADNc de 1.200 a 2.000 pb correspondiente al peso molecular de DyP se separó de los ADNc resultantes, al que después se añadieron 8  $\mu$ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA-2Na 1 mM) para hacer eluir el ADNc.

5 El fragmento de ADNc recuperado se ligó en el sitio *Eco*RI del fago  $\lambda$ . Este fue empaquetado en el fago  $\lambda$  con Gigapack Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla Calif., USA).

Después de que la cepa NM514 de *E. coli* fuera infectada con el fago lambda  $\lambda$ gt 10 a 37°C durante 15 minutos, la cepa infectada se superpuso en medio agar LB (bacto-triptona, extracto de levadura bacto al 0,5%, cloruro de sodio al 1%, agar al 1,5%/1.000 ml), utilizando agar al 0,7%. La placa se cultivo a 37°C durante 12 horas.

### *Secuenciación del gen codificador de la enzima DyP de degradación de colorante*

15 Las colonias que hibridaban con la sonda marcada preparada fueron escrutadas. Es decir, por medio de la hibridación en placa de las colonias, se seleccionaron con posterioridad 11 candidatos de la genoteca de ADNc positiva y los ADN se recuperaron mediante PCR.

Estos fueron ligados con el plásmido pUC18 vía ADN ligasa de T4, para la amplificación en la cepa JM109 de *E. coli*.

20 Debido a que DyP tiene un peso molecular de 60 kDa a un contenido de cadenas de azúcar del 17%, basándose en los resultados de la medición de las propiedades de DyP, se estima que la secuencia de aminoácidos primaria es de 49,8 kDa. Adicionalmente, se estima que el marco de lectura abierto del gen que codifica la DyP comprenderá 460 aminoácidos, a saber 1.380 pb.

25 Después, los genes codificadores de los 11 candidatos resultantes se utilizaron de nuevo para una PCR. Entre los ADNc insertados, se escrutó un gen de alrededor de 1.380 pb.

Por consiguiente, se obtuvo el clon 92 que portaba el ADNc de un tamaño de 1.600 pb.

30 Utilizando *Bam*HI, se escindió el ADNc fuera del plásmido recombinante, que después se insertó en pUC18. El plásmido resultante se denominó pB92.

35 Con posterioridad, se preparó el ADN plasmídico mediante el método de extracción con álcali. Ambas hebras resultantes se analizaron y secuenciaron mediante un secuenciador de ADN (Modelo 4000L, Li-Cor Inc., Lincoln, Neb., USA).

### *Expresión en un anfitrión de diferentes especies*

40 El marco de lectura abierto de pB92 recuperado de este modo comprende 1.494 pb, esto es 498 aminoácidos (ver SEQ ID NO. 7 de la lista de secuencias). De este modo, el peso molecular estimado a partir del número de aminoácidos era de 53.306. Esto indica que pB92 porta el gen DyP.

45 Además, pB92 fue transfectado en *E. coli*. El transformante fue consignado en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, the Ministry of International Trade and Industry, 1-1-3, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón. El número de acceso era FERM BP-7032. El transformante fue cultivado en medio de cultivo L (extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5%, triptona al 1,0%), y cosechado y desorganizado, para confirmar la actividad DyP.

### *Comparación con otras secuencias de peroxidasa*

50 Se llevó a cabo el escrutinio de la homología del gen DyP, utilizando tres tipos de bases de datos (Genebank, EMBL, DDBJ). Por consiguiente, se escrutó la peroxidasa derivada de U77073 (*Polyporaceae sp.*) registrada en Genebank, que era un gen homólogo a DyP. Después, se examinó la homología entre las dos. Cuando se examinaron las regiones con una elevada homología, la región de la posición 407 a la posición 438 tenía una homología máxima del 88%, mientras la región de la posición 62 a la posición 85 era homóloga en un 83%. Para la secuencia completa del gen, solamente se observaba una homología del 56%. Adicionalmente, nunca se encontró una peroxidasa con una elevada homología, excepto la peroxidasa derivada de *Polyporaceae sp.*

### *Comparación con otras peroxidases derivadas de hongos*

60 Las peroxidases microbianas se clasifican en peroxidases del tipo de planta. Las peroxidases del tipo de planta son clasificadas sistemáticamente en tres clases por Welinder *et al.* (Welinder, Curr. Opin. Struct. Biol., 2, 388-393 (1992)). Según la clasificación, las peroxidases de los organismos procarióticos o las mitocondrias de eucariotas se clasifican en la Clase I, mientras las peroxidases fúngicas se clasifican en la Clase II y las peroxidases derivadas de plantas superiores se clasifican en la Clase III.

65 La clasificación de Welinder *et al.* se basa en la comparación de las secuencias altamente comunes de la secuencia primaria de cada peroxidasa. Con más detalle, la clasificación se pone en práctica comparando las secuencias pri-

marías entorno al resto His proximal al hierro heme y los restos His y Arg distales del hierro heme. Utilizando la tabla de comparación de la secuencia preparada por Welinder *et al.*, se comparó la secuencia de DyP (Fig. 4). En la presente memoria, la Fig. 4 incluye CCP (citocromo C peroxidasa derivada de *Saccharomyces cerevisiae*) y ECP (peroxidasa derivada de *E. coli*) son peroxidasas de Clase I. La comparación se realizó con ARP (peroxidasa derivada de *Arthromyces ramosus*), MnP (peroxidasa mangánica derivada de un hongo del género *Phanerochaete*) y LiP (lignino-peroxidasa derivada de *Phanerochaete chrysosporium*) como peroxidasa de Clase II. Adicionalmente, la peroxidasa de Clase III incluye TP (peroxidasa de Tunip) y HRP (peroxidasa de rábano picante).

Debido a que la DyP deriva de un hongo, la DyP se clasifica en la Clase II. No obstante, se demostró que el resto Arg proximal (en la posición del cuadrado vacío (□) de la figura) encontrado característicamente en la Clase II estaba ausente y no se encontró homología con la secuencia en la proximidad del resto His distal (en la posición del círculo relleno (●) de la figura). Esto indica que la DyP como peroxidasa derivada de hongo tiene una secuencia específica.

### Aplicabilidad industrial

Según la invención, se describe la peroxidasa con una elevada actividad de degradación de una amplia gama de tipos de colorantes así como el método para degradar los tipos de colorantes utilizando las enzimas. Adicionalmente, la invención describe la información genética de la enzima para suministrar la enzima a gran escala basándose en la información. De este modo, la enzima puede ser aplicada al tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes y similares, en los campos de la industria de colorantes y similares.

Por consiguiente, la inmovilización de la enzima como enzima de degradación de colorantes puede originar la aplicabilidad industrial de la misma como biorreactor con una actividad superior.

## ES 2 280 197 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. El uso de una enzima peroxidasa derivada de *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM-BP-7033), que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:7, y que tiene las siguientes propiedades:

a) propiedad de degradar y decolorar colorantes;

b) un peso molecular de 60 kDa, mediante el análisis del peso molecular en el que se utiliza SDS-PAGE;

10 c) un peso molecular de 55 kDa, mediante el análisis de peso molecular en el que se utiliza la filtración en gel; y

d) pI (punto isoeléctrico) de 3,8, mediante el análisis por isoelectroenfoque, para degradar compuestos fenólicos.

15 2. El uso según la reivindicación 1, donde los compuestos fenólicos son guayacol y/o 2,6-dimetoxifenol.

20

25

30

35

40

45

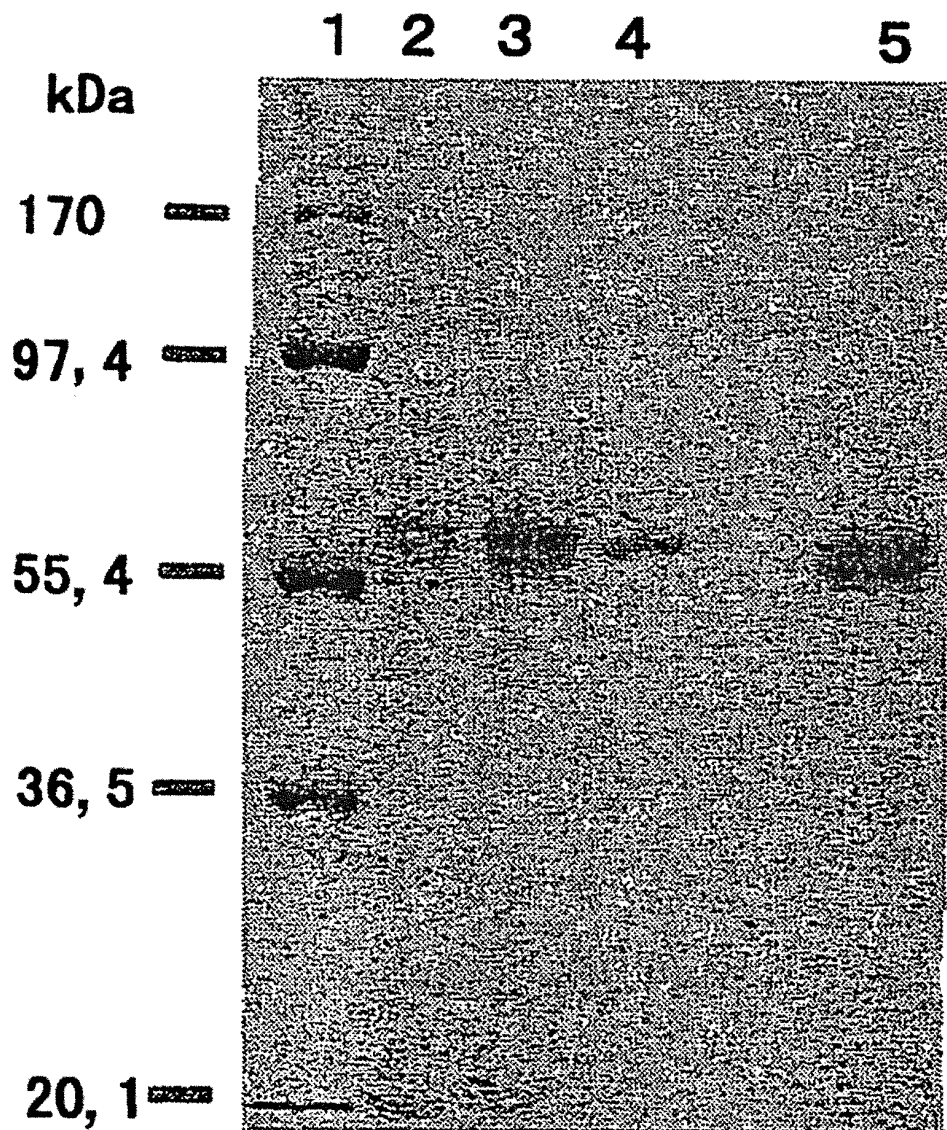
50

55

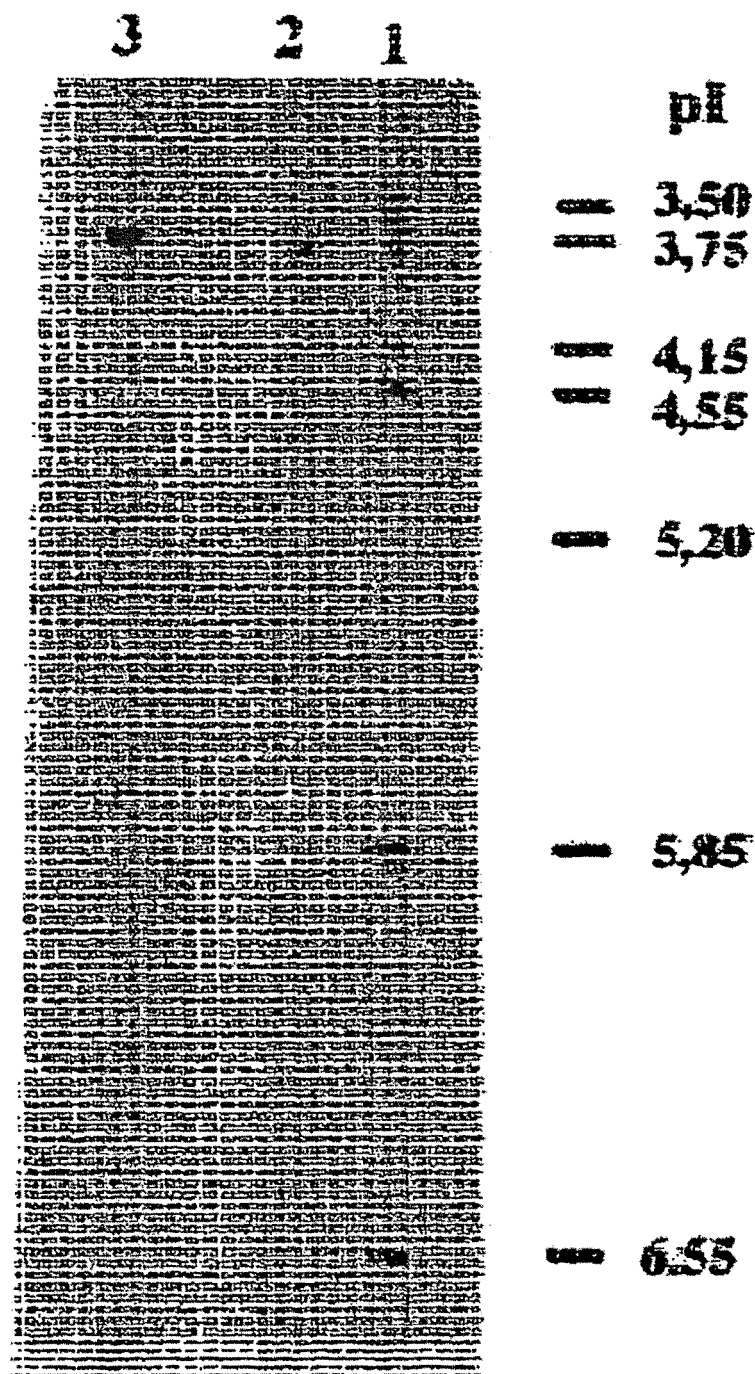
60

65

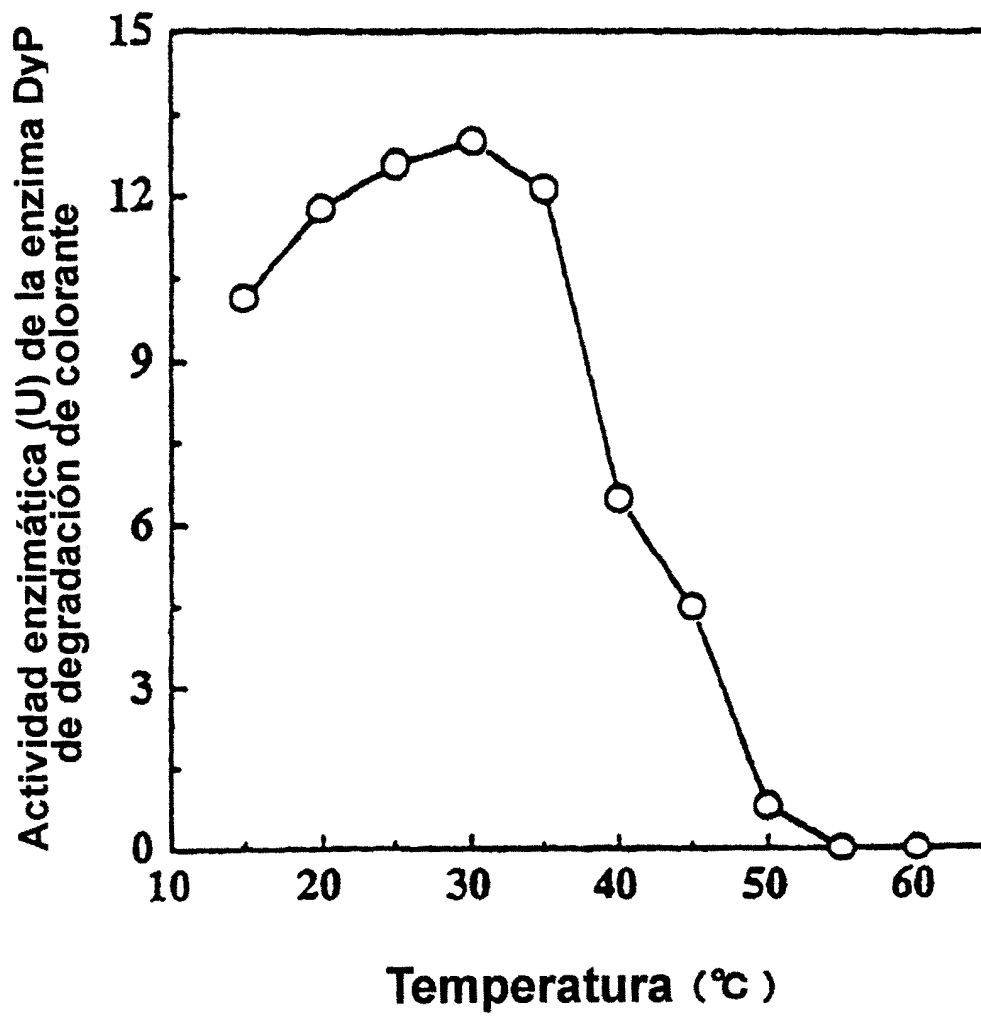
**FIG. 1**



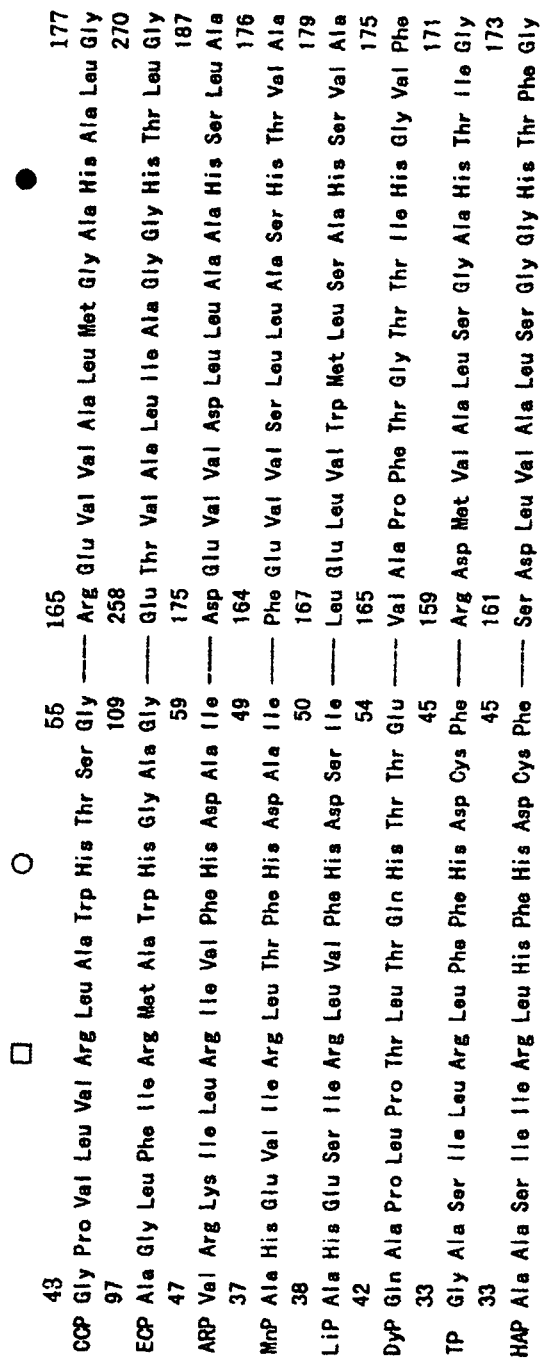
**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**



# ES 2 280 197 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> MEIJI SEIKA KAISHA LTD.
- 5 <120> NOVEL ENZYME WITH DECOLORIZING ACTIVITY AND METHOD FOR DECOLORIZING DYES  
BY USING THE SAME
- <130> Meiji Seika
- 10 <140> 00905340.5  
<141> 2000-02-25
- 15 <150> 11-50562  
<151> 1999-02-26
- <160> 8
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 25 <211> 6  
<212> PRT  
<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)
- 30 <400> 1
- Thr Tyr Val Pro Glu Arg  
1 5
- 35 <210> 2  
<211> 8  
<212> PRT
- 40 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)
- <400> 2
- 45 Cys Pro Phe Gly Ala His Val Arg  
1 5
- <210> 3  
<211> 21  
<212> PRT
- 50 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)
- <400> 3
- 55 Ile Pro Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Asp Ala Glu Leu Ala Ser Gly Val  
1 5 10 15  
Thr Ala Gln Asp Arg  
20
- 60 <210> 4  
<211> 21  
<212> PRT
- 65 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)

# ES 2 280 197 T3

<400> 4

5 Ser Gly Ala Pro Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ala Asp Asp Pro Ala Leu  
1 5 10 15  
Gly Ala Asp Pro Gln  
20

<210> 5

<211> 6

10 <212> PRT

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)

15 <400> 5

Pro Tyr Gly Pro Glu Thr  
1 5

20 <210> 6

<211> 6

<212> PRT

25 <213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)

<400> 6

30 Pro Thr Asp Asp Pro  
1 5

<210> 7

<211> 498

35 <212> PRT

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)

<400> 7

40 Met Arg Leu Ser Leu Phe Val Val Ser Val Ala Val Leu Val Gly Ser  
1 5 10 15

45 Ser Ser His Val Asn Ala Ala Lys Leu Gly Ala Arg Gln Thr Arg Thr  
20 25 30

50

55

60

65

ES 2 280 197 T3

Thr Pro Leu Leu Thr Asn Phe Pro Gly Gln Ala Pro Leu Pro Thr Leu  
 35 40 45  
 5 Thr Gln His Thr Thr Glu Ser Gly Ala Asn Asp Thr Ile Leu Pro Leu  
 50 55 60  
 10 Asn Asn Ile Gln Gly Asp Ile Leu Val Gly Met Lys Lys Gln Lys Glu  
 65 70 75 80  
 15 Arg Phe Val Phe Phe Gln Val Asn Asp Ala Thr Ser Phe Lys Thr Ala  
 85 90 95  
 20 Leu Lys Thr Tyr Val Pro Glu Arg Ile Thr Ser Ala Ala Ile Leu Ile  
 100 105 110  
 25 Ser Asp Pro Ser Gln Gln Pro Leu Ala Phe Val Asn Leu Gly Phe Ser  
 115 120 125  
 30 Asn Thr Gly Leu Gln Ala Leu Gly Ile Thr Asp Asp Leu Gly Asp Ala  
 130 135 140  
 35 Gln Phe Pro Asp Gly Gln Phe Ala Asp Ala Ala Asn Leu Gly Asp Asp  
 145 150 155 160  
 40 Leu Ser Gln Trp Val Ala Pro Phe Thr Gly Thr Thr Ile His Gly Val  
 165 170 175  
 45 Phe Leu Ile Gly Ser Asp Gln Asp Asp Phe Leu Asp Gln Phe Thr Asp  
 180 185 190  
 50 Asp Ile Ser Ser Thr Phe Gly Ser Ser Ile Thr Gln Val Gln Ala Leu  
 195 200 205  
 55 Ser Gly Ser Ala Arg Pro Gly Asp Gln Ala Gly His Glu His Phe Gly  
 210 215 220  
 60 Phe Leu Asp Gly Ile Ser Gln Pro Ser Val Thr Gly Trp Glu Thr Thr  
 225 230 235 240  
 65 Val Phe Pro Gly Gln Ala Val Val Pro Pro Gly Ile Ile Leu Thr Gly  
 245 250 255  
 70 Arg Asp Gly Asp Thr Gly Thr Arg Pro Ser Trp Ala Leu Asp Gly Ser  
 260 265 270  
 75 Phe Met Ala Phe Arg His Phe Gln Gln Lys Val Pro Glu Phe Asn Ala  
 275 280 285

ES 2 280 197 T3

Tyr Thr Leu Ala Asn Ala Ile Pro Ala Asn Ser Ala Gly Asn Leu Thr  
 290 295 300  
 5  
 Gln Gln Glu Gly Ala Glu Phe Leu Gly Ala Arg Met Phe Gly Arg Trp  
 305 310 315 320  
 10  
 Lys Ser Gly Ala Pro Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ala Asp Asp Pro Ala  
 325 330 335  
 15  
 Leu Gly Ala Asp Pro Gln Arg Asn Asn Asn Phe Asp Tyr Ser Asp Thr  
 340 345 350  
 20  
 Leu Thr Asp Glu Thr Arg Cys Pro Phe Gly Ala His Val Arg Lys Thr  
 355 360 365  
 25  
 Asn Pro Arg Gln Asp Leu Gly Gly Pro Val Asp Thr Phe His Ala Met  
 370 375 380  
 30  
 Arg Ser Ser Ile Pro Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Asp Ala Glu Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Gly Val Thr Ala Gln Asp Arg Gly Leu Leu Phe Val Glu Tyr Gln  
 405 410 415  
 35  
 Ser Ile Ile Gly Asn Gly Phe Arg Phe Gln Gln Ile Asn Trp Ala Asn  
 420 425 430  
 40  
 Asn Ala Asn Phe Pro Phe Ser Lys Pro Ile Thr Pro Gly Ile Glu Pro  
 435 440 445  
 Ile Ile Gly Gln Thr Thr Pro Arg Thr Val Gly Gly Leu Asp Pro Leu  
 450 455 460  
 45  
 Asn Gln Asn Glu Thr Phe Thr Val Pro Leu Phe Val Ile Pro Lys Gly  
 465 470 475 480  
 50  
 Gly Glu Tyr Phe Phe Leu Pro Ser Ile Ser Ala Leu Thr Ala Thr Ile  
 485 490 495  
 Ala Ala

<210> 8

<211> 1494

55 <212> DNA

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP-7033)

60

65

ES 2 280 197 T3

<400> 8

atgcgcttgt cgctgtttgt cgtgtcggtt gccgtactcg tcgggtcgag ctccatgtc 60  
 5 aatgctgcta aactcggcgc gagacagacg cgtacgacac ccctcctcac taattttccg 120  
 ggacaagccc cgctgccgac tctaacgcag catacgactg agagcggggc caacgataca 180  
 attctgcccc tgaacaacat acaaggcgac attttggtg gcatgaagaa acagaaggaa 240  
 cgcttcgtct tttccaagt caatgacgca acctcgttca agacggcgtt gaagacctac 300  
 gtgectgagc gcatcacgtc ggcgggcatt ttgatttcag atccttctca gcagccggtg 360  
 10 gctttcgtca acctcgggtt ttcgaacaca ggctccagc cgcttggat taccgacgat 420  
 ctgggtgatg cacaattccc agatggtcag ttcgcagacg ccgcaaacct cggggacgac 480  
 ctccagcaat ggggtggcgc ttttactggt accaccatcc atggtgtctt tctgattggt 540  
 agcgaccagg acgacttctt ggatcagttc acggatgata tctcttcgac ctttggttcc 600  
 15 tccatcactc aggtgcaggc gctcagtggt tctgcgcgtc caggagatca ggctggctcat 660  
 gaacacttcg ggttcctcga cggcatctcg cagccctcag tcacaggctg ggagaccgac 720  
 gtcttccctg gacaggcggg cgtcccacct ggaattatcc tccactggacg cgatggggac 780  
 acgggcaccc gaccgtcgtg ggtctatgat gggagtctca tggcattccg gcacttccag 840  
 20 cagaagggtc ccgaattcaa cgcgtacacg ctgcgcaacg cgataccgcg gaacagcgcg 900  
 ggaaacetca cccagcagga aggtgcagag ttctcggcgc cgdgcatggt cggccggttg 960  
 aagagcggcg cgccgattga cctcgcgcgc acggcgggacg acccagcgcg cggcgcggac 1020  
 ccgagagga acaacaattt cgattactca gacacgctga cggacgagac gcgctgcccc 1080  
 25 ttcggtgcac acgtgaggaa gacgaacctc cgacaggacc tgggtggacc ggtcgacacc 1140  
 ttccacgcta tgcggtccag tatcccgtac ggcccagaaa cgtctgatgc agaacttgcg 1200  
 tcgggcgtga ctgcgcaaga ccgcggtctt cttttcgtcg agtaccagtc cattattggt 1260  
 aatgggttca ggttccagca gattaactgg gcgaacaatg cgaacttccc tttctccaaa 1320  
 30 ccgatcacgc ctggaattga gcctatcatc ggccagacga ctccacgcac tgtcggcggg 1380  
 ctccagcccc tcaaccagaa tgagacgttc acagtaccgc tgtttgtgat cccgaagggc 1440  
 ggggaatact ttttcttgcg ctctatctct gcgctcactg cgactatcgc tgct 1494

35

40

45

50

55

60

65