



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0721285-2 A2



(22) Data de Depósito: 12/12/2007
(43) Data da Publicação: 25/03/2014
(RPI 2255)

(51) *Int.Cl.:*
D06P 5/13
D06P 5/15
C12N 9/42

(54) Título: MEDIADORES DE LACASE E MÉTODOS DE USO **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 18/12/2006 US 60/875,454,
18/12/2006 US 60/875,518

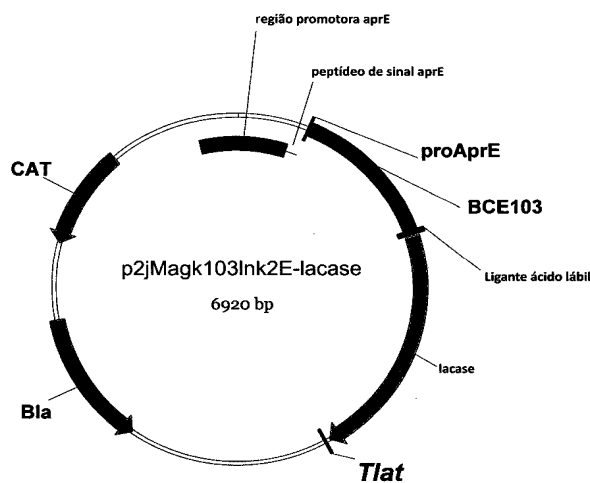
(73) Titular(es): Danisco US Inc., Genencor Division

(72) Inventor(es): Huaming Wang, Joseph C. Mcauliffe

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007025534 de
12/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/076323de
26/06/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MEDIADORES DE LACASE E MÉTODOS DE USO**".

Referência Cruzada Com Pedidos Relacionados

O presente pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisório Nº de Série U.S. 60/875.518, designado "Novel Laccases, Compositions and Methods of Use", depositado em 18 de Dezembro de 2006 e Pedido de Patente Provisório Nº de Série U.S. 60/875.454, designado "Laccase Mediators and Methods of Use", depositado em 18 de Dezembro de 2006.

10 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a mediadores de lacase hidroliticamente estáveis e a métodos enzimáticos para materiais de alveijamento.

Antecedente da Invenção

Lacases são enzimas que contém cobre que são conhecidas serem ótimos agentes oxidantes na presença de oxigênio. Lacases são encontradas em micróbios, fungos e organismos superiores. As enzimas lacase são usadas em muitas aplicações, que incluem alveijamento de polpa e tecidos, tratamento de resíduo de polpa, descoloração, remoção industrial de cor, detergentes para alveijamento de roupas, branqueadores dentais para higiene oral e como catalisadoras e facilitadoras para reações de polimerização e oxidação.

Lacases podem ser utilizadas em uma grande variedade de aplicações em várias indústrias, incluindo a indústria de detergente, a indústria de papel e polpa, a indústria têxtil e a indústria alimentícia. Em uma aplicação, enzimas que oxidam o fenol são usadas como um auxiliar na remoção de manchas, tais como manchas de alimentos, de roupas durante a lavagem com detergente.

A maioria das lacases exibe pH ótimo na faixa de pH ácido embora sejam inativas em pHs neutro ou alcalino.

30 Lacases são conhecidas por serem produzidas por uma grande variedade de fungos, incluindo espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Botrytis*, *Pleurotus*, *Fomes*, *Phlebia*, *Trametes*, *Polyporus*,

Stachybotrys, Rhizoctonia, Bipolaris, Curvularia, Amerosporium e Lentinus. Entretanto, permanece uma necessidade por lacases que têm perfis de desempenho diferentes em várias aplicações.

5 Para muitas aplicações, a eficiência de oxidação de uma lacase pode ser melhorada através do uso de um agente mediador, também conhecido como agente intensificador. Sistemas que incluem uma lacase e um mediador são conhecidos na técnica como sistemas lacase-mediador (LMS). Os mesmos compostos também podem ser usados para ativar ou iniciar a ação de lacase.

10 Existem vários mediadores conhecidos para uso em um sistema lacase-mediador. Esses incluem HBT (1-hidroxibenzotriazol), ABTS [ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfínico)], NHA (N-hidroxiacetanilida), NEIAA (N-acetil-N-fenilhidroxilamina), HBTO (3-hidróxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona) e VIO (ácido violúrico). Além disso, existem vários compostos
15 que contém NH-OH ou N-O que têm sido encontrados serem úteis como mediadores.

Grupos funcionais e substituintes têm grandes efeitos sobre a eficiência do mediador. Até dentro da mesma classe de compostos um substituinte pode alterar a especificidade da lacase frente ao substrato, dessa
20 forma aumentando ou diminuindo grandemente a eficiência do mediador. Além disso, um mediador pode ser eficiente para uma aplicação em particular, mas inadequado para outra aplicação. Outra desvantagem dos mediadores atuais e sua tendência a polimerizar durante o uso. Assim, há uma necessidade de descobrir mediadores eficientes para aplicações específicas.
25 Uma de tais aplicações é o alvejamento de tecidos, em que é importante que os mediadores não sejam desnecessariamente caros e perigosos. Outras aplicações para o sistema lacase-mediador são dadas abaixo.

Assim, há uma necessidade de identificar mediadores adicionais que ativem a lacase e/ou intensifiquem a atividade de enzimas que exibam
30 atividade de lacase.

Sumário da Invenção

Aqui são descritos novos mediadores de lacase, incluindo deri-

vados de 4-carboxamido e 4-ciano de 2,6-dimetoxifenol que exibem estabilidade melhorada e bom desempenho de alvejamento.

Em uma modalidade as novas enzimas lacase são empregadas em conjunto com derivados 4-substituídos de 2,6-dimetoxifenol dessa invenção para fornecer um método aperfeiçoado para o alvejamento de tecidos de
5 brim.

Descrição Resumida das Figuras

Figura 1 é um esquema do plasmídeo de expressão em *Bacillus* (p2JMagk1031nk2E-lacase) para o códon otimizado do gene D de lacase fundido com o gene que codifica BCE103 usado no Exemplo 1.
10

Figura 2 é um gráfico de barras que mostra os resultados do alvejamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia* sp. e uma variedade de mediadores em concentrações de 50 e 500 μ M.

Figura 3 é um gráfico de barras que mostra os resultados do alvejamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia*, *Myceliophthora* e *Cerrena* sp e uma variedade de mediadores em pH 5.
15

Figura 4 é um gráfico de barras que mostra os resultados do alvejamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia*, *Myceliophthora* e *Cerrena* sp e uma variedade de mediadores em pH 7.

Figura 5 é um gráfico de barras que mostra a diferença total de cor (E) de retalhos de brim (lado direito) tratadas com lacase de *C. unicolor* (20 ppm) e 3 mediadores em várias concentrações.
20

Figura 6 é um gráfico de barras que mostra a diferença total de cor (E) de retalhos de brim (lado do avesso) tratadas com lacase de *C. unicolor* (20 ppm) e 3 mediadores em várias concentrações.
25

Figura 7 é um gráfico de barras que mostra as diferenças totais de cor de discos de brim branqueados (lado direito) como uma função de combinações lacase/mediador usando lacase D de *C. unicolor*.

Figura 8 é um gráfico de barras que mostra as diferenças totais de cor de discos de brim branqueados (lado do avesso) como uma função de combinações lacase/mediador usando lacase D de *C. unicolor*.
30

Figura 9 é um gráfico da diferença total de cor para a lacase D

recombinante e o mediador siringamida como uma função da concentração do mediador e da concentração da enzima a 60°C e pH 6.

Figura 10 é um gráfico da diferença total de cor para a lacase D recombinante e o mediador siringonitrila como uma função da concentração do mediador e da concentração da enzima a 60°C e pH 6.

Descrição Detalhada da Invenção

Todos os termos técnicos e científicos usados aqui, a menos que definidos aqui de outra maneira, têm o mesmo significado como comumente compreendidos por aquele versado na técnica a qual essa invenção pertence. Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ED., John Wiley and Sons, New York (1994) e Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, N.Y. (1991) suprem o perito com um dicionário geral de muitos dos termos usados nessa invenção. Embora quaisquer métodos ou materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos estão descritos. Faixas numéricas incluem os números que definem a faixa. Deve ser compreendido que essa invenção não é limitada à metodologia, protocolos e reagentes particulares descritos, já que esses podem variar.

Os tópicos aqui fornecidos não são limitações dos vários aspectos ou modalidades da invenção que podem ser tidos pela referência à especificação como um todo.

Todas as publicações citadas aqui estão expressamente incorporadas aqui por referência com o propósito de descrever e divulgar composições e metodologias que poderão ser usadas em conexão com a invenção.

I. Lacase e Enzimas Relacionadas à Lacase

No contexto dessa invenção, lacases e enzimas relacionadas à lacase contemplam qualquer enzima lacase compreendida pela classificação de enzima (EC 1.10.3.2). As enzimas lacase são conhecidas a partir da origem microbiana e de planta. A enzima lacase microbiana pode ser derivada de bactérias ou fungos (incluindo fungos filamentosos e leveduras) e exemplos adequados incluem uma lacase derivável de uma cepa de *Aspergillus*,

Neurospora, por exemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Cerrena*, *Stachybotrys*, *Panus*, por exemplo, *Panus rudis*, *Theilava*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por exemplo, *T. villosa* e *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por exemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por exemplo, *C. plicatilis* e *C. cinereus*, *Psathyrella*, *Myceliophthora*, por exemplo, *M. thermonhila*, *Schytalidum*, *Phlebia*, por exemplo, *P. radita* (WO 92/01046), ou *Coriolus*, e.g. *C. hirsutus* (JP 2—238885), *Spongipellis* sp. *Polyporus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Ganoderma tsunodae* e *Trichoderma*.

A lacase ou a enzima relacionada à lacase pode adicionalmente ser produzida por um método que compreende cultivar uma célula hospedeira transformada com um vetor de DNA recombinante que carrega uma sequência de DNA que codifica a dita lacase assim como sequências de DNA que permitem a expressão da sequência da DNA que codifica a lacase, em um meio de cultura sob condições que permitem a expressão da enzima lacase e recuperar a lacase da cultura.

O vetor de expressão pode ser transformado em uma célula hospedeira adequada, tal como uma célula fúngica, cujos exemplos preferidos são espécies de *Aspergillus*, o mais preferivelmente *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* e espécies de *Fusarium*, o mais preferivelmente *Fusarium venenatum*. Células fúngicas podem ser transformadas por um processo que envolve formação de protoplasto e transformação dos protoplastos seguida pela regeneração da parede celular de uma maneira conhecida por si mesma. O uso de *Aspergillus* como um microrganismo hospedeiro está descrito em EP 238.023. O uso de *Fusarium* como um microrganismo hospedeiro está descrito em WO 96/00787 e WO 97/08325.

Alternativamente, o organismo hospedeiro pode ser uma bactéria, em particular cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* ou *E.coli*. A transformação de células bacterianas pode ser realizada de acordo com métodos convencionais, por exemplo, como descrito em T. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1982. O rastreamento apropriado de sequências de DNA e construção de vetores também podem ser realizados por procedimentos padronizados, cf. T. Maniatis

et al., op. cit.

O meio usado para cultivar as células hospedeiras transformadas pode ser qualquer meio convencional adequado para o crescimento da célula hospedeira em questão. A enzima expressa pode ser convenientemente secretada no meio de cultura e pode ser recuperada a partir dele por
 5 procedimentos bem conhecidos que incluem separar as células do meio de cultura pela centrifugação ou filtração, precipitação de componentes proteínicos do meio através de um sal tal como sulfato de amônia, seguida por procedimentos cromatográficos tais como cromatografia por troca de íon,
 10 cromatografia de afinidade ou similares.

Em uma modalidade, o hospedeiro de expressão pode ser um *Trichoderma reesei* com a região codificante de lacase sob o controle de um promotor e terminador CBH1. (Veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.861.271). O vetor de expressão pode ser pTrex3g, como descrito no Pedido de Patente U.S. Nº 11/245.628 depositado em 07 de Outubro de 2005
 15 (Protocolo Nº GC886).

Dessa maneira, os seguintes novos genes e lacases foram preparados:

A. Gene de lacase D1 de Cerrena da cepa CBS154.29 (SEQ ID Nº 13)

20	GATTCTAATA GACCAGGCAT ACCAAGAGAT CTACAGGTTG ACAGACCATT	50
	CTTCTAGGCG GCATTTATGC TGTAGCGTCA GAAATTATCT CTCCATTTGT	100
	ATCCCACAGG TCCTGTAATA ACACGGAGAC AGTCCAAACT GGGATGCCTT	150
	TTTTCTCAAC TATGGGCGCA CATAGTCTGG ACGATGGTAT ATAAGACGAT	200
	GGTATGAGAC CCATGAAGTC AGAACACTTT TGCTCTCTGA CATTTTCATGG	250
25	TTCACACTCT CGAGATGGGA TTGAACTCGG CTATTACATC GCTTGCTATC	300
	TTAGCTCTGT CAGTCGGAAG CTATGCTGCA ATTGGGCCCG TGGCCGACAT	350
	ACACATTGTC AACAAAGACC TTGCTCCAGA TGGCGTACAA CGTCCAACCG	400
	TGCTTGCCCG AGGCACTTTT CCTGGGACGT TGATCACCGG TCAGAAAGTA	450
	AGGGATATTA GTTTGGCGTCA AAGAGCCAAC CAAAAC TAAC CGTCCCGTAC	500
30	TATAGGGTGA CAACTTCCAG CTCAATGTCA TCGATGATCT TACCGACGAT	550
	CGGATGTTGA CGCCAAC TTCATTGTGAGC CTATTATTGT ATGATTTATC	600
	CGAATAGTTT CGCAGTCTGA TCATTGGATC TCTATCGCTA GCATTGGCAC	650

	GGTTTCTTCC	AGAAGGGAAC	CGCTTGGGCC	GACGGTCCCG	CCTTCGTAAC	700
	TCAGTGCCCT	ATAATAGCAG	ATAACTCTTT	TCTGTATGAC	TTCGACGTCC	750
	CAGACCAAGC	TGGTACTTTC	TGGTATCATA	GTCATCTATC	CACTCAGTAC	800
	TGTGACGGTT	TACGTGGTGC	CTTCGTTGTG	TACGATCCTA	ACGATCCTCA	850
5	CAAAGACCTA	TACGATGTTG	ATGACGGTGG	GTTCCAAATA	TTTGTCTGTC	900
	AGACATTGTA	TTGACGGTGT	TCATTATAAT	TTCAGAGAGC	ACCGTGATTA	950
	CCCTTGCGGA	TTGGTACCAT	GTTCTCGCCC	AGACCGTTGT	CGGCGCTGCG	1000
	TGAGTAACAC	ATACACGCGC	TCCGGCACAC	TGATACTAAT	TTTTTTTTAT	1050
	TGTAGCACTC	CTGATTCTAC	CTTGATCAAC	GGGTTAGGCC	GTTACAGAC	1100
10	CGGACCCGCT	GATGCTGAGC	TGGCTGTTAT	CAGCGTTGAA	CATAACAAAC	1150
	GGTATGTCAT	CTCTACCCAG	TATCTTCTCT	CCTGCTCTAA	TTGCTGTTT	1200
	CACCATAGAT	ACCGTTTCCG	TTTGGTPTCG	ATTTCTGTGG	ACCCCAACTT	1250
	TACCTTCTCC	GTTGATGGTC	ATAATATGAC	TGTCATCGAA	GTCGATGGTG	1300
	TCAACACACG	ACCCCTGACC	GTTGACTCTA	TTCAAATCTT	CGCCGGACAG	1350
15	AGGTATTCCT	TTGTCGTAAG	TTAATCGATA	TATTCTCCTT	ATTACCCCTG	1400
	TGTAATTGAT	GTCAATAGCT	CAATGCTAAC	CAACCCGAAG	ACAATTACTG	1450
	GATCCGTGCT	ATGCCAAACA	TCGGTAGAAA	TACAACAACA	CTGGACGGAA	1500
	AGAATGCCGC	TATCCTTCGA	TACAAGAATG	CTTCTGTAGA	AGAGCCCAAG	1550
	ACCGTTGGGG	GCCCCGCTCA	ATCCCCGTTG	AATGAAGCGG	ACCTGCGTCC	1600
20	ACTCGTACCT	GCTCCTGTGG	TATGTCTTGT	CGCGCTGTTC	CATCGCTATT	1650
	TCATATTAAC	GTTTTGTTTT	TGTCAAGCCT	GGAAACGCTG	TTCCAGGTGG	1700
	CGCAGACATC	AATCACAGGC	TTAACTTAAC	TTTCGTACGT	ACACCTGGTT	1750
	GAAACATTAT	ATTTCCAGTC	TAACCTCTCT	TGTAGAGTAA	CGGCCTCTTC	1800
	AGCATCAACA	ACGCCTCCTT	CACTaATCCT	TCGGTCCCCG	CCTTATTACA	1850
25	AATTCTGAGC	GGTGCTCAGA	ACGCTCAAGA	TTTACTTCCA	ACGGGTAGTT	1900
	ACATTGGCCT	TGAACTAGGC	AAGGTGTGG	AGCTCGTTAT	ACCTCCTCTG	1950
	GCAGTTGGAG	GACCGCACCC	TTTCCATCTT	CATGGCGTAA	GCATAACCACA	2000
	CTCCCGCAGC	CAGAATGACG	CAAACCTAATC	ATGATATGCA	GCACAATTC	2050
	TGGGTTCGTCC	GTAGTGCAGG	TAGCGATGAG	TATAACTTTG	ACGATGCTAT	2100
30	CCTCAGGGAC	GTCGTRAGCA	TTGGAGCGGG	GA CTGATGAA	GTCACAATCC	2150
	GTTTCGTGGT	ATGTCTCACC	CCTCGCATTT	TGAGACGCAA	GAGCTGATAT	2200
	ATTTTAACAT	AGACCGACAA	TCCGGGCCCG	TGGTTCCTCC	ATTGCCATAT	2250

TGATTGGCAT TTGGAGGCAG GCCTTGCCAT CGTCTTCGCT GAGGGCATCA 2300
 ATCAGACCCGC TGCAGCCAAC CCAACACCCC GTACGTGACA CTGAGGGTTT 2350
 CTTTATAGTG CTGGATTACT GAATCGAGAT TTCTCCACAG AAGCATGGGA 2400
 TGAGCTTTGC CCCAAATATA ACGGGTTGAG TCGGAGCCAG AAGGTCAAGC 2450
5 CTAAGAAAGG AACTGCTATT TAAACGTGGT CCTAGACTAC GGGCATATAA 2500
 GTATTCCGGT AGCGCGTGTG AGCAATGTTC CGATACACGT AGATTCATCA 2550
 CCGGACACGC TGGGACAATT TGTGTATAAT GGCTAGTAAC GTATCTGAGT 2600
 TCTGGTGTGT AGTTCAAAGA GACAGCCCTT CCTGAGACAG CCCTTCCTGA 2650
 GACAGCCCTT CCTGAGACGT GACCTCCGTA GTCTGCACAC GATACTYCTA 2700
10 AATACGTATG GCAAGATGAC AAAGAGGAGG ATGTGAGTTA CTACGAACAG 2750
 AAATAGTGCC CGGCCTCGGA GAGATGTTCT TGAATATGGG ACTGGGACCA 2800
 ACATCCGGA 2809

que codifica a enzima lacase D1, que tem a sequência de proteína traduzida (SEQ ID N° 14)

15 MGLNSAITSL AILALSVGSY AAIGPVADIH IVNKDLAPDG VQRPTVLAGG 50
 TFPGLITGQ KGNFQLNVI DDLTDDRMLT PTSIHWGFF QKGTAWADGP 100
 AFVTQCPIIA DNSFLYDFDV PDQAGTFWYH SHLSTQYCDG LRGAFVVYDP 150
 NDPHKDLYDV DDGGTVITLA DWYHVLAQTV VGAATPDSTL INGLGRSQTG 200
 PADAE LAVIS VEHNKRYRFR LVSISCDPNF TFSVDGHNMT VIEVDGVNTR 250
20 PLTVDSIQIF AGQRYSFVLN ANQPEDNYWI RAMPNIGRNT TTLDGKNAAI 300
 LRYKNASVEE PKTVGGPAQS PLNEADLRPL VPAPVPGNAV PGGADINHRL 350
 NLTFSNGLES INNASFTNPS VPALLQILSG AQNAQDLLPT GSYIGLELKG 400
 VVELVIPPLA VGGPHPFHLH GHNEWVVRSA GSDEYNFDDA ILRDVVSIGA 450
 GTDEVTIRFV TDNPGPWFLH CHIDWHLEAG LAIVFAEGIN QTAAANPTPQ 500
25 AWDELCPKYN GLSASQKVKP KKGTAI 526

B. Gene de lacase D2 de Cerrena da cepa CBS115.075 (SEQ ID N° 15)

GATCTGGACG ATGGTATATA AGACGATGGT ATGAGACCCA TGAAGTCTGA 50
 AACTTTTGC TCTCTGACAT TTCATGGTTC ATACTCTCGA GATGGGATTG 100
 AACTCGGCTA TTACATCGCT TGCTATCTTA GCTCTGTCAG TCGGAAGCTA 150
30 TGCTGCAATT GGGCCCCTGG CCGACATACA CATTGTCAAC AAAGACCTTG 200
 CTCCAGATGG TGTACAACGT CCAACCGTGC TCGCCGAGG CACTTTTCCT 250
 GGGACGTTGA TCACCGGTCA GAAAGTAAGG AATATTAGTT TCGGTCAAAG 300

	AGCCAACCAA AATTAACCGT CCCGTCCCAT AGGGTGACAA CTTCCAGCTC	350
	AATGTCATTG ATGATCTTAC CGACGATCGG ATGTTGACAC CAACTTCCAT	400
	TGTGAGCCTA TTATTGTATG ATTTATCCGT ATAGTTTCTC AGTCTGATCA	450
	TTGGCTCTCT ATCGCTAGCA TTGGCACGGT TTCTTCCAGA AGGGAACCGC	500
5	TTGGGCCGAC GGTCCCGCCT TCGTAACTCA GTGCCCTATA ATAGCAGATA	550
	ACTCTTTTCT GTATGACTTC GACGTCCCCG ACCAAGCTGG TACTTTCTGG	600
	TATCATAGTC ATCTATCCAC TCAGTACTGT GACGGTTTAC GTGGTGCCTT	650
	CGTTGTGTAC GATCCTAACG ATCCTCACAA AGACCTATAC GATGTTGATG	700
	ACGGTGGGTT CCAAATACTT GACCAAGAAA CATTATATTTG ATAGTATCCA	750
10	CTCTGATTTT CAGAGAGCAC CGTGATTACC CTTGCGGATT GGTACCATGT	800
	TCTCGCCCAG ACCGTTGTCG GCGCTGCGTG AGTAACACAT ACACGCGCTC	850
	CGGCACACTG ATACTAATTT TTTATTGTAG CACTCCTGAT TCTACCTTGA	900
	TCAACGGGTT AGGCCGTTCA CAGACCGGAC CCGCTGATGC TGAGCTGGCT	950
	GTTATCAGCG TTGAACATAA CAAACGGTAT GTCATCTCTA CCCATTATCT	1000
15	TCTCTCCTGC TTTAATTCGC TGTTTCACCA TAGATACCGA TTCCGTTTGG	1050
	TTTTCGATTC GTGCGACCCC AACTTTACCT TCTCCGTTGA TGGTCATAAT	1100
	ATGACTGTCA TCGAAGTCGA CGGTGTCAAC ACACGACCCC TGACCGTTGA	1150
	CTCTATTCAA ATCTTCGCCG GACAGAGGTA TTCCTTTGTC GTAAGTTAAT	1200
	CGATATATTC TCCCTATTAC CCCTGTGTAA TTGATGTCAA CAGCTCAATG	1250
20	CTAACCAACC CGACGACAAT TACTGGATCC GTGCTATGCC AAACATCGGT	1300
	AGAAATACAA CAACACTGGA CGGAAAGAAT GCCGCTATCC TTCGATACAA	1350
	GAATGCTTCT GTAGAAGAGC CCAAGACCGT TGGGGGCCCC GCTCAATCCC	1400
	CGTTGAATGA AGCGGACCTG CGTCCACTCG TACCTGCTCC TGTGGTATGT	1450
	CTTGTCGTGC TGTTCATCG CTATTTATA TTAACGTTTT GTTTTTGTCA	1500
25	AGCCTGGAAG CGCTGTTCCA GGTGGCGCAG ACATCAATCA CAGGCTTAAC	1550
	TTAACTTTTC TACGTACACC TGGTTGAAAC ATTATATTTT CAGTCTAACC	1600
	TCTTGTAGAG TAACGGCCTT TTCAGCATCA ACAACGCCTC CTTCACTAAT	1650
	CCTTCGGTCC CGGCCTTATT ACAAATCTG AGCGGTGCTC AGAACGCTCA	1700
	AGATTTACTT CCAACGGGTA GTTACATTGG CCTTGAAC TA GGCAAGGTTG	1750
30	TGGAGCTCGT TATACCTCCT CTGGCAGTTG GAGGACCGCA CCCTTTCCAT	1800
	CTTCATGGCG TAAGCATACC AACTCCCCG AGCCAGAATG ACGCAAAC TA	1850
	ATCATGATAT GCAGCACAAAT TTCTGGGTCG TCCGTAGTGC AGGTAGCGAT	1900

	GAGTATAACT TTGACGATGC TATCCTCAGG GACGTCGTGA GCATTGGAGC	1950
	GGGGACTGAT GAAGTCACAA TCCGTTTCGT GGTATGTCTC ACCCCTCGCA	2000
	TTTTGAGACG CAAGAGCTGA TATATTTTAA CATAGACCGA CAATCCGGGC	2050
	CCGTGGTTCC TCCATTGCCA TATTGATTGG CATTTGGAGG CAGGCCTTGC	2100
5	CATCGTCTTC GCTGAGGGCA TCAATCAGAC CGCTGCAGCC AACCCAACAC	2150
	CCCGTACGTG ACACTGAGGG TTTCTTTATA GTGCTGGATT ACTGAATCGA	2200
	GATTTCTCCA CAGAAGCATG GGATGAGCTT TGCCCCAAAT ATAACGGGTT	2250
	GAGTGCGAGC CAGAAGGTCA AGCCTAAGAA AGGAACTGCT ATTTAAACG	2299

que codifica a enzima lacase D2, que tem a sequência da proteína traduzida
 10 (SEQ ID Nº 16)

	MGLNSAITSL AILALSVGSY AAIGPVADIH IVNKDLAPDG VQRPTVLAGG	50
	TFPGLITGQ KGDNFQLNVI DDLTDDRMLT PTSIHWHGFF QKGTAWADGP	100
	AFVTQCPIIA DNSFLYDFDV PDQAGTFWYH SHLSTQYCDG LRGAFFVYDP	150
	NDPHKDLYDV DDGGTVITLA DWYHVLAQTV VGAATPDSTL INGLGRSQTG	200
15	PADAE LAVIS VEHNKRYRFR LVSISCDPNF TFSVDGHNMT VIEVDGVNTR	250
	PLTVDSIQIF AGQRYSEVLN ANQPDDNYWI RAMPNIGRNT TTLDGKNAAI	300
	LRYKNASVEE PKTVGGPAQS PLNEADLRPL VPAPVPGNAV PGGADINHRL	350
	NLTFSNGLFS INNASFTNPS VPALLQILSG AQNAQDLLPT GSYIGLELGK	400
	VVELVIPPLA VGGPHPFHLH GHNFVVVRSR GSDEYNFDDA ILRDVVSIGA	450
20	GTDEVTIRFV TDNPGPWFLH CHIDWHLEAG LAIVFAEGIN QTAAANPTPQ	500
	AWDELCPKYN GLSASQKVKP KKGTAI 526	

A expressão "% de identidade" refere-se aqui ao nível de identi-
 dade de sequência de ácido nucléico ou aminoácidos entre a sequência de
 ácido nucléico que codifica a lacase descrita aqui ou a sequência de amino-
 25 ácidos da lacase, quando alinhadas usando um programa de alinhamento de
 sequência.

Por exemplo, como usado aqui, 80% de identidade de sequência
 é determinado por um algoritmo e, conseqüentemente, um homólogo de
 uma dada sequência tem mais do que 80% de identidade de sequência so-
 30 bre a extensão da sequência dada. Níveis exemplares de identidade de se-
 quência incluem, mas não são limitados a 80, 85, 90, 95, 98% ou mais de
 identidade de sequência com uma dada sequência, por exemplo, a sequên-

cia codificante de uma lacase, como aqui descrito.

Programas de computador exemplares que podem ser usados para determinar a identidade entre duas sequências incluem, mas não são limitados ao grupo de programas BLAST, por exemplo, BLASTN, BLASTX e
5 TBLASTX, BLASTP e TBLASTN, disponíveis publicamente na Internet em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Veja também, Altschul, *et al.*, 1990 e Altschul, *et al.*, 1997.

Pesquisas de sequências são tipicamente realizadas usando o programa BLASTN quando se avalia uma dada sequência de ácido nucleico
10 em relação à sequências de ácido nucleico no GenBank DNA Sequences e outros bancos de dados públicos. O programa BLASTX é preferido para pesquisar sequências de ácido nucleico que tenham sido traduzidas em todas as fases de leitura contra sequências de aminoácidos do GenBank Protein Sequences e outros bancos de dados públicos. Ambos, BLASTN e
15 BLASTX, são executados usando parâmetros de *default* de um *open gap penalty* de 11,0 e um *extended gap penalty* de 1,0 e utilizam a matriz BLOSUM-62. (Veja, por exemplo, Altschul, *et al.*, 1997).

Um alinhamento de sequências selecionadas a fim de determinar o "% de identidade" entre duas ou mais sequências pode ser realizado
20 usando, por exemplo, o programa CLUSTAL-W na versão MacVector 6.5, operado com parâmetros de *default*, que incluem um espaço aberto "*open gap penalty*" de 10,0, um espaço estendido "*extended gap penalt*" de 0,1 e uma matriz de similaridade BLOSUM 30.

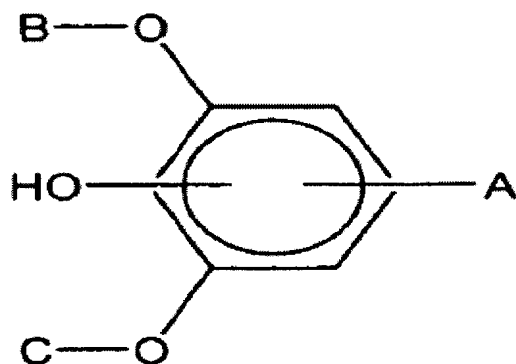
II. Mediadores

25 Em uma modalidade, o sistema de oxidação enzimática compreende ainda um ou mais agentes mediadores químicos que intensificam a atividade da enzima lacase. A expressão "mediador químico" (ou "mediador" pode ser usado alternativamente aqui) é aqui definida como um composto químico que age como um mediador redox para efetivamente transferir elétrons entre a enzima que exibe atividade de oxidase e o corante. Mediadores
30 químicos também são conhecidos como intensificadores e aceleradores na técnica.

O mediador químico pode ser um composto fenólico, por exemplo, siringato de metila e compostos relacionados, como descrito em WO 95/01426 e 96/12845. O mediador químico pode ser também um composto de N-hidróxi, um composto de N-oxima ou um composto de N-óxido, por exemplo, N-hidroxibenzotriazol, ácido volúrico ou N-hidroxiacetanilida. O mediador químico também pode ser um composto de fenoxazina/fenotiazina, por exemplo, fenotiazina-10-propionato. O mediador químico pode ser ainda o ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS). Outros mediadores químicos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os compostos descritos em WO 95/01246 são conhecidos por intensificar a atividade de uma lacase. Em modalidades particulares, o mediador pode ser acetosiringona, siringato de metila, siringato de etila, siringato de propila, siringato de butila, siringato de hexila ou siringato de octila.

Preferivelmente, o mediador é 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol ou um derivado *N*-substituído desses tais como, por exemplo, 4-(*N*-metil carboxamido)- 2,6-dimetoxifenol, 4-[*N*-(2-hidroxietil)carboxamido]- 2,6-dimetoxifenol ou 4-[*N,N*-dimetil-carboxamido]- 2,6-dimetoxifenol.

O mediador usado na presente invenção pode ser descrito pela seguinte fórmula:



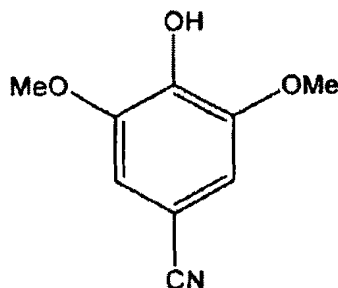
em cuja fórmula A é um grupo tal como -R, -D, -CH=CH-D, -CH=CH-CH=CH-D, -CH=N-D, -N=N-D ou -N=CH-D, no qual D é selecionado do grupo que consiste em -CO-E, -SO₂-E, -CN, -NXY e N⁺XYZ, no qual E pode ser -H, -OH, -R, -OR ou -NXY e X, Y e Z podem ser idênticos ou diferentes e selecionados entre -H, -OH, e -R; R sendo C₁-C₁₆ alquila, preferivelmente

C_1 - C_8 alquila, cuja alquila pode ser saturada ou insaturada, ramificada ou não-ramificada e opcionalmente substituída por um grupo carbóxi, sulfo ou amino; e B e C podem ser iguais ou diferentes e seleccionados a partir de C_mH_{2m+1} ; $1 \leq m \leq 5$.

- 5 Em uma modalidade, A na fórmula acima mencionada é $-CN$ ou $-CO-E$, em que E pode ser $-H$, $-OH$, $-R$ ou $-NXY$, onde X e Y podem ser idênticos ou diferentes e seleccionados a partir de $-H$, $-OH$, $-OR$ e $-R$, sendo R um C_1 - C_{16} alquila, preferivelmente C_1 - C_8 alquila, cuja alquila pode ser saturada ou insaturada, ramificada ou não-ramificada e opcionalmente substituída por um grupo carbóxi, sulfo ou amino; e B e C podem ser iguais ou diferentes e seleccionados a partir de C_mH_{2m+1} ; $1 \leq m \leq 5$.

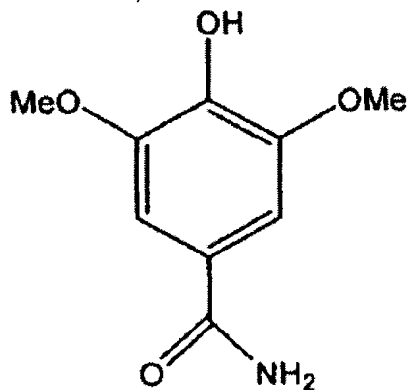
No acima mencionado, a fórmula A pode ser colocada meta ao grupo hidróxi ao invés de ser colocada na posição para como mostrado.

Em uma modalidade, o mediador é



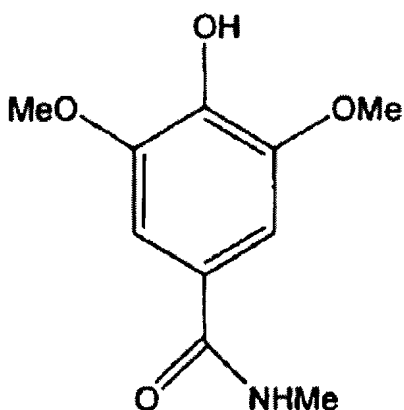
4-Ciano-2.6-dimetoxifenol

- 15 Em uma modalidade, o mediador é

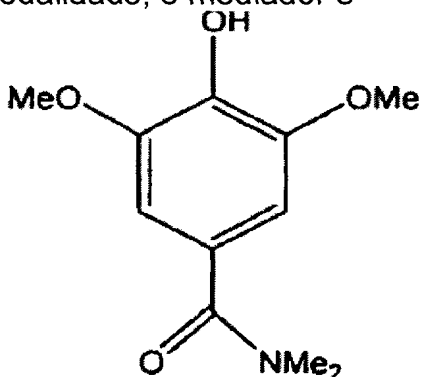


4-Ciano-2.6-dimetoxifenol

Em uma modalidade, o mediador é

4-(*N*-metil carboxamido)-2,6-dimetoxifenol

Em uma modalidade, o mediador é

4-(*N,N*-dimetil carboxamido)-2,6-dimetoxifenol

Em modalidades particulares, o mediador pode ser acetosiringona, siringato de metila, siringato de etila, siringato de propila, siringato de butila, siringato de hexila ou siringato de octila. Preferivelmente, o mediador é 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol ou um derivado *N*-substituído desses tais como 4-(*N*-metil carboxamido)-2,6-dimetoxifenol, 4-[*N*-(2-hidroxietil)carboxamido]-2,6-dimetoxifenol ou 4-[*N,N*-dimetil-carboxamido]-2,6-dimetoxifenol ou combinações desses.

O mediador da invenção pode estar presente em concentrações entre 0,005 a 1000 μmols por grama de brim, preferivelmente 0,05 a 500 μmols por grama de brim, mais preferivelmente 0,5 a 100 μmols por grama de brim.

Os mediadores podem ser preparados por métodos conhecidos pelo versado na técnica, tais como aqueles descritos em WO 97/11217, WO 96/12845 e US 5752980.

III- Utilidade

As aplicações industriais de lacases incluem o alvejamento de polpa e papel e alvejamento de têxtil, por exemplo, tecidos de brim tingidos com índigo. Lacases também foram descobertas serem úteis para a coloração de cabelo (veja, por exemplo, WO 95/33836 e WO 95/33837). A Patente Européia Nº 0504005 descreve que lacases podem ser usadas para a coloração de lã.

As lacases aqui descritas encontram uso na coloração e alvejamento de têxteis, fibras, fios e similares. As lacases também encontram uso no tratamento de efluentes, a deslignificação de polpa, a despolimerização de agregados de alto peso molecular, descoloração de resíduo de papel, a polimerização de compostos aromáticos, reações de polimerização mediada por radical e reticulação (por exemplo, tintas, revestimentos, biomateriais), e a ativação de corantes e para acoplar compostos orgânicos. As lacases podem ser usadas em composição para limpeza ou componente dessa ou em um detergente.

Como aqui descrito, as lacases são capazes de oxidar uma grande variedade de compostos coloridos que têm estruturas químicas diferentes, usando o oxigênio como acceptor de elétron. Conseqüentemente, as lacases aqui apresentadas podem ser usadas em aplicações onde é desejável modificara cor associada aos compostos coloridos, tal como na limpeza, por exemplo, para remoção de manchas de alimentos sobre o tecido. Em certas situações, um mediador ou intensificador pode ser usado para se obter os efeitos desejados.

As lacases aqui apresentadas podem ser usadas no campo dos têxteis. Por exemplo, as lacases aqui descritas podem ser usadas no tratamento, processamento, finalização, polimento ou produção de fibras ou outros artigos de manufaturação. As enzimas podem ser úteis, por exemplo, no tratamento de brim (processos de desenvolvimento de alvejamento); na descoloração de resíduo de índigo; no tingimento de tecido; em processos de alvejamento de têxtil; na modificação de fibra; na obtenção de propriedades aprimoradas de fibra ou tecido; etc.

As lacases aqui descritas podem ser usadas na indústria do cou-

ro. Por exemplo, as lacases podem ser usadas no processamento de peles de animais incluindo, mas não limitado à depilação, caleiro, descalcinação e/ou curtimento de peles.

5 Também é descrito aqui um processo para remoção de lignina de material que contém lignocelulose, o alvejamento de material que contém lignocelulose (isto é, a descoloração enzimática de papel reciclado) e/ou o tratamento de efluentes que surgem a partir da produção de papel ou celulo-
se. O processo usa enzimas lacase obtidas de *Cerrena sp.*, ao mesmo tem-
10 po adicionando ou medindo em agentes redox não-aromáticos mais compos-
tos redox aromáticos fenólicos e/ou não-fenólicos, as unidades fenólicas e
não-fenólicas da lignina sendo tanto oxidadas diretamente pela ação desses
compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos quanto à lignina sendo oxi-
dada por outros compostos fenólicos e/ou não-fenólicos produzidos pela a-
ção oxidante desses compostos.

15 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de polpa e papel. Por exemplo, as lacases podem ser usadas na produção de polpas de papel e polpas em pasta a partir de materiais brutos tais como madeira, bambu e palha de cereal; produção de papel e papelão para impressão e escrita, embalagem, higiene e outros usos técnicos; reciclagem de fibra de
20 celulose com o propósito de fazer papel e papelão; e o tratamento de produ-
tos residuais gerados por e tratados em moinhos de polpa ou papel e outras
instalações dedicadas à manufatura de papel, polpa ou pasta. As enzimas
aqui apresentadas podem ser úteis, por exemplo, no processamento da ma-
deira; no alvejamento da polpa; na modificação de fibra de madeira; adesivo
25 tecidual (ativação de lignina) para produção de MDF; para papel com propri-
edades melhoradas; na remoção de tinta; no tingimento de papel; em adesi-
vos (por exemplo, cola baseada em lignina para partículas ou fibras de pape-
lão), etc.

30 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de ração. Por exemplo, as lacases apresentadas aqui podem ser usadas como aditivo para ração sozinhas ou como parte de um aditivo para ração com o objetivo de aumentar o valor nutricional da ração para quaisquer tipos de animais tais

como frangos, vacas, porcos, peixes e animais de estimação; e/ou como um auxiliar de processamento para processar subprodutos de materiais de planta e da indústria alimentícia com o objetivo de produzir materiais/produtos adequados como materiais brutos para ração.

5 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor da limpeza de lentes de contato. Por exemplo, as lacases podem ser usadas na limpeza, armazenamento, desinfecção e/ou conservação de lentes de contato.

 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de amido. Por exemplo, as lacases podem ser usadas no processamento de um sub-
10 trato que inclui amido e/ou grão para xarope de glicose (dextrose), xarope de frutose ou qualquer outro xarope, álcool (uso doméstico ou combustível) ou açúcar. Tal processamento de amido pode incluir etapas de processamento tais como liquefação, sacarificação, isomerização e desramificação de um substrato.

15 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor da alimentação. Por exemplo, as lacases podem ser usadas na preparação, no processamento ou como um ingrediente ativo em alimentos tais como gordura amarela, bebidas baseadas em chá, produtos culinários, para panificação e alimentos congelados para consumo humano. As lacases podem ser usa-
20 das, por exemplo, como beneficiadoras para pão, na conservação de alimento, como sequestrante de oxigênio, etc.

 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de higiene pessoal. Por exemplo, as lacases podem ser usadas na preparação de produtos para cuidados pessoais para humanos tais como fragrâncias e produ-
25 tos para higiene da pele, higiene oral, para o banho e desodorante e/ou anti-transpirantes para humanos. As enzimas aqui apresentadas podem ser úteis, por exemplo, no tingimento e/ou clareamento de cabelo, tingimento e/ou clareamento de unhas; tingimento e/ou clareamento de pele; modificação de superfície (por exemplo, como agente de acoplamento); como um agente
30 antimicrobiano; na remoção de odor; clareamento de dentes; etc.

 As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de limpeza. Por exemplo, as lacases podem ser usadas na limpeza, tratamento ou

higiene de itens de lavanderia tais como roupas e tecido; na limpeza de superfícies domésticas difíceis; na lavagem de louça, incluindo aplicações em máquina de lavar louça; e em sabões em barra e líquidos e/ou tensoativos sintéticos em barra ou líquidos. As enzimas aqui apresentadas podem ser
5 úteis, por exemplo, na remoção/descoloração de mancha e/ou na remoção de odores e/ou desinfecção, etc.

As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de tratamento de efluentes. Por exemplo, as lacases podem ser usadas na descoloração de compostos coloridos; na purificação de componentes fenólicos;
10 para atividade antimicrobiana (por exemplo, na reciclagem de água); na biorremediação; etc.

As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de biomateriais. Por exemplo, as lacases podem ser usadas como biocatalisadoras para várias reações orgânicas; e/ou em conjunto com biopolímeros; em conjunto com empacotamento; em conjunto com adesivos; na modificação de
15 superfície (agente de ativação e acoplamento); na produção de alcoóis primários; em conjunto com biosensores e/ou sínteses orgânicas; etc.

As lacases aqui descritas podem ser usadas no setor de antimicrobianos. Por exemplo, as lacases podem ser usadas como um agente antimicrobiano em composições de limpeza ou para reduzir ou eliminar a carga
20 microbiana de vários alimentos (por exemplo, carne) ou ração.

Os mediadores de lacase podem ser usados como agentes de desinfecção e antimicrobiano (por exemplo, proteção de madeiras, detergente). Os mediadores podem ser usados independentemente ou em conjunto com as enzi-
25 mas.

Como usado aqui, "composições de limpeza" e "formulações de limpeza" referem-se a composições que encontram uso na remoção de compostos indesejados de itens a ser limpos, tais como tecido, etc. O termo abrange quaisquer materiais/compostos selecionados para o tipo particular
30 de composição de limpeza desejada e a forma do produto (por exemplo, líquido, gel, grânulo ou composição em spray, desde que a composição seja compatível com a lacase e outra(s) enzimas(s) usadas na composição. A

seleção específica de materiais de composição de limpeza pode ser prontamente feita pela consideração da superfície, item ou tecido a ser limpo e a forma desejada da composição para as condições de limpeza durante o uso.

As expressões referem-se ainda a qualquer composição adequada para limpeza e/ou alvejamento de qualquer objeto e/ou superfície. Pretende-se que as expressões incluam, mas não se limitem a composições detergentes (por exemplo, detergentes líquido e/ou sólido para lavanderia e detergentes para tecidos delicados; formulações de limpeza para superfícies difíceis, tais como para vidros, madeira, cerâmica e balcões e janelas de metal; limpadores de carpete; limpadores de forno; e pré-lavagem de têxtil e lavanderia, assim como detergentes para louças).

De fato, a expressão "composição de limpeza" como usada aqui, inclui a menos que indicado de outra maneira, agentes de lavagem em forma granular ou em pó para todos os propósitos ou limpeza pesada, especialmente detergentes de limpeza; agentes de lavagem em forma líquida, de gel ou de pasta para todos os propósitos, especialmente os tipos assim chamados de líquido para limpeza pesada (HDL); detergentes líquidos para tecido delicado; agentes para lavagem manual de louça ou agentes para lavagem leve de louça, especialmente aqueles do tipo muito espumante; agentes para máquina de lavar louça incluindo os vários tipos em pastilhas, granular, líquido e auxiliar de enxágue para uso doméstico e institucional; agentes líquidos para limpeza e desinfecção, xampus de carro ou carpete, limpadores de banheiro; xampus e condicionadores capilares; géis de banho e espumas de banho e limpadores de metal; assim como auxiliares de limpeza tais como aditivos para alvejamento e os tipos "removedores de manchas" ou para pré-tratamento.

Como usado aqui, as expressões "composição detergente" e "formulação detergente" são usadas com referência a misturas que são pretendidas para uso em um meio de lavagem para a limpeza de objetos sujos. Em algumas modalidades, a expressão é usada com referência a lavagem de tecidos e/ou vestuário (por exemplo, "detergentes para lavanderia". Em modalidades alternativas, a expressão refere-se a outros detergentes, tais

como aqueles usados para limpar pratos, talheres, etc. (por exemplo, "detergentes para lavar louça"). Não se pretende que as composições presentemente contempladas sejam limitadas a qualquer formulação ou composição detergente em particular. De fato, pretende-se que além da lacase, a expressão abranja detergentes que contém tensoativos, transferase(s), enzimas hidrolíticas, auxiliares de detergência, agentes branqueadores, ativadores de alvejamento, agentes anilados e corantes fluorescentes, inibidores de compactação, agentes adesivos, ativadores de enzima, antioxidantes e solubilizantes.

Como usada aqui, a expressão "composição para limpeza de superfície difícil" refere-se a composições detergentes para limpeza de superfícies difíceis tais como pisos, paredes, azulejo, vasos de aço inoxidável (por exemplo, tanques de fermentação), metais de banheiro e cozinha, e similares. Tais composições são fornecidas em qualquer forma, incluindo, mas não limitado a sólidos, líquidos, emulsões, etc.

Exemplos

Exemplo 1. Expressão do gene de lacase D em *Bacillus* como gene de fusão sintético BCE103 usando códon otimizado.

DNA (SEQ ID NO:71):

20	GGATCCTGAA GCTATCGGTC CGGTTGCAGA TTTACACATC GTAAACAAAG	50
	ATCTTGCACC TGACGGCGTT CAACGTCAA CTGTACTIONG TGGTGGAAACA	100
	TTCCCTGGTA CACTTATTAC TGGTCAAAAA GGTGACAACT TCCAATTAAA	150
	CGTAATTGAC GATCTTACAG ATGACCGTAT GCTTACACCG ACTTCAATTC	200
	ACTGGCACGG TTTCTTTCAA AAAGGAACAG CATGGGCTGA TGGTCCTGCA	250
25	TTCGTTACAC AATGTCCAAT CATTGCTGAT AACTCTTTCC TTTACGATTT	300
	TGACGTTCCCT GATCAAGCTG GTACATTCTG GTATCACTCA CACTTATCCA	350
	CACAATACTG CGATGGACTT CGCGGAGCTT TCGTAGTTTA CGACCCAAAC	400
	GATCCTCATA AAGACCTTTA CGATGTAGAT GATGGTGGAA CAGTTATCAC	450
	ATTAGCTGAT TGGTACCATG TACTTGCTCA AACAGTTGTA GGTGCAGCTA	500
30	CACCAGATTC AACACTTATC AATGGATTAG GACGTTCTCA AACTGGTCCT	550
	GCTGACGCAG AACTTGCTGT AATCTCTGTT GAACATAACA AACGTTACAG	600
	ATTCCGTCTT GTTAGCATTT CTGCGATCC AAACCTCACA TTTTCAGTTG	650

	ACGGACATAA CATGACAGTT ATCGAAGTAG ATGGTGTAAC CACACGTCCA	700
	CTTACTGTAG ACTCTATCCA AATCTTCGCA GGACAACGTT ACTCATTCGT	750
	ATTAACGCA AATCAACCAG AAGATAACTA CTGGATTCGT GCAATGCCAA	800
	ACATCGGACG TAACACTACA ACTCTTGACG GCAAAAACGC AGCTATTCTT	850
5	CGTTACAAAA ACGCTTCTGT TGAAGAACCT AAAACAGTTG GTGGACCAGC	900
	ACAATCACCA CTTAACGAAG CTGACTTACG TCCACTGGTT CCAGCACCTG	950
	TACCTGGAAA CGCTGTACCA GGAGGTGCTG ATATTAATCA TAGACTTAAC	100
	CTTACTTTCT CTAACGGTCT GTTCTCAATC AACAACGCTT CATTACAAA	1050
	TCCTTCAGTT CCAGCACTTT TACAAATTCT TAGCGGTGCA CAAAATGCTC	1100
10	AGGATCTTTT ACCAACTGGA TCTTACATTG GTCTGAACT GGGTAAAGTA	1150
	GTTGAATTAG TAATTCCTCC GCTTGCTGTA GGTGGACCAC ATCCTTTCCA	1200
	TCTTCACGGT CATAACTTCT GGGTTGTACG TTCTGCTGGT TCAGATGAAT	1250
	ACAACTTCGA TGACGCAATT CTTCGTGATG TTGTATCTAT TGGTGCTGGA	1300
	ACAGATGAAG TAACTATTCG TTCGTAACA GATAACCCTG GTCCTTGGTT	1350
15	CTTACATTGT CATATCGATT GGCATCTGA AGCTGGACTT GCTATTGTTT	1400
	TCGCTGAAGG AATCAATCAA ACAGCTGCAG CTAACCCAAC ACCTCAAGCA	1450
	TGGGACGAAT TATGTCCAAA ATACAACGCA CTTTCTCCAG GAGATACTTA	1500
	AAAGCTT	

1507que codifica o gene da lacase D foi sintetizada por DNA2.0 Inc. (1355 Adams Drive, Menlo Park, CA94025). O plasmídeo de DNA sintético foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII e o fragmento de DNA de 1,5 kb foi isolado de um gel e ligado no vetor p2JMagk1031nk2 (veja US20050202535A1) digerido com as mesmas duas enzimas para criar o plasmídeo de expressão p2JMagk1031nk2E-lacase (figura 1). O plasmídeo foi transformado em uma cepa de *B. subtilis* (*degUHy32, oppA, DspolIE, DaprE, Depr, DispA, Dbpr, Dvpr, DwprA, Dmpr-ybfJ, DnprB, amyE::xyIRPxylAcomK-ermC*) (veja US20050202535A1). Dois transformantes foram selecionados em placas de Agar Luria Broth com 5 mg/ml de cloranfenicol e depois para selecionar clones com o maior número de cópias, as colônias foram repicadas sobre placas de Agar Luria Broth com 25 mg/ml de cloranfenicol até que fosse obtido o crescimento rápido da colônia. Os transformantes amplificados foram inoculados em 30 ml de meio MBD (veja US20050202535A1) contendo cobre 0,5 mM. As culturas foram incubadas

por 60 h a 37°C. Os caldos de cultura foram centrifugados e os sobrenadantes foram usados para ensaio ABTS.

Exemplo 2. Alvejamento de índigo solubilizado com diferentes lacases

Um ensaio para o alvejamento do substrato de índigo solubilizado pelas combinações de lacase/mediador foi realizado em uma placa de microtitulação de 96 poços como se segue.

Uma solução saturada de índigo em *N*-metilpirrolidona (NMP) foi preparada pela agitação de índigo (30 mg) em NMP (10 ml) em temperatura ambiente por 5 horas. A solução de NMP foi diluída 10 vezes em uma solução aquosa de tampão resultando em uma solução azul. Por exemplo, diluição em tampão de acetato de sódio 50 mM em pH 5 ou fosfato de sódio 50 mM em pH 7. As soluções foram bem agitadas imediatamente antes do uso.

O ensaio para o alvejamento do substrato de índigo solubilizado foi realizado em uma placa de microtitulação de 96 poços de forma que cada poço recebeu a solução de índigo solúvel em tampão de acetato de sódio 50 mM em pH 5 (180 uL), lacase (10 ppm de enzima) e solução de mediador (de uma solução-estoque 20 mM em metanol). O volume total de cada poço foi ajustado para 200 uL com água deionizada. Um controle contendo apenas lacase foi corrido em duplicata. A placa foi lacrada e incubada a 50°C por 2 horas a 800 rpm em um agitador aquecido (Thermomixer, Eppendorf). Após esse período, as placas foram abertas e uma solução de ácido ascórbico (20 uL de uma solução aquosa 10%) foi adicionada a cada poço a fim de reduzir as formas oxidadas dos mediadores. O nível de alvejamento de índigo foi então avaliada pela determinação da absorbância de cada poço em 600 nm usando um leitor de placa de microtitulação. Quanto menor a absorbância lida, maior o nível de alvejamento de índigo.

A figura 2 mostra os resultados para uma lacase de *Thielavia* sp. (Ecostone LCC10, AB enzymes, Darmstadt, Alemanha). Os mediadores usados foram ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS), ácido siríngico, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA), siringato de metila (MS), 4-(*N*-metil carboxamido)- 2,6-dimetoxifenol (MSA), 10-(carboxipropil)-fenotiazina (PTP) e siringaldeído. As alterações na absorbância em 600 nm

relativas ao controle estão listadas na Tabela 1 onde a maior alteração na absorvância corresponde à maior extensão de alveamento de índigo.

Com um mediador na concentração de 500 μ M, o mediador mais eficaz para o alveamento de índigo foi ABTS, seguido pela *N*-metil amida (MSA) e pela amida não-substituída, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA). Na menor concentração de mediador de 50 μ M, ABTS foi ainda o mediador mais eficaz, com os mediadores restantes sendo mais ou menos equivalentes. A exceção foi o ácido síringico, que branqueou o índigo solúvel não mais eficazmente que a condição de controle.

- 10 Tabela 1. Alteração na absorvância em 600 nm após alveamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia* sp. e uma variedade de mediadores em concentrações de 500 e 50 μ M (n=2).

Mediador	Concentração de 500 μ M		Concentração de 50 μ M	
	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão
Controle	0	0,008	0	0,010
ABTS	0,235	0,019	0,174	0,032
Ácido Síringico	0,024	0,017	0,005	0,009
AS	0,170	0,018	0,088	0,014
Siringato de metila	0,062	0,035	0,090	0,012
MSA	0,181	0,013	0,103	0,018
PTP	0,044	0,009	0,132	0,020
Siringaldeído	0,132	0,012	0,092	0,017

Exemplo 3. Ensaio de alveamento de índigo solúvel com diferentes lacases em dois valores de pH

- 15 Lacases derivadas de *Myceliophthora* (Denilite® II, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), *Thielavia* (Ecostone LCC10, AB enzymes, Darms-tadt, Alemanha) e *Cerrena* sp. foram avaliadas quanto à sua habilidade de branquear índigo solubilizado em conjunto com mediadores de baixo peso molecular em dois valores de pH.

- 20 O alveamento de índigo solubilizado em placas de microtitulação de 96 poços foi realizado como descrito no Exemplo 1, usando 3 lacases

diferentes em valores de pH de 5 e 7. Os mediadores usados foram ácido sinapínico, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA), siringato de metil 4-acetila (AMS), siringato de metila (MS) e ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS). As figuras 3 e 4 mostram os resultados do alvejamento de índigo solúvel em valores de pH de 5 e 7 usando três lacases derivadas de *Myceliophthora*, *Thielavia* e *Cerrena* sp., respectivamente. Esses dados estão tabulados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Alteração na absorvância em 600 nm em relação a um controle após alvejamento de índigo solúvel usando lacases de *Thielavia*, *Myceliophthora* e *Cerrena* sp. em pH 5 com uma concentração de mediador de 250 μ M.

	Lacase					
	<i>Thielavia</i>		<i>Myceliophthora</i>		<i>Cerrena</i>	
	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão
Controle 1	0	0,016	0	0,010	0	0,005
Ácido sinapínico	0,068	0,019	0,157	0,020	0,240	0,007
SA	0,170	0,011	0,254	0,013	0,142	0,005
AMS	0,100	0,012	0,117	0,007	0,028	0,003
MS (AB)	0,048	0,011	0,057	0,007	0,005	0,011
MS (Denilite)	0,050	0,013	0,061	0,007	0,043	0,013
ABTS	0,234	0,012	0,267	0,008	0,329	0,031
Controle 2	-0,007	0,017	-0,011	0,007	-0,006	0,005

Tabela 3. Alteração na absorvância em 600 nm em relação a um controle após alvejamento de índigo solúvel usando lacases de *Thielavia*, *Myceliophthora* e *Cerrena* sp. em pH 7 com uma concentração de mediador de 250 μ M.

	Lacase					
	<i>Thielavia</i>		<i>Myceliophthora</i>		<i>Cerrena</i>	
	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão
Controle 1	0	0,008	0	0,001	0	0,006

	Lacase					
	<i>Thielavia</i>		<i>Myceliophthora</i>		<i>Cerrena</i>	
	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão	ΔA_{600}	Desvio-padrão
Ácido sinapínico	0,112	0,015	0,204	0,020	0,257	0,005
SA	0,162	0,006	0,220	0,009	0,128	0,010
AMS	0,087	0,006	0,078	0,005	0,077	0,007
MS (AB)	0,053	0,010	0,076	0,006	0,000	0,006
MS (Denilite)	0,069	0,017	0,086	0,001	0,008	0,018
ABTS	0,145	0,006	0,155	0,014	0,215	0,056
Controle 2	0,007	0,006	-0,004	0,001	0	0,005

Exemplo 4. Alveijamento de Retalhos de Brim com lacase de *C. unicolor*.

Calças de brim (feitas de tecido de brim tingido de verde-amarelado/índigo de Cone Mill, modelo número 1662P) foram pré-tratadas com IndiAge® 2XL na dose de 1 grama por litro em uma lavadora com tambor de 50 lb em escala laboratorial. A proporção de líquido era de 6 para 1 (5 kg de substrato em 30 litros de água) e o tratamento foi realizado a 55°C em pH 4.5 por 1 hora. O tratamento com celulase foi seguido por um enxágue morno, após o que o tecido foi seco em uma secadora com tambor. Uma prensa perfuradora foi usada para cortar discos de brim de 5/8 de polegada das calças de brim pré-tratadas com IndiAge® 2XL. Cada disco de brim é pré-lido com um Chroma Meter CR-200 da Minolta a fim de determinar os valores de CIE L*a*b* de ambos os lados, direito e avesso, do disco de tecido.

Um disco de brim é colocado em cada poço de duas placas de microtitulação de 12 poços em duplicata. Cada poço recebeu lacase de *C. unicolor* (20 uL de uma diluição de 1/20, aproximadamente 20 ppm), mediador 200, 100, 50 ou 20 uL de uma solução-estoque 20 mM em metanol) e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6 para um volume total de 2 mL/poço. Os mediadores foram siringato de metila (MS), 4-ciano-2,6-dimetoxifenol (SN) e 3,4,5-trimetoxifenol (TMP). As placas foram seladas e incubadas a

50°C por 2 horas a 150 rpm em uma incubadora padronizada. Após esse período, os retalhos foram removidos das placas e cuidadosamente colocados sobre um papel de filtro em um funil de Buchner e lavados com quantidades abundantes de água, seguida pela secagem da água residual sob alto vácuo durante a noite. Os retalhos foram então relidos com o colorímetro a fim de determinar os valores de CIE L*a*b* de ambos os lados, direito e avesso, do disco após o alvejamento. A diferença total de cor (ΔE) é calculada a partir da diferença entre os valores inicial e final de CIE L*a*b* de acordo com a fórmula

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$$

As diferenças totais de cor (ΔE) como uma função da concentração de mediador estão plotadas nas figuras 5 e 6. O mediador mais eficaz foi 4-ciano-2,6-dimetoxifenol (SN), seguido por siringato de metila (MS). A relação dose/resposta foi vista para ambos os compostos de acordo com o que concentrações mais baixas forneceram menos alvejamento. O terceiro mediador, 3,4,5-trimetoxifenol (TMP), não foi um mediador eficaz sob essas condições. Esses dados estão tabulados na Tabela 4.

Tabela 4. Alterações em L, a, b e diferença total de cor (E) de ambos os lados, frente e avesso, de retalhos de brim tratados com lacase de *C. unicolor* (20 ppm) e 3 mediadores em várias concentrações.

Mediador		Lado direito do retalho de brim				Lado do avesso do retalho de brim			
		ΔL	Δa	Δb	ΔE	ΔL	Δa	Δb	ΔE
MS	2000 μM	11,13	-2,23	4,32	12,15	11,92	-0,61	9,39	15,19
		12,26	-2,35	4,76	13,54	12,01	-0,42	9,88	15,56
	1000 μM	11,55	-2,53	3,27	12,27	8,42	-0,12	6,4	10,58
		9,58	-2,23	3,03	10,29	9,22	-0,49	7,0	11,59
	500 μM	6,5	-1,18	1,65	6,81	7,53	0,09	5,68	9,43
		8,22	-1,48	2,38	8,68	8,54	-0,23	5,75	10,30
	200 μM	4,67	-0,99	1,25	4,93	5,83	0,14	4,35	7,28
5,29		-0,94	1,1	5,48	6,36	0,06	4,34	7,70	
SN	2000 μM	14,79	-2,11	5,8	16,03	12,34	0,01	9,06	15,31

	1000 uM	13,23	-1,87	5,58	14,48	13,58	0,37	9,52	16,59
		13,54	-2,05	5,47	14,75	11,45	0,07	8,02	13,98
	500 uM	13,84	-2,49	4,98	14,92	12,1	0,14	9,19	15,19
		14,46	-1,9	5,51	15,59	10,71	0,35	8,1	13,43
	200 uM	12,06	-1,97	4,92	13,17	11,6	0,38	8,03	14,11
		6,63	-1,35	2,57	7,24	8,38	0,54	6,12	10,39
			7,98	-1,28	2,67	8,51	8,67	0,38	5,67
TMP	2000 uM	-0,06	0,15	0,1	0,19	0,26	-0,12	0,19	0,34
		-0,23	0,05	-0,32	0,40	-0,3	0,06	-0,14	0,34
	1000 uM	0,47	-0,2	0,04	0,51	0,36	0,22	0,15	0,45
		-0,07	0,18	-0,42	0,46	-0,49	0,12	-0,07	0,51
	500 uM	-0,61	-0,06	0,18	0,64	-0,43	0,2	-0,19	0,51
		-0,61	0,14	-0,06	0,63	0,29	0,09	-0,01	0,30
	200 uM	-0,91	0,29	0,01	0,96	-0,1	-0,14	0,3	0,35
-0,68		0,33	-0,12	0,77	-0,49	0,14	-0,26	0,57	

¹ MS = siringato de metila, SN = 4-ciano-2,6-dimetóxfenol,

TMP = 3,4,5-trimetóxfenol

² Diferença nos valores de L, a e b foi determinada subtraindo as leituras inicial da final.

5 Exemplo 5. Branqueamento de retalhos de brim com lacase D recombinante de *C. unicolor*.

Um ensaio de branqueamento de retalho de brim foi realizado como descrito no Exemplo 16, desta vez usando uma forma recombinante da proteína lacase D derivada de *C. unicolor*.

10 Duas duplicatas de placas de 12 poços foram carregadas com discos de brim. A solução-estoque de lacase D (5,5 unidades ABTS por mL) foi dosada tanto em 25 quanto em 50 uL por poço. Os mediadores usados foram siringato de metila (MS), 4-ciano-2,6-dimetóxfenol (SN) e 4-carboxamido-2,6-dimetóxfenol (SA) e foram usados em concentrações de
15 0,5 ou 1 mM. Os resultados são mostrados nas figuras 7 e 8. As alterações nos valores de L, a e b e as diferenças totais de cor (ΔE) estão listadas na Tabela 5. Os resultados indicam que 4-ciano-2,6-dimetóxfenol (SN) foi o

mediador mais eficaz para o branqueamento de retalho de brim sob essas condições.

Condições			Lado direito do retalho de brim				Lado do avesso do retalho de brim			
Mediador ¹		Lacase ²	ΔL	Δa	Δb	ΔE	ΔL	Δa	Δb	ΔE
MS	1 mM	50 uL	11,77	-2,20	4,67	12,85	11,16	0,34	8,52	14,04
			11,57	-2,15	4,51	12,60	10,30	0,50	8,26	13,21
MS	0,5 mM	50 uL	7,74	-1,92	2,45	8,34	7,93	0,33	6,29	10,13
			7,12	-1,70	2,21	7,65	8,34	0,17	6,47	10,56
MS	1 mM	25 uL	10,74	-1,90	4,82	11,92	9,44	0,16	7,99	12,37
			11,15	-2,46	3,93	12,08	10,25	0,26	7,89	12,94
MS	0,5 mM	25 uL	8,55	-1,90	3,12	9,30	9,35	0,00	6,36	11,31
			9,53	-1,91	3,43	10,31	9,10	0,03	6,70	11,30
SN	1 mM	50 uL	12,98	-2,04	5,33	14,18	11,25	0,29	8,41	14,05
			12,85	-2,23	5,50	14,15	10,98	0,48	8,91	14,15
SN	0,5 mM	50 uL	8,20	-1,70	2,34	8,70	8,87	0,26	5,93	10,67
			8,67	-1,76	2,90	9,31	8,45	0,33	6,19	10,48
SN	1 mM	25 uL	12,31	-2,17	4,36	13,24	11,36	0,01	7,93	13,85
			12,85	-2,02	4,85	13,88	10,64	0,13	7,59	13,07
SN	0,5 mM	25 uL	9,23	-2,17	3,12	9,98	9,69	-0,15	6,41	11,62
			9,73	-1,91	3,39	10,48	9,31	0,36	6,81	11,54
SA	1 mM	50 uL	6,23	-1,83	1,73	6,72	6,52	0,15	5,79	8,72
			7,37	-2,01	2,11	7,93	6,82	0,10	6,12	9,16
SA	0,5 mM	50 uL	3,66	-1,23	0,87	3,96	4,64	-0,10	4,04	6,15
			4,46	-1,38	0,88	4,75	5,25	-0,19	4,17	6,71
SA	1 mM	25 uL	7,07	-1,97	1,76	7,55	7,02	0,09	5,51	8,92
			7,19	-2,18	1,68	7,70	6,53	-0,45	5,22	8,37
SA	0,5 mM	25 uL	4,73	-1,41	1,16	5,07	4,94	-0,16	4,51	6,69
			5,28	-1,56	1,47	5,70	4,93	-0,33	4,05	6,39

¹ MS = siringato de metila, SN = 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, AS = 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol

² Lacase de estoque era um concentrado com uma atividade de 5,5 U/ml contra ABTS

Exemplo 6. Estabilidade de mediadores na presença de lacase de *C. unicolor*

5 Alíquotas de sobrenadante foram analisadas por LC/MS após o protocolo de alvejamento de disco de brim descrito no Exemplo 5 a fim de determinar as concentrações finais de mediador no sobrenadante após um período de incubação de 2 horas.

10 Soluções padronizadas dos mediadores foram preparadas pela diluição das soluções-estoque metanólicas (20 mM) em água deionizada, tal que as concentrações finais eram de 1 mM, respectivamente, para cada um dos três mediadores, siringato de metila (MS), 4-ciano-2,6-dimetoxifenol (SN) e 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA). As amostras foram analisadas usando um sistema Thermo Finnegan Quantum TSQ LC/MS (Thermo Finnegan, San Jose, CA) que opera em modo de ionização positiva por *electrospray*. As condições da cromatografia líquida foram as seguintes:

Coluna: Agilent Zorbax SB-Aq, 2,1 mm x 100 mm, sílica 3,5 μ M

Solvente A; Formato de amônia 20 mM, pH 5.0

Solvente B; 90% de Metanol + 10% de solvente A

20 Taxa de fluxo; 250 μ L/min

Volume de injeção; 5 μ L

Programa de eluição: 70% de solvente A entre 0 a 1 minuto, para 30% de A entre 3 a 4 minutos, novamente 70% de A com 4,5 minutos, manter em 70% de A até os 8 minutos totais.

25 As condições de espectrometria de massa foram as seguintes: Ionização por *electrospray* em modo positivo (+ve ESI) em modo de rastreamento completo, rastreando entre 175 a 240 Da em 0,5 segundos.

Voltagem do spray era de 4200 V, taxa de fluxo coaxial de gás 41 mL/min, taxa de fluxo de gás suplementar em 15 mL/min.

30 Voltagem da lente do tubo era de 190 V e a temperatura capilar era de 270°C.

Os resultados do experimento são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Estabilidade de mediadores como determinada pelas concentrações inicial e final no sobrenadante usado para branquear discos de brim.

Mediador	Área de Pico Inicial	Área de Pico Final	% Remanescente
MS	133 x 10 ⁷	40,2 x 10 ⁷	30,2%
SN	35,6 x 10 ⁷	35,2 x 10 ⁷	98,9%
AS	122 x 10 ⁷	0,94 x 10 ⁷	7,8%

¹ MS = siringato de metila, SN = 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, AS = 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol

5 Os resultados indicam que a estabilidade dos mediadores difere amplamente após o contato com a lacase e o substrato para as condições de incubação padronizadas de 2 horas a 50°C. Nesse exemplo, 4-ciano-2,6-dimetoxifenol (SN) foi, com uma grande margem, o composto mais estável, cuja concentração essencialmente não se alterou (restaram 98,9%), seguido por siringato de metila (restaram 30,2%). O composto mediador menos estável foi 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA), com apenas 7,8% restantes no
10 final do experimento.

Exemplo 7. Purificação e determinação de atividade específica

O gene otimizado da lacase D (veja SEQ ID NO: 70 do pedido
15 copendente Protocolo N° GC942 e 60/875.518) foi expresso usando o sistema de expressão descrito no pedido copendente US 60/984.430 (Protocolo N° GC993P designado "Signal Sequences and co-expressed chaperones for improved heterologous protein production in a host cell" depositado em 1 de Novembro de 2007) em fermentadores de 14 litros. O caldo de fermentação
20 foi coletado em 184 horas e concentrado por ultra-filtração (UFC 20070245). O concentrado foi diafiltrado em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4.0. Então, a amostra de diafiltrado de UFC foi carregada em uma coluna de troca de íon contendo a resina Poros HS-20 (Applied Biosystems, coluna de 20 x 275 mm) equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4.0. A coluna
25 foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4.0. A proteína lacase D foi eluída da coluna usando um gradiente de sal (12 volumes de coluna) de 40 mM para 80 mM de cloreto de sódio em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4.0. As frações contendo atividade de laca-

se foram agrupadas e concentradas posteriormente usando um agitador de célula de 400 mL Amicon com uma membrana de 10K. A proteína total foi medida por gel de proteína SDS usando BSA como padrão em 4 mg/ml (>90% puro). A amostra de lacase foi diluída 10.000 vezes com água e armazenada em temperatura ambiente por 18 horas e a 4°C por mais do que 24 horas. A atividade ABTS foi medida como 8570 unidades/ml. A atividade específica da lacase D recombinante foi então calculada pela divisão de 8570 unidades/ml por 4 mg/ml resultando em 2140 unidades/mg de proteína o que representa 100 vezes mais atividade do que a lacase de *Stachybotrys* (16 u/mg) (veja Mander et al., Appl. Environ. Microbiol. (2006) 72:5020-5026). Assim, essa enzima resulta em menor descarga de cobre no meio ambiente do que as outras lacases, por exemplo, a lacase de *Stachybotrys*, em virtude da alta atividade específica.

Exemplo 8. Procedimento para alveamento de brim

15 Mediadores

4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzamida (siringamida, SA) foi adquirida de Punjab Chemicals & Crop Protection Limited (Mumbai, India). 4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzonitrila (siringonitrila, SN) foi adquirida de StereoChemical, Inc., (Newark, DE) ou Punjab Chemicals & Crop Protection Limited (Mumbai, India).

Enzima

Enzima lacase, derivada de *Cerrena unicolor* (Exemplo 7, 8570 U/ml, 4 mg de proteína/ml) foi usada nos experimentos.

Procedimento

25 As incubações da enzima foram feitas em um ATLAS LP 2 Launder-O-meter em diferentes condições em relação ao pH, temperatura, concentração de enzima e concentração de mediador. As reações foram realizadas em vasos de reação de aço inoxidável de 500 ml contendo 100 ml de líquido. A cada vaso, cinco retalhos de brim lavados com abrasivos (7 x 7 cm) (brim ACG modelo 80270) e 6 esferas de aço com 6 mm de diâmetro foram adicionados. Os vasos de reação foram fechados e colocados no laund-O-meter que foi pré-aquecida até a temperatura deseja-

da. A incubação foi realizada por 30 minutos após o que os retalhos foram lavados com água morna "corrente", centrifugadas em uma centrifuga AEG IPX4 e secos com um ferro Elna Press Electronic no programa algodão e avaliados.

5 Lavagem de brim com abrasivos

Brim, 12 calças pesando aproximadamente 3 kg, foi degomado em uma máquina de lavar Unimac UF 50 sob as seguintes condições:

- Degomação por 15 minutos em uma proporção de solução de 10:1, 50°C com 0,5 g/l (15 g) de amilase Optisize (Genencor) e 0,5 g/l (15 g) de um tensoativo não-iônico (por exemplo, Rucogen BFA, (Rudolf Chemie) ou Ultravon GPN (Huntsman))

• 2 enxágues a frio por 5 minutos em uma proporção de solução de 30:1.

Após a degomagem, o brim foi lavado com abrasivos em uma máquina de lavar Unimac UF 50 sob as seguintes condições:

- Enxágue a frio por 5 minutos em uma proporção de solução de 10:1

• Lavagem com abrasivos por 60 minutos em uma proporção de solução de 10:1, 55°C com 1 kg de pedra-pomes, tampão citrato (30 g de citrato di-hidratado tri-sódico e 30 g de mono-hidrato de ácido cítrico) e 35 g de celulase IndiAge 2XL (Genencor).

• 2 enxágues a frio por 5 minutos em uma proporção de solução de 30:1.

O brim foi seco em um secador de tecido doméstico Miele Novotronic T494C. Foram cortados retalhos de 7 x 7 cm das calças de brim.

Avaliação de retalhos de brim

A cor de cinco retalhos de brim é medida com um Minolta Chromameter CR 310 no CIE Lab color space com uma fonte de luz D 65. As medidas foram feitas antes e depois do tratamento com lacase e os resultados dos cinco retalhos foi calculado. A diferença total de cor (TCD) é calculada, A diferença total de cor pode ser calculada com a fórmula : $TCD = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$.

Avaliação das calças de brim

As calças de brim foram avaliadas com um Minolta Chromameter CR 310 no CIE Lab color space com uma fonte de luz D 65. As medidas foram feitas apenas depois do tratamento com lacase. Para cada calça de brim foram tomadas 8 medidas e do resultado das 12 calças (96 medidas) foi calculada a média.

Exemplo 9. Efeito da temperatura sobre o desempenho de alveijamento da lacase D recombinante (Unimac)

Alveijamento com lacase de brim lavado com abrasivos: Brim, 12 calças com aproximadamente 3 kg, foi degomado e lavado com abrasivos como descrito no Exemplo 8. Após a lavagem com abrasivos, um tratamento com lacase foi feito em uma máquina de lavar Unimac UF 50 de acordo com o seguinte processo:

- 30 minutos em solução na proporção de 10:1,
- pH 6 (21 g de fosfato monossódico e 5 g de ácido adípico, lacase D recombinante) ou pH 4,8 (8,6 g de fosfato monossódico e 16,8 g de ácido adípico, lacase Novoprime Base 268)
- lacase (lacase D recombinante ou Novoprime Base 268)
- mediador (siringamida (SA) e siringonitrila (SN))
- Após o tratamento com lacase o brim foi lavado duas vezes em água fria por 5 minutos em uma proporção de solução de 30:1.

Os experimentos com lacase foram realizados e os resultados são apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7

Concentração de lacase de Cerrena unicolor	Mediador	Concentração de mediador	Temperatura (°C)	Nível de alveijamento (CIE L)
0,05 g/l / 0,4 U/ml	SA	0,33 mM	60	35,6
0,05 g/l / 0,4 U/ml	SN	0,47 mM	60	35,9
0,05 g/l / 0,4 U/ml	SA	0,33 mM	40	35,6
0,05 g/l / 0,4 U/ml	SN	0,47 mM	40	35,7

25

Tabela 8

Concentração de Novoprime base 268	Concentração de mediador	Temperatura (°C)	Nível de alveamento (CIE L)
0,05 g/l	0,023 g/l	60	35,9
0,05 g/l	0,023 g/l	40	33,7

A lacase D recombinante teve um desempenho melhor em temperaturas menores do que as lacases comerciais atualmente disponíveis. A lacase (na presença de mediador) fornece um efeito de alveamento em temperaturas abaixo de 60°C, preferivelmente entre 40°C e 60°C. Assim, a lacase fornece economia de energia ao processo têxtil.

Exemplo 10. Efeito da enzima lacase D recombinante e a concentração de mediador sobre desempenho no alveamento (Laund-O-meter)

O efeito da lacase e da concentração de mediador foi avaliado executando os experimentos nas tabelas abaixo em pH 6 (tampão fosfato monossódico 50 mM pH ajustado com solução de hidróxido de sódio 4N) e temperatura de 60°C.

Os experimentos foram feitos com os mediadores siringamida (SA) e siringonitrila (SN).

100 ml de tampão foram adicionados a um béquer com cinco retalhos, 7 x 7 cm. O total pesa 12 g (proporção brim:solução = 1:8). As concentrações de lacase e mediador foram usadas como indicado na tabela abaixo.

Tabela 9

Concentração de enzima lacase (µl/l)	Correspondência de atividade (unidade de lacase/g de brim)
10	0,67
33	2,17
55	3,67
78	5,17
100	6,67

Tabela 10

Concentração de mediador (nM)
0,10
0,33
0,55

Concentração de mediador (nM)
0,78
1,00

As quantidades de mediador siringamida ou siringonitrila como indicadas nas tabelas abaixo foram adicionadas em cada béquer como uma diluição de solução-estoque de SA ou SN 275 mM em 98% de metanol. A lacase foi adicionada a cada béquer como indicado nas tabelas abaixo, como uma diluição de uma solução-estoque de 400 unidades de lacase/ml. Os béqueres foram fechados e processados a 60°C como descrito no Exemplo 8. Os retalhos foram avaliados como descrito no Exemplo 8.

Tabela 11

LACASE + SA a 60°C pH 6		
Lacase ($\mu\text{L/l}$)	Mediador siringamida (mM)	TCD
100	1,00	5,6
100	1,00	6,0
100	0,10	2,9
78	0,33	4,4
55	1,00	6,2
55	0,55	5,3
33	0,78	5,5
33	0,33	4,6
10	1,00	3,2
10	0,10	2,5
55	0,55	5,8
100	0,55	5,3
78	0,78	5,9
100	0,10	3,2
55	0,10	3,1
10	0,55	3,6

TCD = Diferença total de cor

10

Tabela 12

LACASE + SN a 60°C pH 6		
Lacase ($\mu\text{L/l}$)	Mediador siringonitrila (mM)	TCD
100	1,00	7,6

LACASE + SN a 60°C pH 6		
100	1,00	8,1
100	0,10	4,1
78	0,33	5,6
55	1,00	7,0
55	0,55	6,0
33	0,78	5,5
33	0,33	4,4
10	1,00	3,8
10	0,10	2,7
55	0,55	6,3
100	0,55	7,1
78	0,78	7,1
100	0,10	4,0
55	0,10	3,5
10	0,55	3,4

TCD = Diferença total de cor

As tabelas acima e as figuras 9 e 10 mostram que é necessário ambos, a enzima e o mediador, para se obter o alveijamento. Também mostra que há um pouco de flexibilidade na proporção enzima/mediador para a obtenção de um certo nível de alveijamento.

Exemplo 11 – Efeito dose-resposta de lacase D recombinante sobre o desempenho no alveijamento (Unimac)

Alveijamento com lacase de brim lavado com abrasivos – Brim, 12 calças pesando aproximadamente 3 kg, foi degomado e lavado com abrasivos como descrito no Exemplo 8. Após a lavagem com abrasivos, foi feito um tratamento com lacase de acordo com o seguinte processo: 30 minutos em uma solução na proporção de 10:1 e pH 6 (21 g de fosfato monossódico e 5 g de ácido adípico) e 60°C com lacase e mediador. Após o tratamento com lacase, o brim foi enxaguado duas vezes em água fria por 5 minutos em uma solução na proporção de 30:1.

Os seguintes experimentos foram realizados:

- Siringamida 0,33 mM:

Concentração de lacase de <i>Cerrena unicolor</i> (g/l)	Nível de alveamento (CIE L)
0,010	34,6
0,05	36,2
0,25	36,2

• Siringonitrila 0,39 mM:

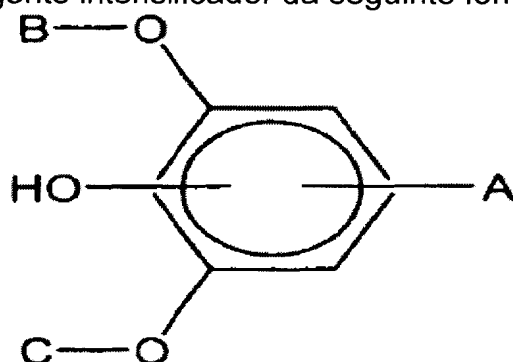
Concentração de lacase de <i>Cerrena unicolor</i> (g/l)	Nível de alveamento (CIE L)
0,25	37,7
0,4	39,5
0,53	38,8

Os resultados são mostrados nas tabelas acima. Isso mostra que com a lacase D recombinante e o mediador de amida, o nível de alveamento se estabiliza muito rapidamente. Com uma concentração de enzima de 0,05 e 0,25 é obtido o mesmo nível de alveamento. Para a lacase D recombinante e o mediador de nitrila o nível de alveamento aumenta até 0,4 g/l, onde parece ser um ótimo.

É entendido que os exemplos e modalidades aqui descritos têm apenas propósito ilustrativo e que várias modificações à luz desses serão sugeridas por pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas no espírito e no escopo desse pedido e no escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados aqui estão por meio desse incorporadas por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para fornecimento de aspecto de alveamento na densidade da cor da superfície de tecido tingido, o processo compreendendo contatar, em um meio aquoso, um tecido tingido com sistema de enzima que oxida fenol e um agente intensificador da seguinte fórmula:



em cuja fórmula A é um grupo tal como $-C_n$ ou $-CO-E$, no qual E pode ser $-H$, $-OH$, $-R$, $-OR$ ou $-NXY$, onde X, Y e Z podem ser idênticos ou diferentes e selecionados entre $-H$, $-OH$, e $-R$; R sendo C_1-C_{16} alquila, preferivelmente C_1-C_8 alquila, cuja alquila pode ser saturada ou insaturada, ramificada ou não-ramificada e opcionalmente substituída por um grupo carbóxi, sulfo ou amino; e B e C podem ser iguais ou diferentes e selecionados a partir de C_mH_{2m+1} ; $1 \leq m \leq 5$.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido é tingido com um corante de tina tal como índigo ou tioíndigo.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o tecido é um tecido celulósico ou uma mistura de fibras celulósicas ou uma mistura de fibras celulósicas e fibras sintéticas.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o tecido é brim, preferivelmente brim tingido com índigo ou tioíndigo.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o sistema de enzima que oxida o fenol é uma peroxidase ou uma fonte de peróxido de hidrogênio.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a peroxidase é peroxidase de rábano-silvestre, peroxidase de soja ou uma enzima

peroxidase derivada de Coprinus, por exemplo, C. cinereus ou C. macrorrhizus ou de Bacillus, por exemplo, B. pumilus ou Myxococcus, por exemplo, M. virescens.

5 7. Processo de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que a fonte de peróxido de hidrogênio é o peróxido de hidrogênio ou um precursor de peróxido de hidrogênio, por exemplo, perborato ou percarbonato, ou um sistema de enzima que gere peróxido, por exemplo, uma oxidase e seu substrato ou um ácido peroxicarboxílico ou um sal do mesmo.

10 8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o meio aquoso contém H_2O_2 ou um precursor de H_2O_2 em uma concentração que corresponde a 0,001-25 mM de H_2O_2 .

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o sistema de enzima que oxida o fenol é uma lacase ou uma enzima relacionada à lacase junto com oxigênio.

15 10. Processo de acordo com a reivindicação 9, em que a lacase é derivada de *Aspergillus*, *Neurospora*, por exemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Cerrena*, *Stachybotrys*, *Panus*, por exemplo, *Panus rudis*, *Theilava*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por exemplo, *T. villosa* e *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por exemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por exemplo *C. plicatilis* e *C. cinereus*, *Psatyrella*, *Myceliophthora*, por exemplo *M. thermophila*, *Schytalidum*, *Phlebia*, por exemplo *P. radita*, ou *Coriolus*, por exemplo, *C. hirsutus*, *Spongipellis sp.*, *Polyporus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Ganoderma tsunodae* e *Trichoderma*.

20

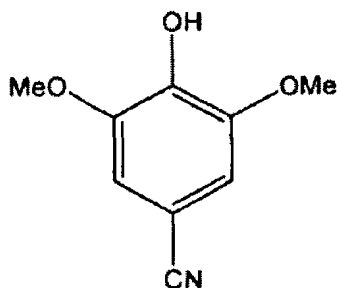
25 11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o tecido é brim e a concentração da enzima que oxida fenol corresponde a 0,001 a 10000 μ g de proteína de enzima por g de brim.

30 12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que o agente intensificador pertence ao grupo que consiste em 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol, 4-(*N*-metil carboxamido)- 2,6-dimetoxifenol, e 4-[*N,N*-dimetil-carboxamido]- 2,6-dimetoxifenol.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o tecido é brim e o agente intensificador em meio aquoso está

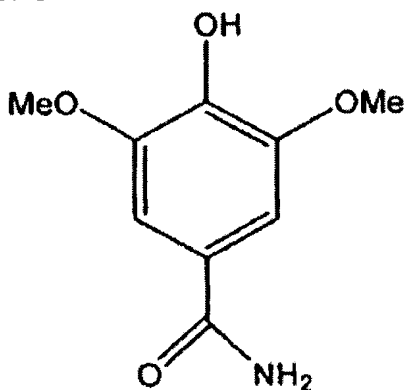
presente em concentrações entre 0,005 a 1000 μmols por g de brim.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o mediador é



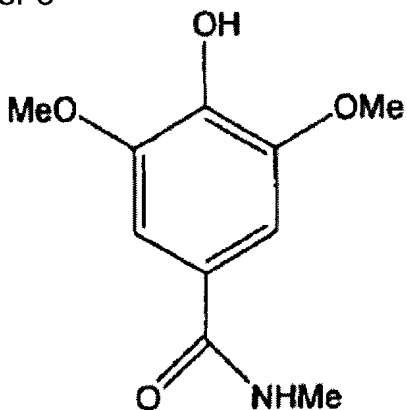
4-ciano-2,6-dimetóxiifenol

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o mediador é



4-carboxamido-2,6-dimetóxiifenol

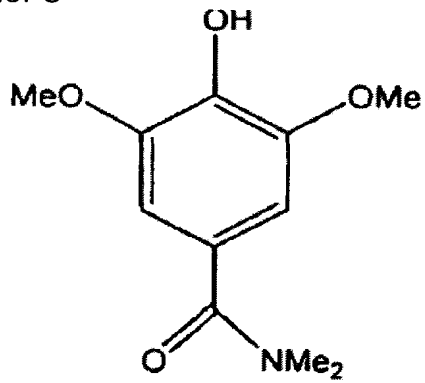
16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o mediador é



4-(*N*-metil carboxamido)-2,6-dimetóxiifenol

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

a 12, em que o mediador é



4-(*N,N*-dimetil carboxamido)-2,6-dimetoxifenol

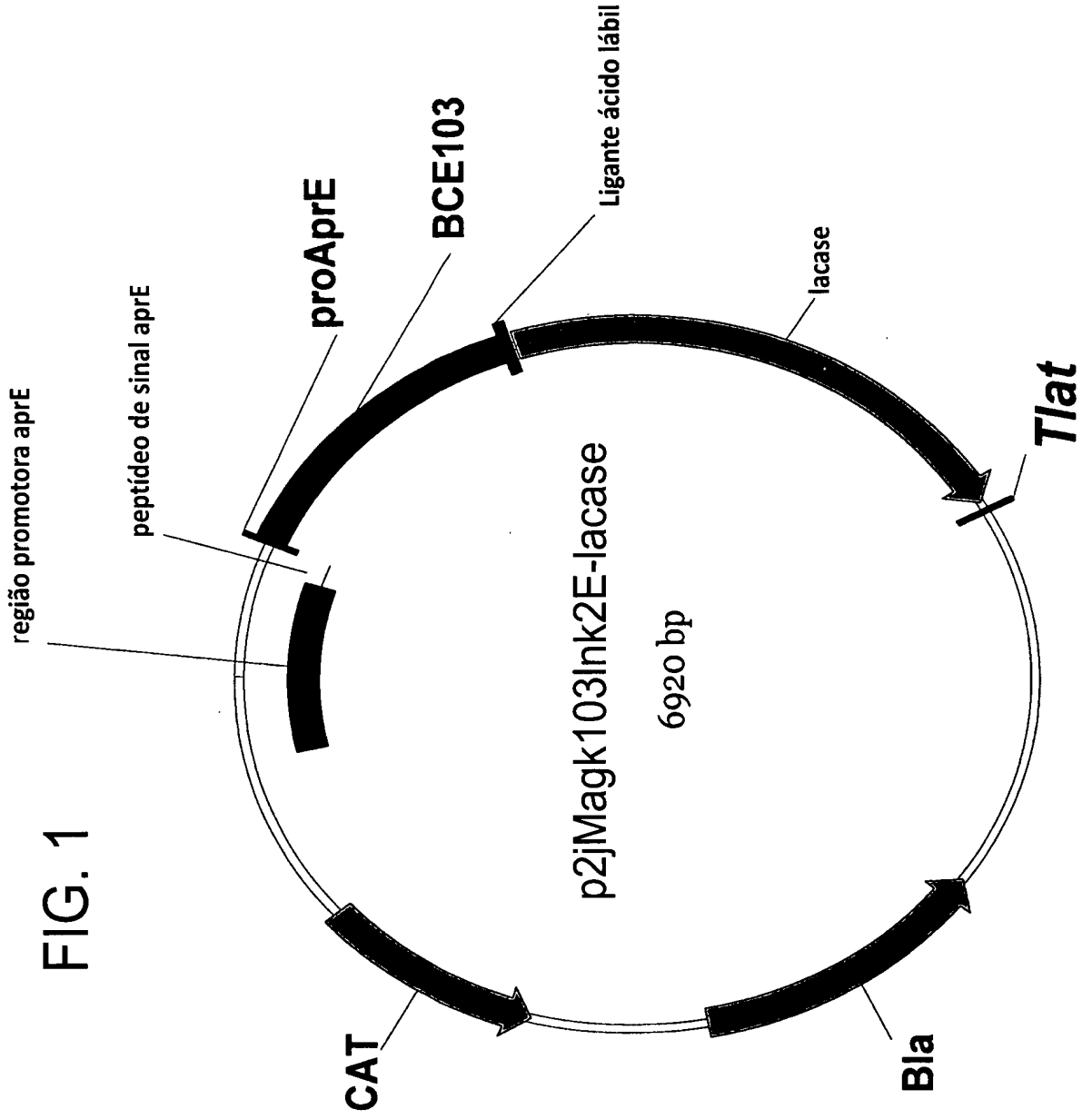


FIG. 2

Branqueamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia sp.* e uma variedade de mediadores em concentrações de 50 e 500 μM .

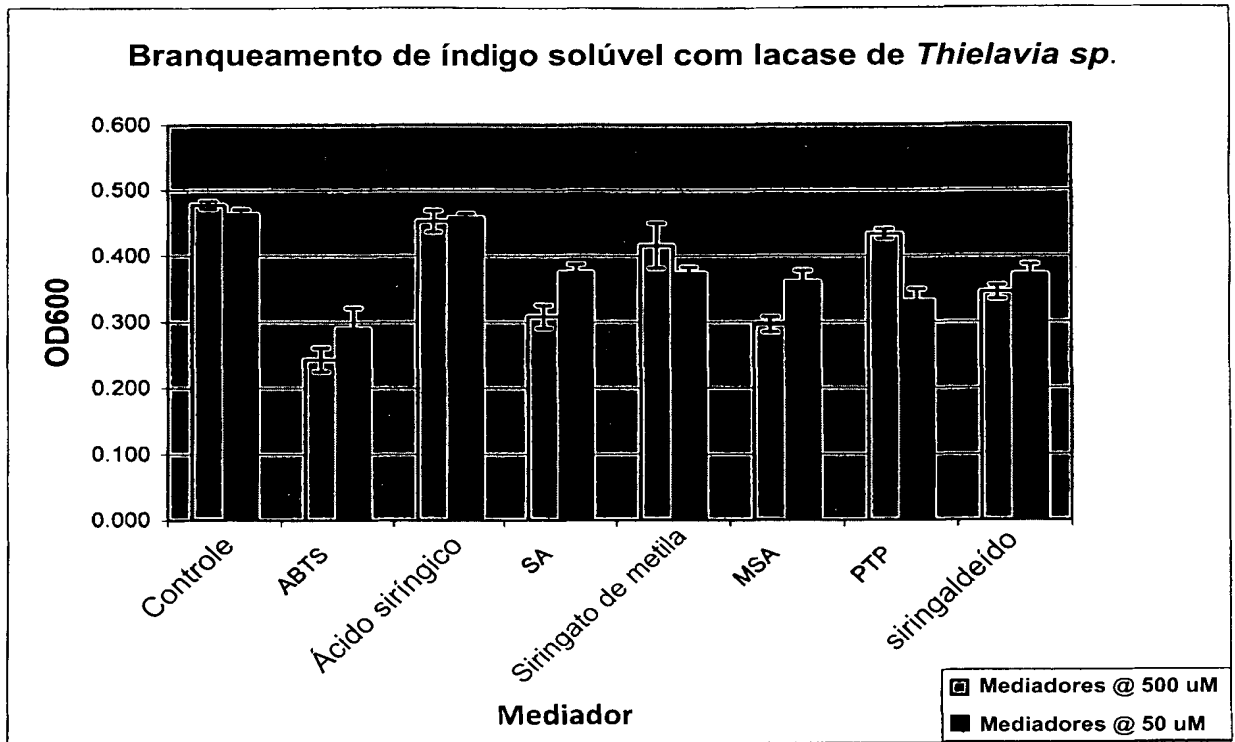


FIG. 3

Branqueamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia*, *Myceliophthora* e *Cerrena* e uma variedade de mediadores em pH 5.

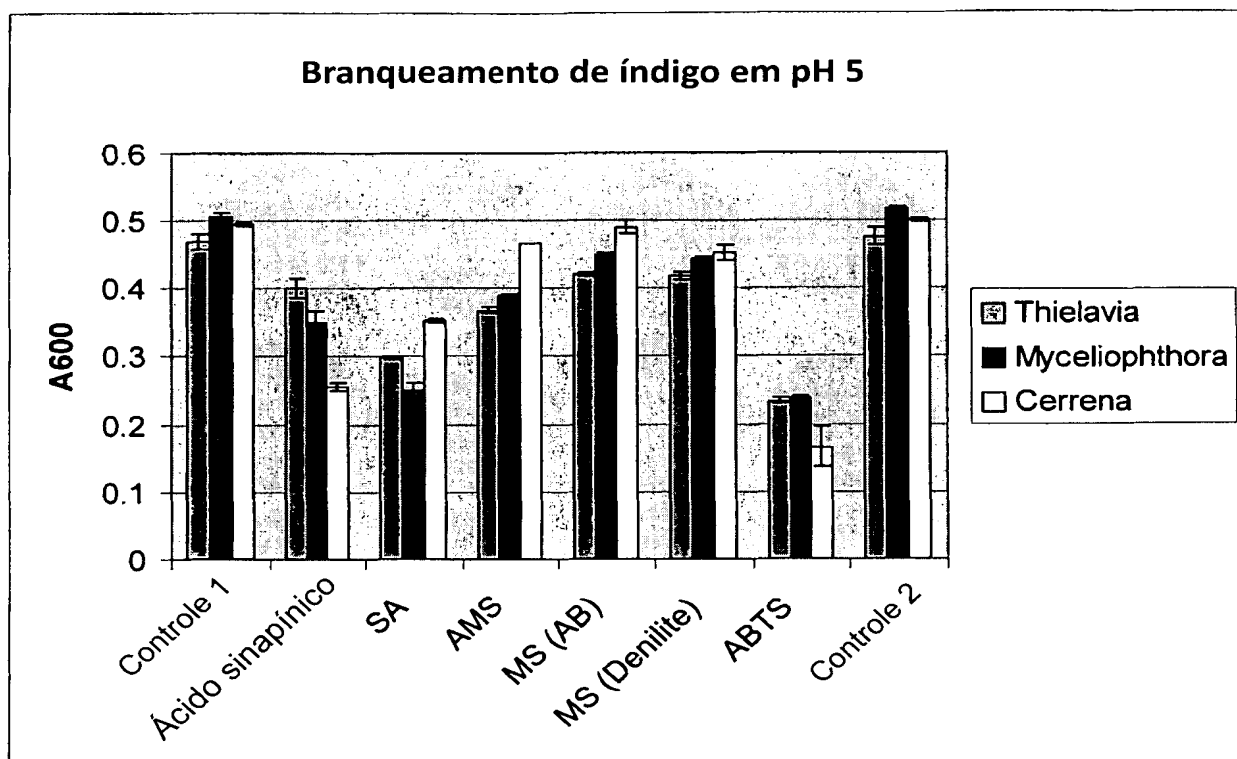


FIG. 4

Branqueamento de índigo solúvel usando uma lacase de *Thielavia*, *Myceliophthora* e *Cerrena* e uma variedade de mediadores em pH 7.

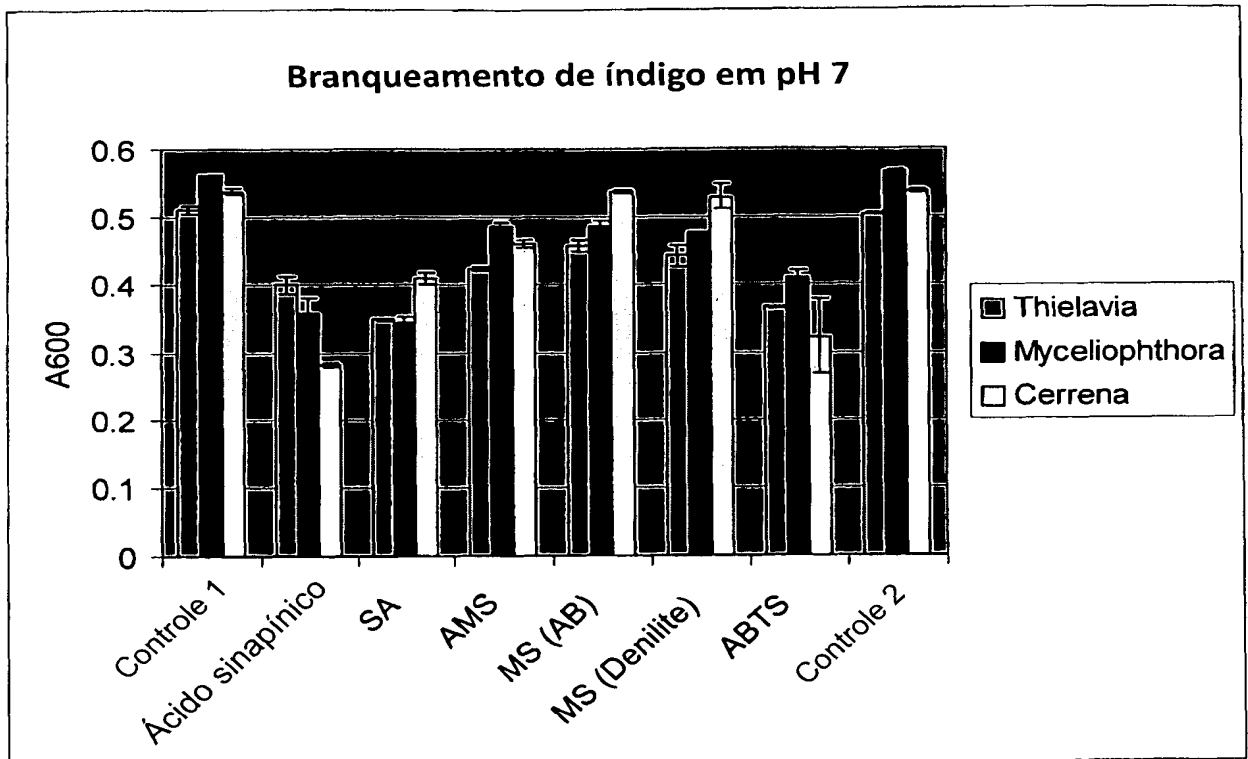


FIG. 5

Diferença total de cor (E) de retalhos de brim (lado direito) tratados com lacase de *C. unicolor* (20 ppm) e 3 mediadores em várias concentrações

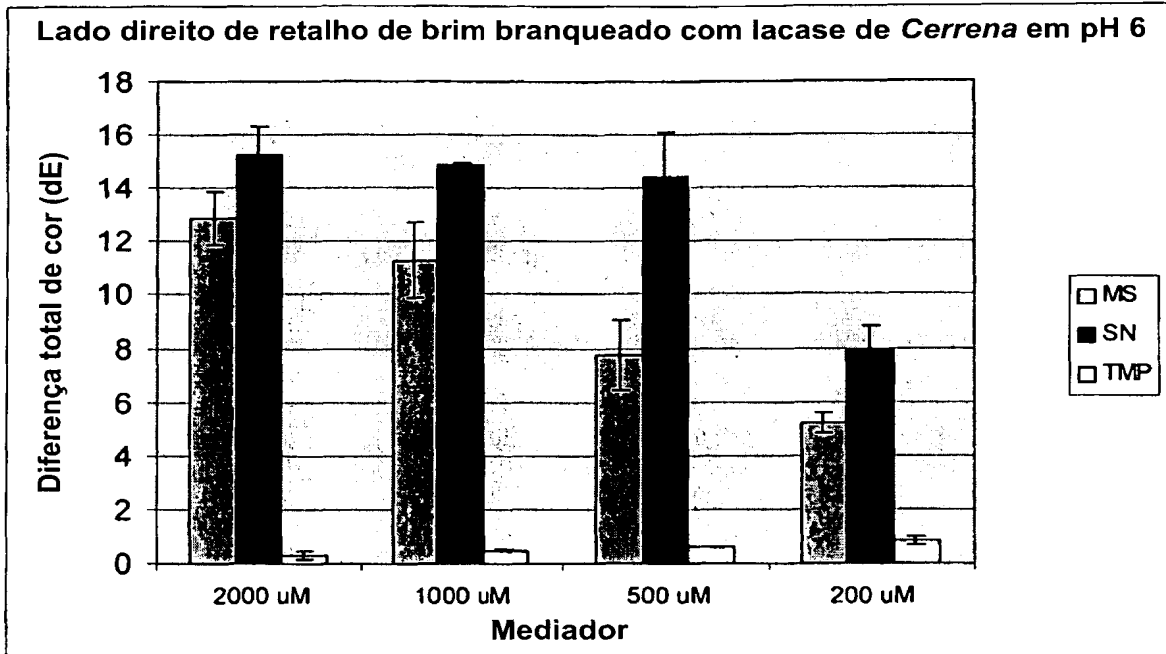


FIG. 6

Diferença total de cor (E) de retalhos de brim (lado do avesso) tratados com lacase de *C. unicolor* (20 ppm) e 3 mediadores em várias concentrações

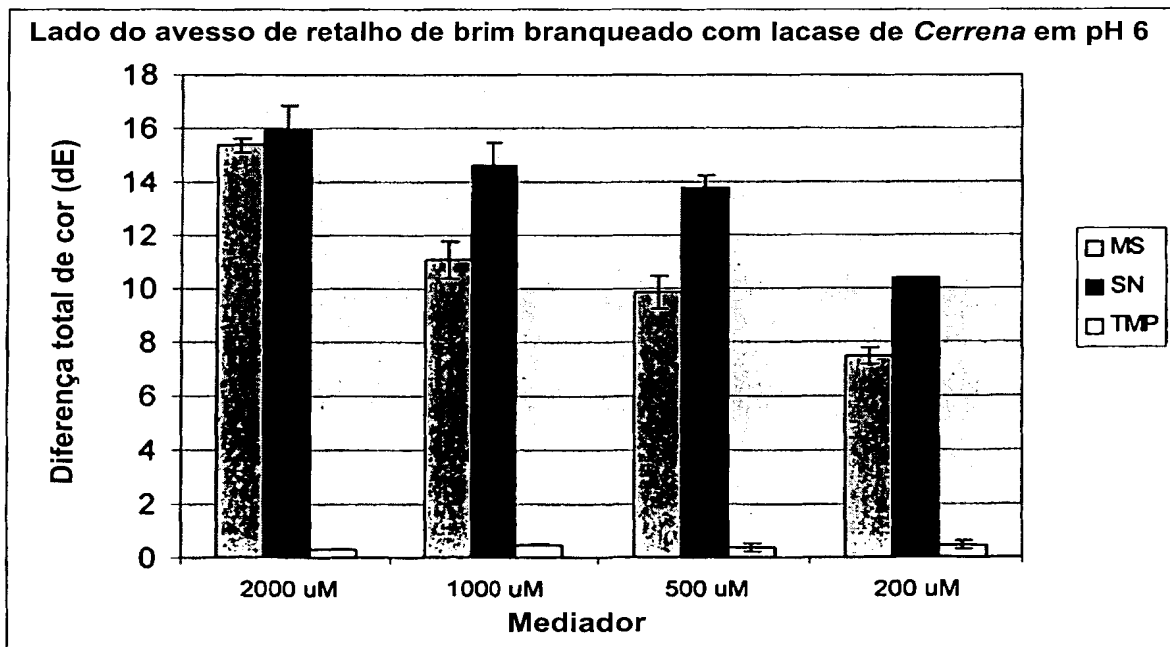


FIG. 7

Diferenças totais de cor para discos de brim branqueados (lado direito) como uma função de combinações de lacase/mediador usando lacase D de *C. unicolor*.

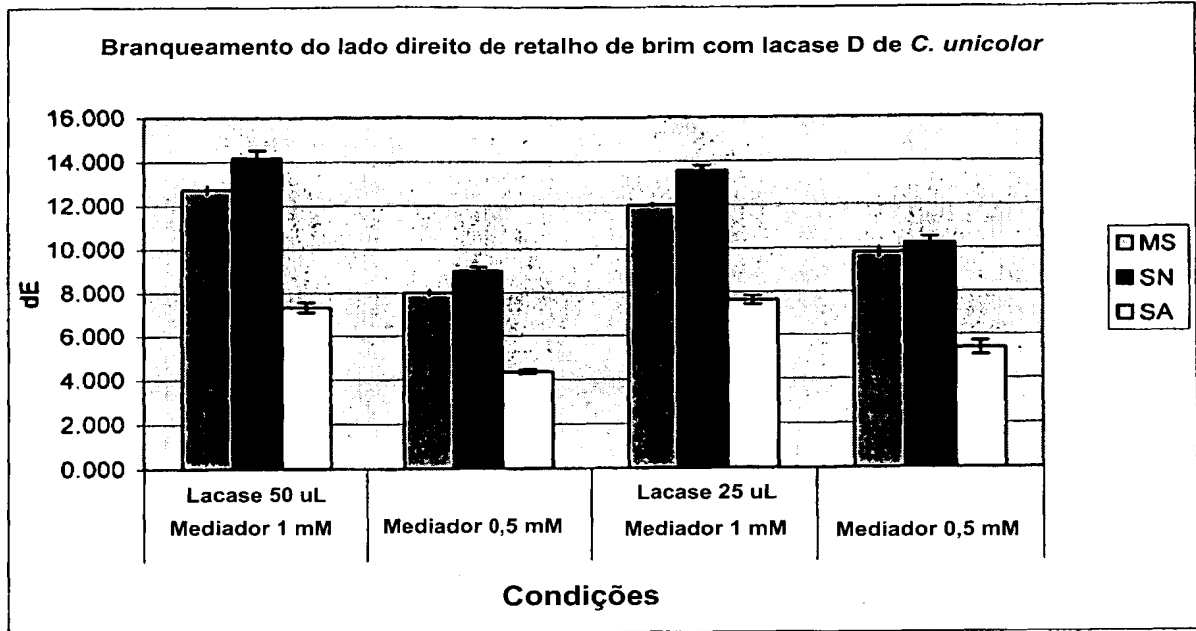


FIG. 8

Diferenças totais de cor para discos de brim branqueados (lado do avesso) como uma função de combinações de lacase/mediador usando lacase D de *C. unicolor*

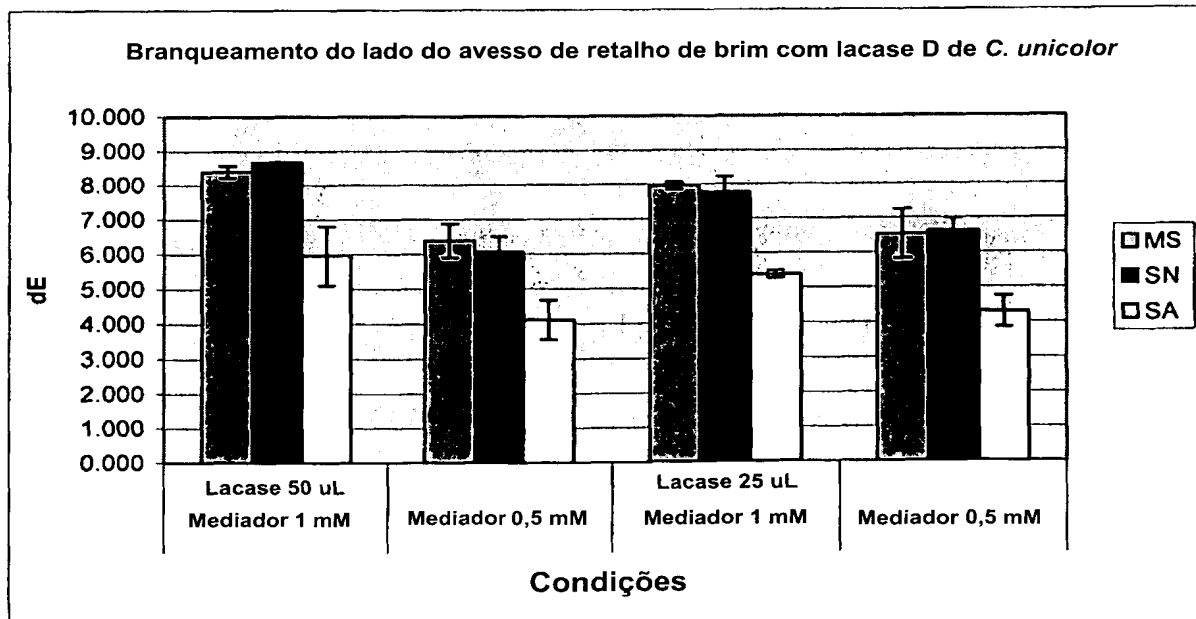


FIG. 9

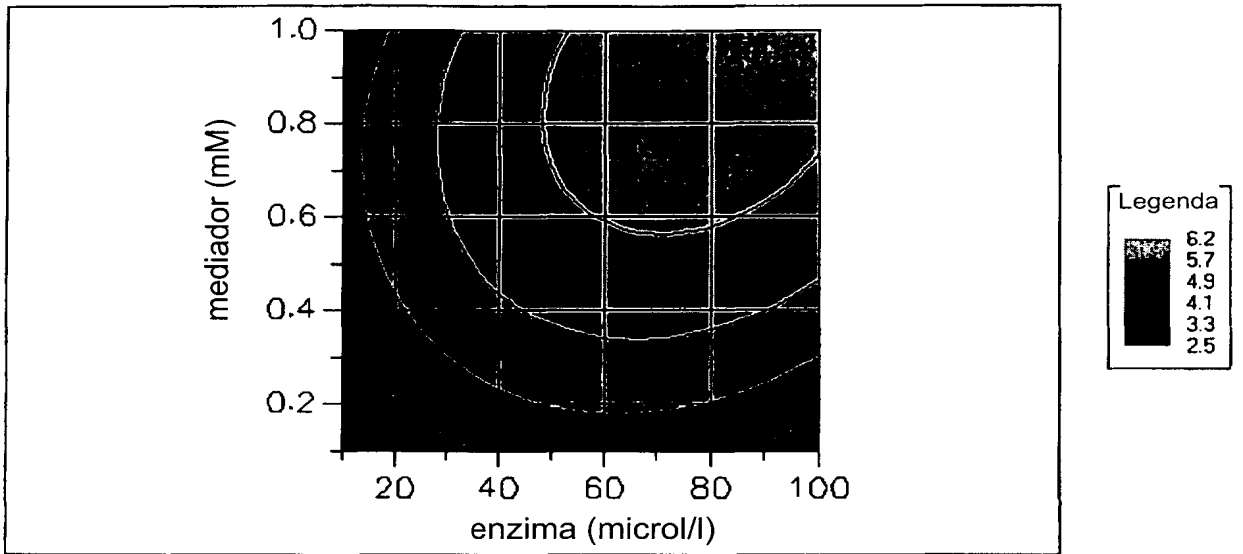
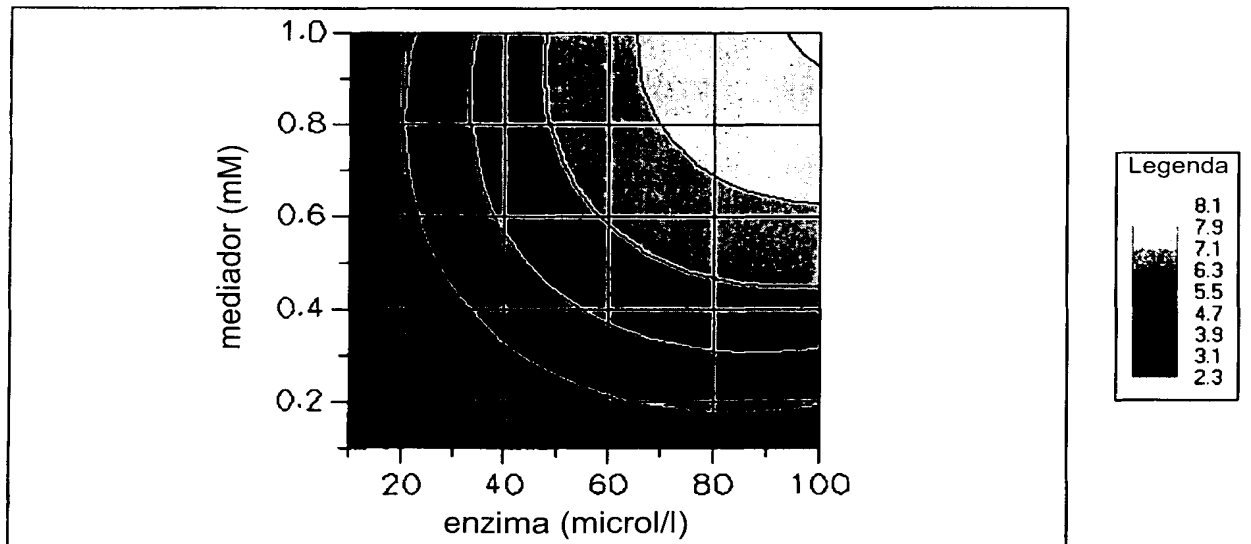


FIG. 10



RESUMO

Patente de Invenção: "**MEDIADORES DE LACASE E MÉTODOS DE USO**".

5 A presente invenção refere-se a mediadores de lacases, incluindo derivados carboxamido e ciano de 2,6-dimetoxifenol que exibem estabilidade hidrolítica melhorada e bom desempenho no alvejamento. As novas enzimas lacase podem ser empregadas em conjunto com os derivados de 2,6-dimetoxifenol dessa invenção para fornecer um método aperfeiçoado para o alvejamento de tecidos de brim.