

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 991**

51 Int. Cl.:
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
D06L 3/00 (2006.01)
D06P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07862884 .9**
96 Fecha de presentación: **12.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2094842**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Nuevas composiciones de laccasas y sus procedimientos de utilización**

30 Prioridad:
18.12.2006 US 875518 P
18.12.2006 US 875454 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.09.2012

73 Titular/es:
Danisco US Inc.
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304 , US

72 Inventor/es:
MCAULIFFE, Joseph C. y
WANG, Huaming

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 386 991 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

Nuevas composiciones de laccasas y sus procedimientos de utilización

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está relacionada con las laccasas y con secuencias de ácidos nucleicos que codifican las laccasas, y con procedimientos enzimáticos para el blanqueo de materiales.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las laccasas son enzimas que contienen cobre conocidas por ser buenos agentes oxidantes en presencia de oxígeno. Las laccasas se encuentran en microbios, hongos, y organismos superiores. Las enzimas laccasas se utilizan para numerosas aplicaciones, incluyendo el blanqueo de pulpa de celulosa y de materiales textiles, el tratamiento de aguas residuales de la pulpa de celulosa, destañado, eliminación industrial del color, detergentes blanqueantes de lavandería, blanqueantes dentarios para el cuidado bucal, y como catalizadores o ayudantes para las reacciones de polimerización y oxidación.

[0003] Las laccasas se pueden utilizar para una gran variedad de aplicaciones en una serie de industrias, incluyendo la industria de los detergentes, la industria del papel y pulpa de celulosa, la industria textil y la industria alimentaria. En una aplicación, se utilizan enzimas que oxidan el fenol como ayudante para la eliminación de manchas de la ropa, tales como manchas de comida, durante el lavado con detergente.

[0004] La mayoría de laccasas presentan un pH óptimo en el intervalo de pH ácido mientras que permanecen inactivas a pH neutros o alcalinos.

[0005] Se sabe que las laccasas son producidas por una amplia variedad de hongos, incluyendo las especies del género *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Botrytis*, *Pleurotus*, *Fomes*, *Phlebia*, *Trametes*, *Polyporus*, *Stachybotrys*, *Rhizoctonia*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Amerosporium*, y *Lentinus*.

Zhang y col. (Enz. Microb. Tech. 39 (2006) 92 – 97) describen la caracterización y capacidad de decoloración de una laccasa procedente de *Panus rudis*.

Michniewicz y col. (Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 69: 682-688) describen la caracterización de dos isoformas de una laccasa procedente de la cepa 137 de *Cerreña unicolor*.

No obstante, aún existe la necesidad de laccasas que tengan diferentes perfiles de comportamiento en diversas aplicaciones.

[0006] Para muchas aplicaciones, la eficacia oxidante de una laccasa se puede mejorar con la utilización de un mediador, también conocido como agente potenciador. Los sistemas que incluyen una laccasa y un mediador son conocidos en la materia como sistemas laccasa-mediador (LMS). Los mismos compuestos también se pueden utilizar para activar o iniciar la acción de la laccasa.

[0007] Existen varios mediadores conocidos para su utilización en un sistema laccasa-mediador. Éstos incluyen HBT (1-hidroxibenzotriazol), ABTS [ácido 2,2'-azinobis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfínico)], NHA (N-hidroxiacetanilida), NEIAA (N-acetil-N-fenilhidroxilamina), HBTO (3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona), y VIO (ácido violúrico). Además, se ha encontrado que existen varios compuestos que contienen NH-OH o N-O que son útiles como mediadores.

[0008] Los grupos funcionales y los sustituyentes tienen grandes efectos sobre la eficacia del mediador. Incluso dentro de la misma clase de compuestos, un sustituyente puede cambiar la especificidad de la laccasa hacia un sustrato, de esta forma incrementando o reduciendo enormemente la eficacia del mediador. Además, un mediador puede ser eficaz para una aplicación particular, pero no apto para otra aplicación. Otro inconveniente de los mediadores actuales es su tendencia a polimerizar durante su utilización. Así, existe la necesidad de descubrir mediadores eficientes para aplicaciones específicas. Una de dichas aplicaciones es el blanqueo de materiales textiles, en donde también es importante que los mediadores no sean indebidamente costosos o peligrosos. A continuación se proporcionan otras aplicaciones del sistema laccasa-mediador.

[0009] Así, existe la necesidad de identificar mediadores adicionales que activen la laccasa, y/o potencien la actividad de enzimas que presenten actividad laccasa.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] En el presente documento se describen nuevas laccasas, secuencias de ácidos nucleicos que codifican

dichas laccasas, y vectores y células hospedadoras para la expresión de las laccasas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 [0011] La Figura 1 es una representación esquemática del plásmido de expresión de *Trichoderma*, pTrex3g-laccaseA, utilizado en el Ejemplo 7. El gen A de la laccasa se puede sustituir con otros genes de la laccasa descritos en el presente documento.
- 10 [0012] La Figura 2 es una representación esquemática del plásmido de expresión de *Aspergillus*, pKB401, utilizado en el Ejemplo 8a. El gen B de la laccasa se puede sustituir con otros genes de la laccasa descritos en el presente documento.
- 15 [0013] La Figura 3 es una representación esquemática del plásmido de expresión de *Aspergillus*, pKB403, utilizado en el Ejemplo 8b. El gen B de la laccasa se puede sustituir con otros genes de la laccasa descritos en el presente documento.
- 20 [0014] La Figura 4 es una representación esquemática del plásmido de expresión de *Trichoderma*, pTrex4-laccaseB, utilizado en el Ejemplo 8d. El gen B de la laccasa está fusionado al gen que codifica el dominio catalítico de CBH1. El gen B de la laccasa se puede sustituir con otros genes de la laccasa descritos en el presente documento.
- 25 [0015] La Figura 5 es una representación esquemática del plásmido de expresión de *Streptomyces* (pKB251) para el gen B de la laccasa optimizado codónicamente, utilizado en el Ejemplo 9.
- 30 [0016] La Figura 6 es una representación esquemática del plásmido de expresión de *Bacillus* (p2JMagk1031nk2E-laccase) para el gen D de la laccasa optimizado codónicamente fusionado al gen que codifica BCE103, utilizado en el Ejemplo 13.
- [0017] La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra los resultados del blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de la especie *Thielavia* y una variedad de mediadores a unas concentraciones de 50 y 500 μ M.
- [0018] La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra los resultados del blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de las especies *Thielavia*, *Myceliophthora* y *Cerreña* y una variedad de mediadores a pH 5.
- 35 [0019] La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra los resultados del blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de las especies *Thielavia*, *Myceliophthora* y *Cerreña* y una variedad de mediadores a pH 7.
- [0020] La Figura 10 es una gráfica con la diferencia total de color para la laccasa D recombinante y el mediador siringamida en función de la concentración de mediador y la concentración de enzima a 60 °C y pH 6.
- 40 [0021] La Figura 11 es una gráfica con la diferencia total de color para la laccasa D recombinante y el mediador siringonitrilo en función de la concentración de mediador y la concentración de enzima a 60 °C y pH 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 45 [0022] A menos que se defina otra cosa en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados entendidos habitualmente por alguien con conocimientos ordinarios en la materia a la que pertenece esta invención. Singleton, y col., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan a alguien con conocimientos un diccionario general con muchos de los términos utilizados en esta invención. A pesar de que se puede utilizar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o puesta a prueba de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Se debe entender que esta invención no está limitada por la metodología, protocolos, y reactivos particulares descritos, puesto que pueden cambiar.

1. Laccasa y enzimas relacionadas con las laccasas

- 60 [0023] En el contexto de esta invención, las laccasas se encuentran en la clasificación de enzimas (EC 1.10.3.2). Se conocen enzimas laccasas de origen microbiano y vegetal.

La invención proporciona una laccasa que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, o que presenta una identidad de secuencia de al menos el 90 % a la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Las laccasas que tienen las secuencias de la SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16 proceden de *Cerreña unicolor*. La

invención también proporciona un ácido nucleico que codifica una laccasa de la invención. En formas de realización específicas, el ácido nucleico puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15.

5 **[0024]** Además, las laccasas se pueden producir mediante un procedimiento que comprende el cultivo de una célula hospedadora transformada con un vector de ADN recombinante que lleva una secuencia de ADN que codifica dicha laccasa, así como secuencias de ADN que permiten la expresión de la secuencia de ADN que codifica la laccasa, en un medio de cultivo en condiciones que permitan la expresión de la enzima laccasa, y la recuperación de la laccasa a partir del cultivo.

10 **[0025]** El vector de expresión se puede transformar en una célula hospedadora adecuada, tal como una célula fúngica, de los que son ejemplos preferidos las especies de *Aspergillus*, lo más preferentemente *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, y especies de *Fusarium*, lo más preferentemente *Fusarium venenatum*. Las células fúngicas se pueden transformar mediante un procedimiento que supone la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos, seguido por la regeneración de la pared celular de una forma ya conocida. La utilización de *Aspergillus* como microorganismo hospedador se describe en el documento EP 238.023. La utilización de *Fusarium* como microorganismo hospedador se describe en los documentos WO 96/00787 y WO 97/08325.

15 **[0026]** Alternativamente, el organismo hospedador puede ser una bacteria, en particular las cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, o *E. coli*. La transformación de células bacterianas se puede llevar a cabo según los procedimientos convencionales, por ejemplo, como se describe en T. Maniatis y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982. La selección de secuencias de ADN apropiadas y la construcción de los vectores también se pueden llevar a cabo mediante procedimientos habituales, cf. T. Maniatis y col., op. cit.

20 **[0027]** El medio utilizado para cultivar las células hospedadoras transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células hospedadoras en cuestión. La enzima expresada puede ser secretada de manera conveniente al medio de cultivo y se puede recuperar de él mediante procedimientos muy conocidos que incluyen la separación de las células del medio mediante centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal como sulfato de amonio, seguido de procedimientos cromatográficos como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

25 **[0028]** En una forma de realización, el hospedador de expresión puede ser *Trichoderma reesei* con la región codificante de la laccasa bajo el control de un promotor de CBH1 y un terminador. (Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5.861.271). El vector de expresión puede ser pTrex3g, como se describe en la Solicitud de patente de EE.UU. N° 11/245.628 presentada el 7 de octubre de 2005 (N° de Expediente del Apoderado GC886).

30 **[0029]** De esta forma se prepararon los siguientes nuevos genes y laccasas:

A. Gen A1 de la laccasa de *Cerreña* procedente de la cepa CBS115.075 (SEQ ID No. 1) que tiene la secuencia

ATGAGCTCAA	AGCTACTTGC	TCTTATCACT	GTCGCTCTCG	TCTTGCCACT	50
AGGCACCGAC	GCCGGCATCG	GTCCTGTTAC	CGACTTGCGC	ATCACCAACC	100
AGGATATCGC	TCCAGATGGC	TTCACCCGAC	CAGCGGTACT	AGCTGGGGGC	150
ACATTCCCTG	GAGCACTTAT	TACCGGTCAG	AAGGTATGGG	AGATCAACTT	200
GGTTGAATAG	AGAAATAAAA	GTGACAACAA	ATCCTTATAG	GGAGACAGCT	250
TCCAAATCAA	TGTCATCGAC	GAGCTTACCG	ATGCCAGCAT	GTTGACCCAG	300
ACATCCATTG	TGAGTATAAT	TTAGGTCCGC	TCTTCTGGCT	ATCCTTTCTA	350
ACTCTTACCG	TCTAGCATTG	GCACGGCTTC	TTTCAGAAGG	GATCTGCGTG	400
GGCCGATGGT	CCTGCCTTCG	TTACTCAATG	CCCTATCGTC	ACCGGAAATT	450
CCTTCCTGTA	CGACTTTGAT	GTTCCCGACC	AACCTGGTAC	TTTCTGGTAC	500
CATAGTCACT	TGTCTACTCA	ATATTGCGAT	GGTCTTCGTG	GCCCGTTTCGT	550
TGTATACGAT	CCAAAGGATC	CTAATAAACG	GTTGTACGAC	ATTGACAATG	600
GTATGTGCAT	CATCATAGAG	ATATAATTCA	TGCAGCTACT	GACCGTGACT	650
GATGCTGCCA	GATCATAACG	TTATTACCCCT	GGCAGACTGG	TACCACGTTC	700
TCGCAAGAAC	TGTTGTGCGA	GTCGCGTAAG	TACAGTCTCA	CTTATAGTGG	750
TCTTCTTACT	CATTTTGACA	TAGGACACCC	GACGCAACCT	TGATCAACGG	800
TTTGGGCCGT	TCTCCAGACG	GGCCAGCAGA	TGCTGAGTTG	GCTGTCAATCA	850
ACGTTAAACG	CGGCAAACGG	TATGTTATTG	AACTCCCGAT	TTCTCCATAC	900
ACAGTGAAT	GACTGTCTGG	TCTAGTTATC	GATTTTCGTCT	GGTCTCCATC	950
TCATGTGACC	CTAATTACAT	CTTTTCTATC	GACAACCATT	CTATGACTGT	1000
CATCGAAGTC	GATGGTGTCA	ACACCCAATC	CCTGACCGTC	GATTCTATTC	1050
AAATCTTCGC	AGGCCAACGA	TACTCGTTCCG	TCGTAAGTCT	CTTTGCACGA	1100
TTACTGCTTC	TTTGTCCATT	CTCTGACCTG	TTTAAACAGC	TCCATGCCAA	1150
CCGTCCTGAA	AACAACCTATT	GGATCAGGGC	CAAACCTAAT	ATCGGTACGG	1200
ATACTACCAC	AGACAACGGC	ATGAACTCTG	CCATTCTGCG	ATACAACGGC	1250
GCACCTGTTG	CGGAACCGCA	AACTGTTCAA	TCTCCAGTC	TCACCCCTTT	1300
GCTCGAACAG	AACCTTCGCC	CTCTCGTGTA	CACTCCTGTG	GTATGTTTCA	1350
AAGCGTTGTA	ATTTGATTGT	GGTCATTCTA	ACGTTACTGC	GTTTGCATAG	1400
CCTGGAAACC	CTACGCCTGG	CGGCGCCGAT	ATTGTCCATA	CTCTTGACTT	1450
GAGTTTGTG	CGGAGTCAAC	ATTCGTAAAG	ATAAGAGTGT	TTCTAATTTT	1500
TTCAATAATA	GGATGCTGGT	CGCTTCAGTA	TCAACGGTGC	CTCGTTCCTT	1550
GATCCTACCG	TCCCCGTTCT	CCTGCAAATT	CTCAGCGGCA	CGCAGAATGC	1600
ACAAGATCTA	CTCCCTCCTG	GAAGTGTGAT	TCCTCTCGAA	TTAGGCAAGG	1650
TCGTGCAATT	AGTCATACCT	GCAGGTGTCG	TCGGTGGACC	TCATCCGTTC	1700
CATCTCCATG	GGGTACGTAA	CCCGAACTTA	TAACAGTCTT	GGACTTACCC	1750
GCTGACAAGT	GCATAGCATA	ACTTCTGGGT	CGTGCGAAGT	GCCGGAACCG	1800
ACCAGTACAA	CTTTAACGAT	GCCATTCTCC	GAGACGTCGT	CAGTATAGGA	1850
GGAACCGGGG	ATCAAGTCAC	CATTTCGTTT	GTGGTATGTT	TCATTCTTGT	1900
GGATGTATGT	GCTCTAGGAT	ACTAACCAGC	TTGCGCGTAT	AGACCGATAA	1950
CCCCGGACCG	TGGTTCCTCC	ATTGCCATAT	CGACTGGCAC	TTGGAAGCGG	2000
GTCTCGCTAT	CGTATTTGCA	GAGGGAATTG	AAAATACTGC	TGCGTCTAAT	2050
TTAACCCCCC	GTACGCGGTT	TCCCTCACAT	CCTGGAGCTA	AGCAGCTTAC	2100
TAACATACAT	TTGCAGAGGC	TTGGGATGAG	CTTTGCCCGA	AGTATAACGC	2150
GCTCAGCGCA	CAAAGAAGG	TTGCATCTAA	GAAAGGCACT	GCCATCTAAT	2200
TTTTGTAAACA	AACAAGGAGG	GTCTCTTGTA	CTTTTATTGG	GATTTCTTTT	2250
TTGGGGTTTA	TTGTTAAACT	TGACTCTACT	ATGTTTGGAA	GACGAAAGGG	2300
GCTCGCGCAT	TTATATACTA	TCTCTCTTGG	CATCACCTGC	AGCTCAATCC	2350
TTCAACCACC	TAA				2363

que codifica la enzima laccasa A1, con la secuencia de la proteína traducida (SEQ ID No. 2)

MSSKLLALIT	VALVPLGTD	AGIGPVTDLR	ITNQDIAPDG	FTRPAVLAGG	50
TFPGALITGQ	KGDSFQINVI	DELTDASMLT	QTSIHWGFF	QKGSAWADGP	100
AFVTQCPIVT	GNSFLYDFDV	PDQPGTFWYH	SHLSTQYCDG	LRGPFVVYDP	150
KDPNKRLYDI	DNDHTVITLA	DWYHVLARTV	VG VATPDATL	INGLGRSPDG	200
PADAE LAVIN	VKR GKRYRFR	LVSISCDPNY	IFSIDNHSMT	VIEVDGVNTQ	250
SLTVDSIQIF	AGQRYSFVLH	ANRPENNYWI	RAKPNIGTDT	TTDSGMNSAI	300
LR YNGAPVAE	PQTVQSPSLT	PLLEQNLRPL	VYTPVPGNPT	PGGADIVHTL	350
DLSFDAGRFS	INGASFLDPT	VPVLLQILSG	TQNAQDLLPP	GSVIPLELGK	400
VVELVIPAGV	VGGPHPFHLH	GHNFWVVRSA	GTDQYNFNDA	ILRDVVSIGG	450
TGDQVTIRFV	TDNPGPWFLH	CHIDWHLEAG	LAIVFAEGIE	NTAASNLTPO	500
AWDELCPKYN	ALSAQKKNP	STT			523

B. Gen A2 de la laccasa de *Cerrera* procedente de la cepa CBS 154.29 (SEQ ID No. 3)

ATGAGCTCAA	AGCTACTTGC	TCTTATTACT	GTCGCTCTCG	TCTTGCCACT	50
AGGCACTGAC	GCCGGCATCG	GTCCTGTTAC	CGACTTGCGC	ATCACCAACC	100
AGGATATCGC	TCCAGATGGC	TTCACCCGAC	CAGCTGTACT	GGCTGGGGGC	150
ACATTCCCCG	GAGCACTGAT	TACCGGTCAG	AAGGTATGGG	AGATCGATTT	200
CGTTGAATAG	AGAAATACAA	CTGAAAACAA	ATTCTTATAG	GGAGACAGCT	250
TCCAAATCAA	TGTCATCGAC	GAGCTTACCG	ATGCCAGCAT	GTTGACCCAG	300
ACATCCATTG	TGAGTATAAT	ATGGGTCCGC	TCTTCTAGCT	ATCCTTTCTA	350
ACTCTTACCC	TCTAGCATTG	GCACGGCTTC	TTCAGAAGG	GATCTGCGTG	400
GGCCGATGGT	CCTGCCTTCG	TTACTCAATG	TCCTATCGTC	ACCGGAAATT	450
CCTTCCTGTA	CGACTTTGAT	GTCCCCGACC	AACCTGGTAC	TTTCTGGTAC	500
CATAGTCACT	TGTCTACTCA	ATATTGCGAT	GGTCTTCGGG	GCCCGTTCGT	550
TGTATACGAT	CAAAGGATC	CTAATAAACG	GTTGTACGAC	ATTGACAATG	600
GTATGTGCAT	CATCATAAAA	ATATAATTCA	TGCAGCTACT	GACCGCGACT	650
GATGCTGCCA	GATCATAACG	TTATTACCCT	GGCAGACTGG	TACCACGTTC	700
TCGCACGAAC	TGTTGTCCGA	GTCGCGTAAG	TACAGTCTGA	CTTATAGTGG	750
TCTTCTTACT	CATTTTGACA	TAGGACACCC	GACGCAACCT	TGATCAACGG	800
TTTGGGCCGT	TCTCCAGACG	GGCCAGCAGA	TGCTGAGTTG	GCTGT CATCA	850
ACGTTAAACG	CGGCAAACGG	TATGTCATTG	AACTCCCGAT	TTCTCCATTC	900
ACATTGAAAT	GACTGTCTGG	TCTAGTTATC	GATTCCGTCT	GGTCTCCATC	950
TCATGTGACC	CTAATTACAT	CTTTTCTATC	GACAACCATT	CTATGACTGT	1000
CATCGAAGTC	GATGGTGTCA	ACACCCAATC	CCTGACCGTC	GATTCTATCC	1050
AAATCTTCGC	AGGCCAACGC	TACTCGTTTCG	TCGTAAGTCT	CTTTGAATGG	1100
TTGGTGCTTT	TTCTGTCCAT	TCTCTAACCT	GTTTATACAG	CTCCATGCCA	1150
ACCGTCTTGA	AAACA ACTAT	TGGATCAGGG	CAAACCTAA	TATCGGTACG	1200
GATACTACCA	CAGACAACGG	CATGAACTCT	GCCATTCTGC	GATACAACGG	1250
CGCACCTGTT	GCGGAACCGC	AAACTGTTCA	ATCTCCCAGT	CTCACCCCTT	1300
TGCTCGAACA	GAACCTTCGC	CCTCTCGTGT	ACACTCCTGT	GGTATGTTTC	1350

ES 2 386 991 T3

AAAGCGTTGT	AATTTGATTG	TGGTCATTCT	AACGTTACTG	CCTTTGCACA	1400
GCCTGGAAAT	CCTACGCCTG	GCGGGGCCGA	TATTGTCCAT	ACTCTTGA	1450
TGAGTTTTGT	GCGGAGTCAA	CATTCGTA	GATAAGAGTG	TTTCTAATTT	1500
CTTCAATAAT	AGGATGCTGG	TCGCTTCAGT	ATCAACGGTG	CCTCGTTTCT	1550
TGATCCTACC	GTCCTGTTC	TCCTGCA	TCTCAGCGGC	ACGCAGAATG	1600
CACAAGATCT	ACTCCCTCCT	GGAAGTGTGA	TTCTCTCGA	ATTAGGCAAG	1650
GTCGTCGAAT	TAGTCATACC	TGCAGGTGTT	GTCGGTGGAC	CTCATCCGTT	1700
CCATCTCCAT	GGGGTACGTA	ACCCGA	ATAACAGTCT	TGGACTTACC	1750
CGCTGACAAG	TGTATAGCAT	AACCTTCTGGG	TCGTGCGAAG	TGCCGGAACC	1800
GACCAAGTACA	ACTTTAACGA	TGCCATTCTC	CGAGACGTCG	TCAGTATAGG	1850
AGGAACCGAG	GATCAAGTCA	CCATTCGATT	CGTGGTATAT	ACTTCATTCT	1900
TGTGGATGTA	TGTGCTCTAG	GATACTAACT	GGCTTGCGCG	TATAGACCGA	1950
TAACCCCGGA	CCGTGGTTCC	TCCATTGCCA	TATCGACTGG	CACTTGGGAAG	2000
CGGGTCTCGC	TATCGTATTT	GCAGAGGGAA	TTGAAAATAC	TGCTGCGTCT	2050
AATCCAACCC	CCCGTATGCG	GTTTCCCACA	CATTCTGAAT	CTAAGCAGCT	2100
TACTAATATA	CATTTGCAGA	GGCTTGGGAT	GAGCTTTGCC	CGAAGTATAA	2150
CGCGCTCAAC	GCACAAAAGA	AGGTTGCATC	TAAGAAAGGC	ACTGCCATCT	2200
AATCCTTGTA	ACAAACAAGG	AGGGTCTCTT	GTACTTTTAT	TGGGATTTAT	2250
TTCTTGGGGT	TTATTGTTCA	ACTTGATTCT	ACTATGTTTG	GAAGTAGCGA	2300
TTACGAAAGG	GGCTTGC	TTTATATA	ATCTTTCTTG	GCACCACCTG	2350
CAGCTCAATC	CTTCAACCAC	CTAA			2374

que codifica la enzima laccasa A2, con la secuencia de la proteína traducida (SEQ ID No. 4)

MSSKLLALIT	VALVPLGTD	AGIGPVDLR	ITNQDIAPDG	FTRPAVLGG	50
TFPGALITGQ	KGDSFQINVI	DELTDASMLT	QTSIHWGFF	QKGSAWADGP	100
AFVTQCPIVT	GNSFLYDFDV	PDQPGTFWYH	SHLSTQYCDG	LRGPFVVYDP	150
KDPNKRLYDI	DNDHTVITLA	DWYHVLARTV	VGVATPDATL	INGLGRSPDG	200
PADAE LAVIN	VKRGKRYRFR	LVSISCDPNY	IFSIDNHSMT	VIEVDGVNTQ	250
SLTVDSIQIF	AGQRYSFVLH	ANRPENNYWI	RAKPNIGTDT	TTDNGMNSAI	300
LRNGAPVAE	PQTVQSPSLT	PLLEQNLRLP	VYTPVPGNPT	PGGADIVHTL	350
DLSFDAGRFS	INGASFLDPT	VPVLLQILSG	TQNAQDLLPP	GSVIPLELGK	400
VVELVIPAGV	VGGPHPFHLH	GHNFWVRS	GTDQYNFND	ILRDVVSIGG	450
TEDQVTIRFV	TDNPGPWFLH	CHIDWHLEAG	LAIVFAEGIE	NTAASNPTPQ	500
AWDELCPKYN	ALNAQKKNP	STT			523

5

C. Gen B1 de la laccasa de *Cerreña* procedente de la cepa CBS1115.075 (SEQ ID No. 5)

ATGTCTCTTC	TTCGTAGCTT	GACCTCCCTC	ATCGTACTAG	TCATTGGTGC	50
ATTTGCTGCA	ATCGGTCCAG	TCACTGACCT	ACATATAGTG	AACCAGAATC	100
TCGACCCAGA	TGGTTTCAAC	CGCCCCACTG	TACTCGCAGG	TGGTACTTTC	150
CCCGGTCCCTC	TGATTTCGTGG	TAACAAGGTA	CGCTTCATAA	CCGCCCTCCG	200
TAGACGTAGG	CTTCGGCTGA	CATGACCATC	ATCTGTAGGG	AGATAACTTT	250
AAAATTAATG	TGATTGACGA	CTTGACAGAG	CACAGTATGC	TCAAGGCTAC	300
GTCCATCGTA	AGTCCCTGAT	TAACGTTTCA	CCTGGTCATA	TCGCTCAACG	350
TCTCGAAGCA	CTGGCATGGG	TTCTTCCAGA	AGGGAACCAA	CTGGGCCGAT	400
GGCCCCGCCT	TTGTCACCCA	ATGTCCTATC	ACATCAGGAA	ACGCCTTCTC	450
GTATGATTTT	AACGTTCCGG	ACCAAGCTGG	TACTTTCTGG	TACCACAGCC	500
ATCTCTCTAC	ACAGTATTGT	GACGGTCTTC	GTGGTGCCTT	TGTCGTCTAT	550
GATCCTAATG	ATCCCAACAA	GCAACTCTAT	GATGTTGATA	ACGGCAAGTT	600
CCTTGCAAT	TTCATTTCTA	TCATATCCTC	ACCTGTATTG	GCACAGAAAG	650
CACCGTGATT	ACCTTGGCTG	ATTGGTATCA	TGCCCTTGCT	CAGACTGTCA	700
CTGGTGTGCG	GTGAGTGACA	AATGGCCCTC	AATTGTTTAC	ATATTTTCTC	750

10

GATTATCATA	TGATAGAGTA	TCTGATGCAA	CGTTGATCAA	CGGATTGGGA	800
CGTTCGGCCA	CCGGCCCCGC	AAATGCCCCCT	CTGGCGGTCA	TCAGTGTCTGA	850
GCGGAATAAG	AGGTCAGTTC	CATAATTATG	ATTATTTCCC	GCGTTACTTC	900
CTAACAAATTA	TTTTTGTATC	CCTCCACAGA	TATCGTTTCC	GATTGGTTTC	950
TATTTCTTGC	GACCCTAACT	TTATTTTCTC	AATTGACCAC	CACCCAATGA	1000
CCGTAATTGA	GATGGACGGT	GTTAATACCC	AATCTATGAC	CGTAGATTTCG	1050
ATCCAAATAT	TCGCAGGTCA	ACGATATTCA	TTTGTCTAG	GTTATTATAA	1100
ACTGCCACC	GATCATCTCT	CACGTAACTG	TTATAGATGC	AAGCCAACCA	1150
ACCAGTTGGA	AATTATTGGA	TCCGCGCTAA	ACCTAATGTT	GGGAACACAA	1200
CTTTCCTTGG	AGGCCTGAAC	TCCGCTATAT	TACGATATGT	GGGAGCCCCT	1250
GACCAAGAAC	CGACCACTGA	CCAAACACCC	AACTCTACAC	CGCTCGTTGA	1300
GGCGAACCTA	CGACCCCTCG	TCTATACTCC	TGTGGTATGT	TGTTCTCGTT	1350
ACATATACCA	AACCTAATAT	GAAGACTGAA	CGGATCTACT	AGCCGGGACA	1400
GCCATTC CCT	GGCGGTGCTG	ATATCGTCAA	GAACTTAGCT	TTGGGTTTCG	1450
TACGTGTATT	TCACTTCCCT	TTTGGCAGTA	ACTGAGGTGG	AATGTATATA	1500
GAATGCCGGG	CGTTTCACAA	TCAATGGAGC	GTCCCTCACA	CCTCCTACAG	1550
TCCCTGTACT	ACTCCAGATC	CTCAGTGGTA	CTCACAATGC	ACAGGATCTT	1600
CTCCCAGCAG	GAAGCGTGAT	CGAACTTGAA	CAGAATAAAG	TTGTCGAAAT	1650
CGTTTTGCCC	GCTGCGGGCG	CCGTTGGCGG	TCCTCATCCT	TTTCACTTAC	1700
ATGGTGTAAG	TATCAGACGT	CCTCATGCC	ATATTGCTCC	GAACCTTACA	1750
CACCTGATTT	CAGCACAATT	TCTGGGTGGT	TCGTAGCGCC	GGTCAAACCA	1800
CATACAATTT	CAATGATGCT	CCTATCCGTG	ATGTTGTCAG	TATTGGCGGT	1850
GCAAACGATC	AAGTCACGAT	CCGATTTGTG	GTATGTATCT	CGTGCCTTGC	1900
ATTCATTCCA	CGAGTAATGA	TCCTTACACT	TCGGGTTCTC	AGACCGATAA	1950
CCCTGGCCCA	TGGTTCCTTC	ACTGTCACAT	TGACTGGCAT	TTGGAGGCTG	2000
GGTTCGCTGT	AGTCTTTGCG	GAGGGAATCA	ATGGTACTGC	AGCTGCTAAT	2050
CCAGTCCCAG	GTAAGACTCT	CGCTGCTTTG	CGTAATATCT	ATGAATTTAA	2100
ATCATATCAA	TTTGCAGCGG	CTTGAATCA	ATTGTGCCCA	TTGTATGATG	2150
CCTTGAGCCC	AGGTGATACA	TGA			2173

que codifica la enzima laccasa B1, con la secuencia de la proteína traducida (SEQ ID No. 6)

MSLLRSLTSL	IVLVIGAFAA	IGPVTDLHIV	NQNLDPDGFN	RPTVLAGGTF	50
PGPLIRGNKG	DNFKINVIDD	LTEHSMLKAT	SIHWHGFFQK	GTNWADGPAF	100
VTQCPITSGN	AFLYDFNVPD	QAGTFWYHSH	LSTQYCDGLR	GAFVVYDPND	150
PNKQLYVDVN	GNTVITLADW	YHALAQTVTG	VAVSDATLIN	GLGRSATGPA	200
NAPLAVISVE	RNKRYRFRLV	SISCDPNFIF	SIDHHPMTVI	EMDGVNTQSM	250
TVDSIQIFAG	QRYSFVMQAN	QPVGNWYIRA	KPNVGNITFL	GGLNSAILRY	300
VGAPDQEPTT	DQTPNSTPLV	EANLRPLVYT	PVPGQPFPGG	ADIVKNLALG	350
FNAGRFTING	ASLTPPTVPV	LLQILSGTHN	AQDLLPAGSV	IELEQNKVVE	400
IVLPAAGAVG	GPHPFHLHGH	NFWVRSAGQ	TTYNFNDAPI	RDVVSIGGAN	450
DQVTIRFVTD	NPGPWFLHCH	IDWHLEAGFA	VVFAEGINGT	AAANPVPAAW	500
NQLCPLYDAL	SPGDT				515

5

D. Gen B2 de la laccasa de *Cerrera* procedente de la cepa CBS 154.29 (SEQ ID No. 7)

ES 2 386 991 T3

CACCGCGATG	TCTCTTCTTC	GTAGCTTGAC	CTCCCTCATC	GTACTAGCCA	50
CTGGTGCAAT	TGCTGCAATC	GGTCCAGTCA	CCGACCTACA	TATAGTGAAC	100
CAGAACTCTG	CCCCAGATGG	TTTAAACCGC	CCCACTGTAC	TCGCAGGTGG	150
TACTTTCCCC	GGTCCTCTGA	TTCGTGGTAA	CAAGGTACGC	TTCATAACCG	200
CCCTCCGTAG	ACGTAGGCTT	CGGCTGACAT	GACCATCATC	TGTAGGGAGA	250
TAACTTTAAA	ATTAATGTGA	TTGACGACTT	GACAGAACAC	AGTATGCTCA	300
AGGCTACGTC	CATTGTAAGT	CCCTGATTAA	CGTTTCACCT	GGTCATATCG	350
CTCAACGTCT	CGAAGCACTG	GCATGGGTTT	TTCCAGAAGG	GAACCAACTG	400
GGCCGATGGC	CCCGCCTTTG	TCACCCAATG	TCCTATCACA	TCAGGAAACG	450

CCTTCTTGTA	TGATTTCAAC	GTTCCGGACC	AAGCTGGTAC	TTTCTGGTAC	500
CACAGCCATC	TCTCYACACA	GTATTGTGAC	GGTCTTCGTG	GTGCCTTGT	550
CGTCTATGAT	CCTAATGATC	CCAACAAGCA	ACTCTATGAT	GTTGATAACG	600
GCAAGTCCCT	TGCATATTTT	AGTTCTATCA	TATCCTCACC	TGTATTGGCA	650
CAGAAAGCAC	CGTGATTACC	TTGGCTGATT	GGTATCATGC	CCTTGCTCAG	700
ACTGTCACTG	GTGTCGCGTG	AGTGACAAAT	GGCCCTTAAT	TGTTACATA	750
TTTTCTGAT	TATCATATGA	TAGAGTATCT	GATGCAACGT	TGATCAACGG	800
ATTGGGACGT	TCGGCCACCG	GCCCCGCAA	TGCCCTCTG	GCGGTCATCA	850
GTGTCGAGCG	GAATAAGAGG	TCAGTTCCAT	AATTATGATT	ATTTCCCGCG	900
TTACTTCCTA	ACGATTATTT	TTGTATCCCT	CCACAGATAT	CGTTTCCGAT	950
TGGTTTCTAT	TTCTTGCGAC	CCTAACTTTA	TTTTCTCAAT	TGACCACCAC	1000
CCAATGACCG	TAATTGAGAT	GGACGGTGT	AATACCCAAT	CTATGACCGT	1050
AGATTTCGATC	CAATATTTG	CAGGTCAACG	ATATTCATTT	GTCGTAGGTT	1100
ATTATAAACT	GCCACCGAT	CATCTCTCAC	GTAAGTGTTA	TAGATGCAAG	1150
CCAACCAACC	AGTTGGAAAT	TATTGGATCC	GYGCTAAACC	TAATGTTGGG	1200
AACACAACCT	TCCTTGAGG	CCTGAACTCC	GCTATATTAC	GATATGTGGG	1250
AGCCCCTGAC	CAAGAACCGA	CCACTGACCA	AACACCCAAC	TCTACACCGC	1300
TCGTGAGGC	GAACCTACGT	CCCCTCGTCT	ATACTCCTGT	GGTATGTTGT	1350
TCTCGTTACA	TATACCAAAC	CTAATATGAG	GACTGAACGG	ATCTACTAGC	1400
CGGGACAGCC	ATTCCCTGGC	GGTGCTGATA	TCGTCAAGAA	CTTAGCTTTG	1450
GGTTTCGTAC	GTGTATTTCA	CTTCCCTTTT	GGCAGTAACT	GAGGTGGAAT	1500
GTATATAGAA	TGCCGGGCGT	TTACAATCA	ATGGAACATC	CTTACACCT	1550
CCTACAGTCC	CTGTACTACT	CCAGATCCTC	AGTGGTACTC	ACAATGCACA	1600
GGATCTTCTT	CCAGCAGGAA	GCGTGATCGA	ACTTGAACAG	AATAAAGTTG	1650
TCGAAATCGT	TCTGCCCGCT	GCGGGCGCCG	TTGGCGGTCC	TCATCCTTTC	1700
CACTTACATG	GTGTAAGTAT	CAGACGTCTT	CATGCCTATA	TTGCTCCGAA	1750
CCTTACACAC	CTGATTTGAG	CACAATTTCT	GGGTGGTTTCG	TAGCGCCGGT	1800
CAAACCACAT	ACAATTTCAA	TGATGCTCCT	ATCCGTGATG	TTGTGAGTAT	1850
TGGCGGTGCA	AACGATCAAG	TCACGATCCG	ATTTGTGGTA	TGTATCTCGT	1900
GCCTTGCAAT	CATTCCACGA	GTAATGATCC	TTACTACTCG	GGTTCTCAGA	1950
CCGATAACCC	TGGCCCATGG	TTCTTCACT	GTCACATTGA	CTGGCATTG	2000
GAGGCTGGGT	TCGCTGTAGT	CTTTGCGGAG	GGAATCAATG	GCACTGCAGC	2050
TGCTAATCCA	GTCCCAGGTA	AGACTCTCGC	TGCTTTGCGT	AATATCTATG	2100
AATTTAAAGC	ATATCAATTT	GCAGCGGCTT	GGAATCAATT	GTGCCCGTTG	2150
TATGATGCCT	TGAGCCCAGG	tGATACATGA	TTACTCGTAG	CTGTGCTTTC	2200
TTATACATAT	TCTATGGGTA	TATCGGAGTA	GCTGTACTAT	AGTATGTAAT	2250
ATACTAGGTG	GGATATGYTG	ATGTTGATTT	ATATAATTTT	GTTTGAAGAG	2300
TGACTTTATC	GACTTGGGAT	TTAGCCGAGT	ACATACTGAT	CTCTCACTAC	2350
AGGCTTGTTT	TGTCTTTGGG	CGCTTACTCA	ACAGTTGACT	GTTTTTGCTA	2400
TTACGCATTG	AACCGCATT	CGGTCYGACT	CGTGTCTCT	ACTGTGACTT	2450
GTATTGGCAT	TCTAGCACAT	ATGTCTCTTA	CCTATAGGAA	CAATATGTCT	2500
CAACACTGTT	CCAAAACCTG	CGTAAACCAA	ATATCGTCCA	TCAGATCAGA	2550
TCATTAACAG	TGCCGCACTA	ACCTAATACA	CTGGCARGGA	CTGTGGAAAT	2600
CCCTATAAAT	GACCTCTAGA	CCGTGAGGTC	ATTGCAAGGT	CGCTCTCCTT	2650
GTCAAGATGA	CCC				2663

que codifica la enzima laccasa B2, con la secuencia de la proteína traducida (SEQ ID No. 8)

MSLLRSLTSL	IVLATGAFAA	IGPVTDLHIV	NQNLDAPGLN	RPTVLAGGTF	50
PGPLIRGNKG	DNFKINVIDD	LTEHSMKAT	SIHWHGFFQK	GTNWADGPAF	100
VTQCPITSGN	AFLYDFNVPD	QAGTFWYHSH	LSTQYCDGLR	GAFVVYDPND	150
PNKQLYDVDN	GNTVITLADW	YHALAQTVTG	VAVSDATLIN	GLGRSATGPA	200
NAPLAVISVE	RNKRYRFRLV	SISCDPNFIF	SIDHHPMTVI	EMDGVNTQSM	250
TVDSIQIFAG	QRYSFVMQAN	QPVGNWYIRA	KPNVGNNTTFL	GGLNSAILRY	300
VGAPDQEPTT	DQTPNSTPLV	EANLRPLVYT	PVPGQPFPGG	ADIVKNLALG	350
FNAGRFTING	TSFTPPTVPV	LLQILSGTHN	AQDLLPAGSV	IELEQNKVVE	400
IVLPAAGAVG	GPHPFHLHGH	NFWVRSAGQ	TTYNFNDAPI	RDVVSIGGAN	450
DQVTIRFVTD	NPGPWFLHCH	IDWHLEAGFA	VVFAEGINGT	AAANPVPAAW	500
NQLCPLYDAL	SPGDT				515

E. Gen B3 (parcial) de la laccasa de *Cerreña* procedente de la cepa ATCC20013 (SEQ ID No. 9)

GTGGGGGCGG	ATCCCTAACT	GTTTCGAATC	GGCACCGAAG	TATGCAGGTG	50
TGACGGAGAT	GAGGCGTTTT	TTCATCTTCC	ACTGCAGTAT	AAAATGTCTC	100
AGGTAACGTC	CAGCTTTTTG	TACCAGAGCT	ACCTCCAAAT	ACCTTTACTC	150
GCAAAGGTTT	CGCGATGTCT	CTTCTTCGTA	GCTTGACCTC	CCTCATCGTA	200
CTAGCCACTG	GTGCATTTGC	TGCAATCGGT	CCAGTCACTG	ACCTACATAT	250
AGTGAACCAG	AATCTCGCCC	CAGATGGTTT	CAACCGCCCC	ACTGTACTCG	300
CAGGTGGTAC	TTTCCCCGGT	CCTCTGATTG	GTGGTAACAA	GGTACGCTTC	350
ATAACCGCCC	TCCGTAGACG	TAGGCTTCGG	CTGACATGAC	CATCATCTGT	400
AGGGAGATAA	CTTTAAAT	AATGTGATTG	ACGACTTGAC	AGAACACAGT	450
ATGCTCAAGG	CCACGTCCAT	TGTAAGTCCC	TGATTAACGT	TTCACCTGGT	500
CATATCGCTC	AACGTCTCGA	AGCACTGGCA	TGGGTTCTTC	CAGAAGGGAA	550
CCAAC TGGC	CGATGGCCCC	GCCTTTGTCA	CCCAATGTCC	TATCACATCA	600
GGAAACTCCT	TCCTGTATGA	TTTCAACGTT	CCGGACCAAG	CTGGTACTTT	650
CTGGTACCAC	AGCCATCTCT	CTACACAGTA	TTGTGACGGT	CTTCGTGGTG	700
CCTTTGTGCT	CTATGATCCT	AATGATCCCA	ACAAGCAACT	CTATGATGTT	750
GATAACGGCA	AGTCCCTTGC	ATATTTTATT	TCTATCATAT	CCTCACCTGT	800
ATTGGCACAG	AAAGCACCGT	GATTACCTTG	GCTGATTGGT	ATCATGCCCT	850
TGCTCAGACT	GTCACTGGTG	TCGCGTGAGT	GACAAATGGC	CCTCAATTGT	900
TCACATATTT	TCCTGATTAT	CATATGATAG	AGTATCTGAT	GCAACGTTGA	950
TCAACGGATT	GGGACGTTTC	GCCACCGGCC	CCGCAAATGC	CCCTCTGGCG	1000
GTCATCAGTG	TCGAGCGGAA	TAAGAGGTCA	GTTCCATAAT	TATGATTATT	1050
TCCCGCGTTA	CTTCCTAACA	ATTATTCTTG	TATCCCTCCA	CAGATATCGC	1100
TTCCGATTGG	TGTCTATTTT	TTGCGACCTT	AACTTTATTT	TCTCAATTGA	1150
TCACCACCCA	ATGACCGTAA	TTGAGATGGA	CGGTGTTAAT	ACCCAATCTA	1200
TGACCGTAGA	TTCGATCCAA	ATATTCGCAG	GTCAACGATA	TTCATTTGTC	1250
GTAGGTTATT	ATAAACTGCC	CACCGATCAT	CTCTCACGTA	ACTGTTATAG	1300
ATGCAAGCCA	ACCAACCRGT	TGGAAATTAT	TGGATCC		1337

5

que codifica la enzima laccasa B3, con la secuencia parcial de la proteína traducida (SEQ ID No. 10)

MSLLRSLTSL	IVLATGAFAA	IGPVTDLHIV	NQNLDAPGFN	RPTVLAGGTF	50
PGPLIRGNKG	DNFKINVIDD	LTEHSMKAT	SIHWHGFFQK	GTNWADGPAF	100
VTQCPITSGN	SFLYDFNVPD	QAGTFWYHSH	LSTQYCDGLR	GAFVVYDPND	150
PNKQLYDVDN	GKTVITLADW	YHALAQTVTG	VAVSDATLIN	GLGRSATGPA	200
NAPLAVISVE	RNKRYRFRLV	SISCDPNFIF	SIDHHPMTVI	EMDGVNTQSM	250
TVDSIQIFAG	QRYSFVMQAN	QPVGNWYI			278

ES 2 386 991 T3

F. Gen C (parcial) de la laccasa de *Cerreña* procedente de la cepa CBS 154.29 (SEQ ID No. 11)

TGCAATCGGA	CCGGTBGCTG	ACCTTCACAT	TACGGACGAT	ACCATTGCCC	50
CCGATGGTTT	CTCTCGTCCT	GCTGTTCTCG	CTGGCGGGGG	TTTCCCTGGC	100
CCTCTCATCA	CCGAAACAA	GGTAATGCCT	AATGGTTGCG	TCTTTGTTGG	150
TGCTCTCATT	CATCCACGAC	ATTTTGTACC	AGGGCGACGC	CTTTAAACTC	200
AATGTCATCG	ATGAACTAAC	GGACGCATCC	ATGCTGAAGY	CGACTTCCAT	250
CGTAAGTCTC	GCTGTATTGC	TCCTTGAGCC	ATTCATTGA	CTATAACTAC	300
AACCAGCACT	GGCATGGATT	CTTCCAAAAG	GGTACTAATT	GGGCAGATGG	350
TCCCGCTTTT	GTGAACCAAT	GCCCCATCAC	CACGGGAAAC	TCCTTCTTGT	400
ACGACTTCCA	GGTTCCTGAT	CAAGCTGGTA	AGCATGAGAT	TACTACTAGGA	450
AAGTTTAATT	TAATAACTAT	TCAATCAGGA	ACCTACTGGT	ATCATAGTCA	500
TTTGTCTACG	CAATACTGTG	ATGGTCTCAG	AGGTGCATTG	GTTGTCTACG	550
ACCCTTCAGA	TCCTCACAA	GATCTCTACG	ACGTGACGA	CGGTGAGCTT	600
TGCTTTTTTC	ATTGGTATCC	ATTATCGCTC	ACGTGTCATT	ACTGCGCCAC	650
AGAAAGTACC	GTCATCACTT	TGGCTGATTG	GTATCATACT	TTGGCTCGTC	700
AGATTGTTGG	CGTTGCGTGA	GTAGTCTTGT	ACCGACTGAA	ACATATTCCA	750
GTTGCTGACT	TCCCCACAGC	ATTTCTGATA	CTACCTTGAT	AAACGGTTTG	800
GGCCGCAATA	CCAATGGTCC	GGCTGATGCT	GCTCTTGCTG	TGATCAATGT	850
TGACGCTGGC	AAACGGTGTG	TCCAGATTAC	TATACTCCCC	ATGACGTCTC	900
AATGCTGATG	TGTACTACTT	CCAGGTACCG	TTTCCGTCTT	GTTTCCATAT	950
CCTGTGACCC	CAATTGGGTA	TTCTCGATTG	ACAACCATGA	CTTTACGGTC	1000
ATTGAAGTCG	ATGGTGTTAA	CAGTCAACCT	CTCAACGTCG	ATTCTGTTCA	1050
GATCTTCGCC	GGACAACGTT	ACTCGTTCGT			1080

5

que codifica la enzima laccasa C, con la secuencia parcial de la proteína traducida (SEQ ID No. 12)

AIGPVADLHI	TDDTIAPDGF	SRPAVLAGGG	FPGPLITGNK	GDAFKLNVID	50
ELTDASMLKX	TSIHWGFFQ	KGTNWADGPA	FVNQCPITTG	NSFLYDFQVP	100
DQAGTYWYHS	HLSTQYCDGL	RGAFVVYDPS	DPHKDLYDVD	DESTVITLAD	150
WYHTLARQIV	GVAISDTTLI	NGLGRNTNGP	ADAALAVINV	DAGKRYRFRL	200
VSISCDPNWV	FSIDNHDFTV	IEVDGVNSQP	LNVDVSVQIFA	GQRYSF	246

10

G. Gen D1 de la laccasa de *Cerreña* procedente de la cepa CBS154.29 (SEQ ID No. 13)

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
TTCACACTCT	CGAGATGGGA	TTGAACTCGG	CTATTACATC	GCTTGCTATC	300
TTAGCTCTGT	CAGTCGGAAG	CTATGCTGCA	ATTGGGCCCG	TGGCCGACAT	350
ACACATTGTC	AACAAAGACC	TTGCTCCAGA	TGGCGTACAA	CGTCCAACCG	400
TGCTTGCCGG	AGGCACTTTT	CCTGGGACGT	TGATCACCGG	TCAGAAAGTA	450
AGGGATATTA	GTTTGCCTCA	AAGAGCCAAC	CAAACTAAC	CGTCCCCTAC	500
TATAGGGTGA	CAACTTCCAG	CTCAATGTCA	TCGATGATCT	TACCGACGAT	550
CGGATGTTGA	CGCCAACTTC	CATTGTGAGC	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
CAAAGACCTA	TACGATGTTG	ATGACGGTGG	GTTCCAAATA	TTTGTCTGC	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
CGGACCCGCT	GATGCTGAGC	TGGCTGTTAT	CAGCGTTGAA	CATAACAAAC	1150
GGTATGTCAT	CTCTACCCAG	TATCTTCTCT	CCTGCTCTAA	TTCGCTGTTT	1200
CACCATAGAT	ACCGTTTCCG	TTTGGTTTCG	ATTTCGTGCG	ACCCCAACTT	1250
TACCTTCTCC	GTTGATGGTC	ATAATATGAC	TGTCATCGAA	GTCGATGGTG	1300
TCAACACACG	ACCCCTGACC	GTTGACTCTA	TTCAAATCTT	CGCCGGACAG	1350
AGGTATTCTT	TTGTCGTAAG	TAAATCGATA	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
ACTCGTACCT	GCTCCTGTGG	TATGTCTTGT	CGCGCTGTTC	CATCGCTATT	1650
TCATATTAAC	GTTTTGTTTT	TGTC AAGCCT	GGAAACGCTG	TTCCAGGTGG	1700
CGCAGACATC	AATCACAGGC	TTAACTTAAC	TTTCGTACGT	ACACCTGGTT	1750
GAAACATTAT	ATTTCCAGTC	TAACCTCTCT	TGTAGAGTAA	CGGCCTCTTC	1800
AGCATCAACA	ACGCCTCCTT	CACTaATCCT	TCGGTCCCCG	CCTTATTACA	1850
AATTCTGAGC	GGTGCTCAGA	ACGCTCAAGA	TTTACTTCCA	ACGGGTAGTT	1900
ACATTGGCCT	TGAACTAGGC	AAGGTTGTGG	AGCTCGTTAT	ACCTCCTCTG	1950
GCAGTTGGAG	GACCGCACCC	TTTCCATCTT	CATGGCGTAA	GCATAACCACA	2000
CTCCCGCAGC	CAGAATGACG	CAAATAATC	ATGATATGCA	GCACAATTTC	2050
TGGGTCGTCC	GTAGTGCAGG	TAGCGATGAG	TATAACTTTG	ACGATGCTAT	2100
CCTCAGGGAC	GTCGTRAGCA	TTGGAGCGGG	GACTGATGAA	GTCACAATCC	2150
GTTTCGTGGT	ATGTCTCACC	CCTCGCATTT	TGAGACGCAA	GAGCTGATAT	2200
ATTTTAACAT	AGACCGACAA	TCCGGGCCCG	TGGTTCCTCC	ATTGCCATAT	2250
TGATTGGCAT	TTGGAGGCAG	GCCTTGCCAT	CGTCTTCGCT	GAGGGCATCA	2300
ATCAGACCGC	TGCAGCCAAC	CCAACACCCC	GTACGTGACA	CTGAGGGTTT	2350
CTTTATAGTG	CTGGATTACT	GAATCGAGAT	TTCTCCACAG	AAGCATGGGA	2400
TGAGCTTTGC	CCCAAATATA	ACGGGTTGAG	TGCGAGCCAG	AAGGTCAAGC	2450
CTAAGAAAGG	AACTGCTATT	TAAACGTGGT	CCTAGACTAC	GGGCATATAA	2500
GTATTCGGGT	AGCGCGTGTG	AGCAATGTTT	CGATACACGT	AGATTCATCA	2550
CCGGACACGC	TGGGACAATT	TGTGTATAAT	GGCTAGTAAC	GTATCTGAGT	2600
TCTGGTGTGT	AGTTCAAAGA	GACAGCCCTT	CCTGAGACAG	CCCTTCCTGA	2650
GACAGCCCTT	CCTGAGACGT	GACCTCCGTA	GTCTGCACAC	GATACTYCTA	2700
AATACGTATG	GCAAGATGAC	AAAGAGGAGG	ATGTGAGTTA	CTACGAACAG	2750
AAATAGTGCC	CGGCCTCGGA	GAGATGTTCT	TGAATATGGG	ACTGGGACCA	2800
ACATCCGGA					2809

que codifica la enzima laccasa D1, con la secuencia de la proteína traducida (SEQ ID No. 14)

MGLNSAITSL	AILALSVGSY	AAIGPVADIH	IVNKDLAPDG	VQRPTVLAGG	50
TFPGTLITGQ	KGDNFQLNVI	DDLTDRLMLT	PTSIHWHGFF	QKGTAWADGP	100
AFVTQCPIIA	DNSFLYDFDV	PDQAGTFWYH	SHLSTQYCDG	LRGAFVVYDP	150
NDPHKDLYDV	DDGGTVITLA	DWYHVLAQTV	VGAATPDSTL	INGLGRSQTG	200
PADAEALAVIS	VEHNKRYRFR	LVSISCDPNF	TFSVDGHNMT	VIEVDGVNTR	250
PLTVDSIQIF	AGQRYSFVLN	ANQPEDNYWI	RAMPNIGRNT	TTLDGKNAAI	300
LRYKNASVEE	PKTVGGPAQS	PLNEADLRPL	VPAPVPGNAV	PGGADINHRL	350
NLTFSNGLFS	INNASFTNPS	VPALLQILSG	AQNAQDLLPT	GSYIGLELGK	400
VVELVIPPLA	VGGPHPFHLH	GHNFWVVRSA	GSDEYNFDDA	ILRDVVSIGA	450
GTDEVTIRFV	TDNPGPWFLH	CHIDWHLEAG	LAIVFAEGIN	QTAAANPTPQ	500
AWDELCPKYN	GLSASQKVKP	KKGTAI			526

5

H. Gen D2 de la laccasa de *Cerreña* procedente de la cepa CBS115.075 (SEQ ID No. 15)

GATCTGGACG	ATGGTATATA	AGACGATGGT	ATGAGACCCA	TGAAGTCTGA	50
ACACTTTTGC	TCTCTGACAT	TTCATGGTTC	ATACTCTCGA	GATGGGATTG	100
AACTCGGCTA	TTACATCGCT	TGCTATCTTA	GCTCTGTCAG	TCGGAAGCTA	150
TGCTGCAATT	GGGCCCGTGG	CCGACATACA	CATTGTCAAC	AAAGACCTTG	200
CTCCAGATGG	TGTACAACGT	CCAACCGTGC	TCGCCGGAGG	CACTTTTCCT	250
GGGACGTTGA	TCACCGGTCA	GAAAGTAAGG	AATATTAGTT	TGCGTCAAAG	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
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	CATTATATTG	ATAGTATCCA	750
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
TCTCTCCTGC	TTTAATTCGC	TGTTTCACCA	TAGATACCGA	TTCCGTTTGG	1050
TTTCGATTTT	GTGCGACCCC	AACTTTACCT	TCTCCGTTGA	TGGTCATAAT	1100
ATGACTGTCA	TCGAAGTCGA	CGGTGTCAAC	ACACGACCCC	TGACCGTTGA	1150
CTCTATTCAA	ATCTTCGCCG	GACAGAGGTA	TTCTTTTGTC	GTAAGTTAAT	1200
CGATATATTC	TCCCTATTAC	CCCTGTGTAA	TTGATGTCAA	CAGCTCAATG	1250
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	TGTTCCATCG	CTATTTTATA	TTAACGTTTT	GTTTTTGTCA	1500
AGCCTGGAAG	CGCTGTTCCA	GGTGGCGCAG	ACATCAATCA	CAGGCTTAAC	1550
TTAACTTTTC	TACGTACACC	TGGTTGAAAC	ATTATATTTT	CAGTCTAACC	1600
TCTTGTAGAG	TAACGGCCTT	TTCAGCATCA	ACAACGCCTC	CTTCACTAAT	1650
CCTTCGGTCC	CCGCCTTATT	ACAAATTCGT	AGCGGTGCTC	AGAACGCTCA	1700
AGATTTACTT	CCAACGGGTA	GTTACATTGG	CCTTGAACTA	GGCAAGGTTG	1750
TGGAGCTCGT	TATACCTCCT	CTGGCAGTTG	GAGGACCGCA	CCCTTTCCAT	1800
CTTCATGGCG	TAAGCATACC	ACACTCCCAG	AGCCAGAATG	ACGCAAACCTA	1850
ATCATGATAT	GCAGCACAAT	TTCTGGGTCG	TCCGTAGTGC	AGGTAGCGAT	1900
GAGTATAACT	TTGACGATGC	TATCCTCAGG	GACGTCGTGA	GCATTGGAGC	1950
GGGACTGAT	GAAGTCACAA	TCCGTTTCGT	GGTATGTCTC	ACCCCTCGCA	2000
TTTTGAGACG	CAAGAGCTGA	TATATTTTAA	CATAGACCGA	CAATCCGGGC	2050
CCGTGGTTCC	TCCATTGCCA	TATTGATTGG	CATTTGGAGG	CAGGCCCTTG	2100
CATCGTCTTC	GCTGAGGGCA	TCAATCAGAC	CGCTGCAGCC	AACCCAACAC	2150
CCCGTACGTG	AACTGAGGGG	TTTCTTTATA	GTGCTGGATT	ACTGAATCGA	2200
GATTTCTCCA	CAGAAGCATG	GGATGAGCTT	TGCCCAAAT	ATAACGGGTT	2250
GAGTGCAGC	CAGAAGGTCA	AGCCTAAGAA	AGGAACTGCT	ATTTAAACG	2299

que codifica la enzima laccasa D2, con la secuencia de la proteína traducida (SEQ ID No. 16)

MGLNSAITSL	AILALSVGSY	AAIGPVADIH	IVNKDLAPDG	VQRPTVLAGG	50
TFPGLITGQ	KGDNFQLNVI	DDLTDRLMT	PTSIHWHGFF	QKGTAWADGP	100
AFVTQCPIIA	DNSFLYDFDV	PDQAGTFWYH	SHLSTQYCDG	LRGAFVVYDP	150
NDPHKDLYDV	DDGGTVITLA	DWYHVLQTV	VGAATPDSTL	INGLGRSQTG	200
PADAEALAVIS	VEHNKRYRFR	LVSISCDPNF	TFSVDGHNMT	VIEVDGVNTR	250
PLTVDSIQIF	AGQRYSFVLN	ANQPDDNYWI	RAMPNIGRNT	TTLDGKNAAI	300
LRYKNASVEE	PKTVGGPAQS	PLNEADLRPL	VPAPVPGNAV	PGGADINHRL	350
NLTFSNGLFS	INNASFTNPS	VPALLQILSG	AQNAQDLLPT	GSYIGLELGK	400
VVELVIPPLA	VGGPHPFHLH	GHNFWVVRSA	GSDEYNFDDA	ILRDVVSIGA	450
GTDEVTIRFV	TDNPGPWFLH	CHIDWHLEAG	LAIVFAEGIN	QTAAANPTPQ	500
AWDELCPKYN	GLSASQKVKP	KKGTAI			526

I. Gen E (parcial) de la laccasa de *Cerrena* procedente de la cepa CBS 154.29 (SEQ ID No. 17)

TGCAATCGGA	CCGGTGGCCG	ACCTCAAGAT	CGTAAACCGA	GACATTGCAC	50
CTGACGGTTT	TATTCGTCCC	GCCGTTCTCG	CTGGAGGGTC	GTTCCCTGGT	100
CCTCTCATT	CAGGGCAGAA	AGTACGTTAC	GCTATCTCGG	TGCTTTGGCT	150
TAATTAAACT	ATTTGACTTT	GTGTTCTCTT	AGGGGAACGA	GTTCAAATC	200
AATGTAGTCA	ATCAACTGAC	CGATGGTCT	ATGTTAAAAT	CCACCTCAAT	250
CGTAAGCAGA	ATGAGCCCTT	TGCATCTCGT	TTTATTGTTA	ATGCGCCCAC	300
TATAGCATTG	GCATGGATTC	TTCCAGAAGG	GAACAACTG	GGCAGACGGT	350
CCTGCGTTCG	TGAACCAATG	TCCAATCGCC	ACGAACAATT	CGTTCCTGTA	400
TCAGTTTACC	TCACAGGAAC	AGCCAGGTGA	GTATGAGATG	GAGTTCATCC	450
GAGCATGAAC	TGATTTATTT	GGAACCTAGG	CACATTTTGG	TACCATAGTC	500
ATCTTTCCAC	ACAATACTGC	GATGGTTTGC	GAGGGCCACT	CGTGGTGTAT	550
GACCCACAAG	ACCCGCATGC	TGTTCTCTAC	GACGTCGACG	ATGGTTCGTA	600
CTTCGCATAT	CCACGCTCGC	TTTCATACAA	TGTAAACTTT	GTTCCCTCCAG	650
AAAGTACAAT	CATCACGCTC	GCGGATTGGT	ATCATACTTT	GGCTCGGCAA	700
GTGAAAGGCC	CAGCGTAAGG	CACTTTAGTG	TTTCCTCATA	GTCCAAGAAA	750
TTCTAACACG	CCTTCTTCAT	CAGGGTTCCT	GGTACGACCT	TGATCAACGG	800
GTTGGGGCGT	CACAACAATG	GTCCTCTAGA	TGCTGAACTA	GCGGTGATCA	850
GTGTTCAAGC	CGGCAAACGG	CAAGTTCAAT	TCACACTTTT	CACTCTGTAC	900
CTTCTTCCTG	ACATTCTTTT	CTTGTAGTTA	CCGCTTCCGC	CTGATTTCAA	950
TTTCATGCGA	TCCCAACTAC	GTATTCTCCA	TTGATGGCCA	TGATATGACT	1000
GTCATCGAAG	TGGATAGTGT	TAACAGTCAA	CCTCTCAAGG	TAGATTCTAT	1050
CCAAATATTT	GCAGGTCAGA	GATATTCTGT	CGTGGTGAAG	CAGATCAGGG	1100
CATATCCTTT	TGTCGATACG	TCATTGACCA	TATAATGCTA	CAAGCTGAAT	1150
GCCAACCAAC	CAG				1163

5

que codifica la enzima laccasa E, con la secuencia parcial de la proteína traducida (SEQ ID No. 18)

AIGPVADLKI	VNRDIAPDGF	IRPAVLAGGS	FPGPLITGQK	GNEFKINVVN	50
QLTDGSMKLS	TSIHWHGFFQ	KGTNWADGPA	FVNQCPIATN	NSFLYQFTSQ	100
EQPGTFWYHS	HLSTQYCDGL	RGPLVVYDPQ	DPHAVLYDVD	DESTIITLAD	150
WYHTLARQVK	GPAVPGTTLI	NGLGRHNNGP	LDAELAVISV	QAGKRQVQFT	200
LFTLYRFRLI	SISCDPNYVF	SIDGHDMTVI	EVDSVNSQPL	KVDSIQIFAG	250
QRYSFVLNAN	QP				262

10

[0030] El término "% de identidad" en el presente documento se refiere al nivel de identidad de secuencia de los ácidos nucleicos o aminoácidos entre la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una laccasa descrita en el

presente documento o la secuencia de aminoácidos de la laccasa, cuando se alinean utilizando un programa de alineamiento de secuencias.

5 **[0031]** Por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, una identidad de secuencia del 80 % se determina mediante un algoritmo, y por consiguiente un homólogo de una secuencia dada tiene una identidad de secuencia superior al 80 % a lo largo de un tramo de la secuencia dada. Niveles ejemplares de identidad de secuencia incluyen, pero no están limitados a, una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95, 98 % o superior a una secuencia dada, por ejemplo, la secuencia codificante para una laccasa, como se describe en el presente documento.

10 **[0032]** Ejemplos de programas de ordenador que se pueden utilizar para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, disponible públicamente en Internet en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Véase también, Altschul, y col., 1990 y Altschul, y col., 1997.

15 **[0033]** Las búsquedas de secuencia normalmente se llevan a cabo utilizando el programa BLASTN cuando se evalúa una secuencia dada de ácidos nucleicos en relación a secuencias de ácidos nucleicos en las Secuencias de ADN del GenBank y otras bases de datos públicas. El programa BLASTX se prefiere para la búsqueda de secuencias de ácidos nucleicos que hayan sido traducidas en todos los marcos de lectura contra secuencias de aminoácidos en las Secuencias de proteínas del GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTN como
20 BLASTX se ejecutan utilizando los parámetros por defecto y una penalización de espacio abierto de 11,0, y una penalización de espacio extendido de 1,0, y utilizan la matriz BLOSUM-62. (Véase, por ejemplo, Altschul, y col., 1997).

25 **[0034]** Se puede llevar a cabo un alineamiento de secuencias seleccionadas con el fin de determinar el "% de identidad" entre dos o más secuencias utilizando, por ejemplo, el programa CLUSTAL-W en MacVector versión 6.5, funcionando con los parámetros por defecto, que incluyen una penalización de espacio abierto de 10,0, una penalización de espacio extendido de 0,1, y una matriz de similitud BLOSUM 30.

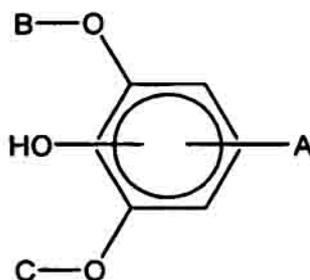
30 II. Mediadores

[0035] En una forma de realización, el sistema de oxidación enzimático comprende adicionalmente uno o más agentes mediadores químicos que potencian la actividad de la enzima laccasa. El término "mediador químico" (o "mediador" que se pueden utilizar aquí indistintamente) se define en el presente documento como un compuesto químico que actúa como mediador redox para transferir electrones eficazmente entre la enzima que presenta actividad oxidasa y el colorante. Los mediadores químicos también se conocen en la materia como potenciadores y aceleradores.

35 **[0036]** El mediador químico puede ser un compuesto fenólico, por ejemplo, siringato de metilo, y compuestos relacionados, como se describe en los documentos WO 95/01426 y 96/12845. El mediador químico también puede ser un compuesto N-hidroxi, un compuesto N-oxima, o un compuesto N-óxido, por ejemplo, N-hidroxibenzotriazol, ácido violúrico, o N-hidroxiacetanilida. El mediador químico también puede ser un compuesto de fenoxacina/fenotiacina, por ejemplo, fenotiacina-10-propionato. El mediador químico adicionalmente puede ser ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). Existen otros mediadores químicos muy conocidos en la materia. Por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO 95/01426 son conocidos por potenciar la
45 actividad de una laccasa. En formas de realización particulares, el mediador puede ser acetosiringona, siringato de metilo, siringato de etilo, siringato de propilo, siringato de butilo, siringato de hexilo, o siringato de octilo.

[0037] Preferentemente, el mediador es 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol o uno de sus derivados N-sustituídos tales como, por ejemplo, 4-(N-metil-carboxamido)-2,6-dimetoxifenol, 4-[N-(2-hidroxietil)-carboxamido]-2,6-dimetoxifenol, o 4-(N,N-dimetil-carboxamido)-2,6-dimetoxifenol.

50 **[0038]** El mediador utilizado en la presente invención se puede describir mediante la fórmula siguiente:



en la que A es un grupo tal como -R, -D, -CH = CH-D, -CH = CH-CH = CH-D, -CH = N-D, -N = N-D, o -N = CH-D, en la que D se selecciona del grupo constituido por -CO-E, -SO₂-E, -CN, -NXY, y -N⁺XYZ, en la que E puede ser -H, -OH, -R, -OR, o -NXY, y X e Y y Z pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan entre -H, -OH, -OR y -R; siendo R un alquilo C₁-C₁₆, preferentemente un alquilo C₁-C₈, dicho alquilo que puede estar saturado o insaturado, ramificado o no ramificado y opcionalmente sustituido con un grupo carboxi, sulfo o amino; y B y C pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan entre C_mH_{2m+1}; 1 ≤ m ≤ 5.

[0039] En una forma de realización, A en la fórmula anteriormente mencionada es -CN o -CO-E, en la que E puede ser -H, -OH, -R, -OR, o -NXY, en donde X e Y pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan entre -H, -OH, -OR y -R, siendo R un alquilo C₁-C₁₆, preferentemente un alquilo C₁-C₈, dicho alquilo que puede estar saturado o insaturado, ramificado o no ramificado y opcionalmente sustituido con un grupo carboxi, sulfo o amino; y B y C pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan entre C_mH_{2m+1}; 1 ≤ m ≤ 5.

[0040] En la fórmula anteriormente mencionada A puede estar en posición *meta* al grupo hidroxilo en lugar de estar en posición *para*, tal y como está representado.

[0041] En formas de realización particulares, el mediador puede ser acetosiringona, siringato de metilo, siringato de etilo, siringato de propilo, siringato de butilo, siringato de hexilo, o siringato de octilo. Preferentemente, el mediador es 4-ciano-2,6-dimetoxifenol, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol o uno de sus derivados N-sustituidos tales como, por ejemplo, 4-(N-metil-carboxamido)-2,6-dimetoxifenol, 4-[N-(2-hidroxietil)-carboxamido]-2,6-dimetoxifenol, o 4-(N,N-dimetil-carboxamido)-2,6-dimetoxifenol.

[0042] El mediador de la invención puede estar presente a concentraciones comprendidas entre 0,005 – 1000 μmol por g de tejido vaquero, preferentemente entre 0,05 – 500 μmol por g de tejido vaquero, más preferentemente entre 0,5 – 100 μmol por g de tejido vaquero.

[0043] Los mediadores se pueden preparar mediante procedimientos conocidos por el facultativo experto, tales como los descritos en los documentos WO 97/11217, WO 96/12845 y US 5752980.

III. Utilidad

[0044] Las aplicaciones industriales de las laccasas incluyen el blanqueo de pulpa de celulosa y papel y el blanqueo de materiales textiles, por ejemplo, de tejidos vaqueros teñidos de índigo. También se ha encontrado utilidad para las laccasas en la tinción del pelo (véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/33836 y WO 95/33837). La Patente europea N^o 0504005 describe que las laccasas se pueden utilizar para teñir la lana.

[0045] Las laccasas descritas en el presente documento son útiles en la tinción y blanqueo de materiales textiles, fibras, hilos y similares. Las laccasas también son útiles en el tratamiento de aguas residuales, la deslinificación de la pulpa de celulosa, la despolimerización de agregados de elevado peso molecular, la decoloración de papel residual, la polimerización de compuestos aromáticos, la polimerización mediada por radicales y reacciones de entrecruzamiento (por ejemplo, pinturas, recubrimientos, biomateriales), y la activación de colorantes y el acoplamiento de compuestos orgánicos. Las laccasas se pueden utilizar en una composición de limpieza o en uno de sus componentes, o en un detergente.

[0046] Como se describe en el presente documento, las laccasas son capaces de oxidar una amplia variedad de compuestos coloreados que presentan estructuras químicas diferentes utilizando el oxígeno como aceptor de electrones. Por consiguiente, las laccasas presentadas en este documento se pueden utilizar en aplicaciones en las que se desea modificar el color asociado a los compuestos coloreados, tales como en la limpieza, por ejemplo, para la eliminación de manchas de comida sobre el tejido. En ciertas situaciones, para obtener efectos deseables, se puede utilizar un mediador o potenciador.

[0047] Las laccasas presentadas en este documento se pueden utilizar en el campo de los materiales textiles. Por ejemplo, las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento, procesamiento, acabado, pulido, o producción de fibras, u otros tejidos o artículos de manufactura. Las enzimas del presente documento pueden ser útiles, por ejemplo, en el tratamiento de tejido vaquero (procesos de tratamiento de blanqueado final); en la decoloración de residuos de índigo; en la tinción de tejidos; en procesos de blanqueo de materiales textiles; en la modificación de fibras; en la consecución de unas propiedades mejoradas de la fibra o el tejido; etc.

[0048] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en la industria del cuero. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en el procesamiento de pieles animales incluyendo, pero no limitado a, pelado, encalado, rendido y/o curtido de pieles.

[0049] En el presente documento también se describe un procedimiento para la eliminación de la lignina de un material que contiene lignocelulosa, el blanqueo de material que contiene lignocelulosa (es decir, la decoloración

enzimática de papel reciclado) y/o el tratamiento de aguas residuales procedentes de la fabricación de papel o celulosa. El proceso utiliza enzimas laccasas obtenidas de especies de *Cerrena*, al mismo tiempo que añade o dosifica agentes redox no aromáticos, más compuestos redox aromáticos fenólicos y/o no fenólicos, en las que las unidades fenólicas y no fenólicas de la lignina se pueden oxidar directamente por la acción de estos compuestos aromáticos fenólicos y/o no fenólicos, o la lignina se puede oxidar mediante otros compuestos fenólicos y/o no fenólicos producidos por la acción oxidante de estos compuestos.

[0050] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el campo del tratamiento de la pulpa de celulosa y el papel. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en la fabricación de pulpa de papel y pulpas de celulosa *fluff* a partir de materias primas tales como madera, bambú, y paja de cereal de arroz; la fabricación de papel y tableros para impresión y escritura, empaquetamiento, usos sanitarios y otros usos técnicos; el reciclado de la fibra de celulosa con el fin de elaborar papel y tableros; y el tratamiento de productos residuales generados y tratados en fábricas de celulosa o papel y otras instalaciones dedicadas específicamente a la fabricación de papel, pulpa de celulosa, o pulpa de celulosa *fluff*. Las enzimas presentadas en este documento pueden ser útiles, por ejemplo, en el procesamiento de la madera; en el blanqueo de la pulpa de celulosa; en la modificación de las fibras de la madera; en pegamentos biológicos (activación de la lignina) para la fabricación de MDF; para mejorar las propiedades del papel; en la eliminación de colorantes; en la tinción de papel; en adhesivos (por ejemplo, pegamentos basados en lignina para tableros de partículas o fibras); etc.

[0051] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito de los piensos. Por ejemplo, las laccasas presentadas en este documento se pueden utilizar como aditivo alimentario solo o como parte de un aditivo alimentario con el objetivo de incrementar el valor nutricional de piensos para cualquier tipo de animales tales como pollos, vacas, cerdos, peces y mascotas; y/o como ayudante de procesamiento para procesar materiales vegetales y subproductos de la industria alimentaria con el objetivo de producir materiales/productos adecuados como materias primas para piensos.

[0052] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito de la limpieza de lentes de contacto. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en la limpieza, almacenamiento, desinfección, y/o preservación de lentes de contacto.

[0053] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito de las féculas. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en el procesamiento de un sustrato que incluye fécula y/o grano para jarabe de glucosa (dextrosa), jarabe de fructosa o cualquier otro jarabe, alcohol (potable o combustible) o azúcar. Dicho procesamiento de las féculas puede incluir etapas de procesamiento tales como la licuefacción, sacarificación, isomerización, y desramificación de un sustrato.

[0054] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito alimentario. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en la preparación, procesamiento, o como principio activo en alimentos tales como grasa amarilla, bebidas a base de té, productos culinarios, de panadería, y alimentos congelados para consumo humano. Las laccasas se pueden utilizar, por ejemplo, como mejorador para el pan, en la conservación de los alimentos, como secuestrador de oxígeno, etc.

[0055] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito del cuidado personal. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en la preparación de productos personales para seres humanos tales como fragancias, y productos para el cuidado de la piel, el cuidado del cabello, higiene oral, lavado personal y desodorantes y/o antitranspirantes, para seres humanos. Las enzimas presentadas en este documento pueden ser útiles, por ejemplo, en la tinción y/o decoloración del cabello, coloración y/o decoloración de las uñas; coloración y/o decoloración de la piel; modificación de la superficie (por ejemplo, como agente acoplante); como agente antimicrobiano; en la eliminación de olores; blanqueado de los dientes; etc.

[0056] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito de la limpieza. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en la limpieza, tratamiento o cuidado de artículos de lavandería tales como prendas o tejidos; en la limpieza de superficies duras en el hogar; en el que cuidado de la vajilla, incluyendo aplicaciones para lavavajillas; y en pastillas de jabón y jabones líquidos y/o pastillas y líquidos de tensioactivos sintéticos. Las enzimas presentadas en este documento pueden ser útiles por ejemplo, en la eliminación/decoloración de manchas, y/o en la eliminación de olores, y/o en desinfección, etc.

[0057] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito del tratamiento de aguas residuales. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar en la decoloración de compuestos coloreados; en la detoxificación de componentes fenólicos; para actividad antimicrobiana (por ejemplo, en el reciclado del agua); en bio-remediación; etc.

[0058] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito de los bio-materiales. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar como bio-catalizadores para diversas reacciones orgánicas; y/o en relación con biopolímeros; en relación con el envase; en relación con adhesivos; en modificación superficial (agente de

activación y acoplamiento); en la producción de alcoholes primarios; en relación con biosensores y/o síntesis orgánicas; etc.

[0059] Las laccasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en el ámbito de los agentes antimicrobianos. Por ejemplo, las laccasas se pueden utilizar como agente antimicrobiano en composiciones de limpieza, o para reducir o eliminar la carga microbiana de diversos alimentos (por ejemplo, carnes) o piensos.

[0060] Los mediadores laccasa se pueden utilizar como agentes de desinfección y antimicrobianos (por ejemplo, protección de maderas, detergentes). Los mediadores se pueden utilizar independientemente de las enzimas o junto con las enzimas.

[0061] Como se utiliza en el presente documento, "composiciones de limpieza" y "formulaciones de limpieza" se refieren a composiciones que tienen utilidad en la eliminación de compuestos no deseados de los artículos a limpiar, tales como tejidos, etc. El término engloba cualquier material/compuesto seleccionado para el tipo de composición de limpieza particular deseada y la forma del producto (por ejemplo, composición líquida, gel, en gránulos, o para pulverización), siempre que la composición sea compatible con la laccasa y otra(s) enzima(s) utilizada(s) en la composición. La selección específica de los materiales para la composición de limpieza se realiza fácilmente considerando la superficie, el artículo o tejido a limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su utilización.

[0062] Los términos además se refieren a cualquier composición que sea adecuada para la limpieza y/o blanqueo de cualquier objeto y/o superficie. Está previsto que los términos incluyan, pero no está limitado a, composiciones detergentes (por ejemplo, detergentes de lavandería líquidos y/o sólidos y detergentes para tejidos delicados; formulaciones para la limpieza de superficies duras, tales como cristal, madera, cerámica y mostradores metálicos y ventanas; productos de limpieza para alfombras; productos de limpieza para horno; y pre-tratamientos textiles y de lavandería, así como a detergentes para la vajilla).

[0063] De hecho, el término "composición de limpieza" como se utiliza en el presente documento incluye, a menos que se indique otra cosa, agentes de lavado multiusos o de trabajo pesado en forma de gránulos o en polvo, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma de líquido, gel o pasta, especialmente los del tipo denominados líquidos para trabajo pesado (HDL); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado de la vajilla a mano o agentes para lavavajillas de trabajo ligero, especialmente aquellos que forman mucha espuma; agentes para máquinas lavavajillas, incluyendo los diversos tipos de ayudantes en forma de pastillas, gránulos, líquidos y enjuagues para uso doméstico e institucional; agentes líquidos para limpieza y desinfección, champús para coches o alfombras, productos para la limpieza del baño; champús para el pelo y enjuagues para el pelo; geles de ducha y baños de espuma y productos para la limpieza de metales; así como aditivos auxiliares tales como aditivos blanqueantes y los del tipo "aplicadores quitamanchas" o de pretratamiento.

[0064] Como se utilizan en el presente documento, los términos "composición detergente" y "formulación detergente" se usan en relación con mezclas que están destinadas para su utilización en un medio de lavado para la limpieza de objetos manchados. En algunas formas de realización, el término se utiliza en referencia al lavado de tejidos y/o prendas (por ejemplo, "detergentes de lavandería"). En formas de realización alternativas, el término se refiere a otros detergentes, tales como aquellos utilizados para limpiar platos, cubertería, etc. (por ejemplo, "detergentes para el lavado de la vajilla"). No se pretende que las composiciones contempladas en el presente documento estén limitadas a ninguna formulación o composición detergente particular. De hecho, se pretende que además de la laccasa, el término englobe detergentes que contienen tensioactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, quelantes, agentes blanqueantes, activadores para el blanqueo, agentes azulantes y colorantes fluorescentes, inhibidores del apelmazamiento, agentes enmascarantes, activadores enzimáticos, antioxidantes, y solubilizantes.

[0065] Como se utiliza en el presente documento, el término "composición de limpieza para superficies duras" se refiere a composiciones detergentes para la limpieza de superficies duras tales como suelos, paredes, azulejos, contenedores de acero inoxidable (por ejemplo, tanques de fermentación), accesorios del baño y cocina, y similares. Dichas composiciones se proporcionan en cualquier forma, incluyendo pero no limitado a, sólidos, líquidos, emulsiones, etc. Algunos de los siguientes ejemplos están relacionados con las enzimas laccasa de la invención. Otros proporcionan antecedentes útiles.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la laccasa de *Cerrena unicolor*

[0066] Se obtuvieron cuatro secuencias de péptidos utilizando una laccasa disponible comercialmente: AIGPVADLHI (SEQ ID No. 19), MLTPTSI (SEQ ID No. 20), TVGGPA (SEQ ID No. 21) y YSFVLNANQP (SEQ ID No. 22). La laccasa disponible comercialmente se purificó. La secuenciación N-terminal dio como resultado la SEQ ID No. 19. Se llevó a cabo la digestión proteolítica con tripsina de la muestra purificada. Los fragmentos se separaron

mediante electroforesis en gel con 3 bandas seleccionadas y recogidas de forma manual. Se llevó a cabo la secuenciación del péptido para cada banda y dio como resultado las SEQ ID Nos. 20, 21 y 22.

Ejemplo 2

a. Clonación del gen A de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa ATCC20013

[0067] Para clonar el gen A de la laccasa procedente de la cepa ATCC20013, se diseñaron dos cebadores y se obtuvieron en Invitrogen: TTCGCAGGTC AACGATATTC (SEQ ID No. 35) basado en la secuencia de ADN del gen B de la laccasa obtenido de la cepa ATCC20013 (véase Ejemplo 3a) y GTTAGGTGGTTGAAGGATTG (SEQ ID No. 36) basado en el gen A de la laccasa obtenido de la cepa CBS115.075 (véase Ejemplo 2c). Los cebadores se utilizaron en una reacción de PCR con una T elevada que contiene ADN genómico obtenido de la cepa ATCC 20013 como molde (véase Ejemplo 3). El fragmento de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin de Qiagen y se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO (Invitrogen). 22 clones se amplificaron utilizando cuentas de PCR Ready-To-Go (GE Healthcare) y se secuenciaron tres fragmentos de la PCR (2 – 1, 2 – 3 y 2 – 6). La secuencia de ADN de 1316 pb del gen A de la laccasa procedente de la cepa ATCC20013 se lista como SEQ ID No 37.

b. Clonación del gen A de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS154.29

[0068] Para clonar el gen A de la laccasa procedente de la cepa CBS154.29, se diseñaron dos cebadores y se obtuvieron en Invitrogen: CACCAGCATGAGCTCAAAGCTAC (SEQ ID No. 45) basado en el gen A de la laccasa obtenido de la cepa CBS115.075 (véase Ejemplo 2c) y el cebador de la SEQ ID No. 36. Los cebadores se utilizaron en una reacción de PCR Herculase que contiene un molde de ADN genómico obtenido de la cepa CBS 154.29, dNTPs, cebador y el 4 % de DMSO en tampón 1x. La mezcla de PCR se calentó a 98 °C durante 4 minutos para desnaturar el molde de ADN. Se añadió la enzima Herculase® II (Stratagene) al tubo y la reacción de PCR se llevó a cabo en 30 ciclos de 98 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 2 minutos. La extensión final a 72 °C se realizó durante 5 minutos y la reacción se enfrió a 4 °C. El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Se amplificaron 15 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y los plásmidos se aislaron a partir de dos clones (pENTR15-24 y pENTR15-30) y se secuenciaron los moldes de ADN. Se obtuvo la secuencia de ADN de 2374 pb del gen A de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29. La secuencia de ADN se lista como SEQ ID No. 3 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 4.

c. Clonación del gen A de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS 115.075

[0069] El cebador CAATCTATGACCGTAGATTC (SEQ ID No. 39) basado en el gen B de la laccasa procedente de la cepa ATCC20013 (véase Ejemplo 3a) y el cebador NNNNNNNNNNCGATCG (SEQ ID No. 38) en el que N representa una mezcla de los cuatro nucleótidos (A, T, C y G) se utilizaron en una reacción de PCR con una T baja (véase Ejemplo 3a). Se extrajo el ADN genómico de la cepa de *Cerrena unicolor* (CBS 115.075) y se utilizó como molde para la primera ronda de la reacción de PCR con una T baja. Los fragmentos de PCR se purificaron con una columna QIAquick spin y se utilizaron como molde en la segunda ronda de reacción de PCR con una T baja con cebadores de la SEQ ID No. 35 basados en el gen B de la laccasa procedente de la cepa ATCC20013 (véase Ejemplo 3a) y el cebador de la SEQ ID No. 38. Los fragmentos de PCR se clonaron en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se amplificaron 16 clones utilizando cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron tres fragmentos clonados de la PCR (B2#1, B2#4 and B2#11).

[0070] Para clonar el extremo 3' del gen A de la laccasa, se utilizó el cebador ACCGTGGTTCCTCCATTGCC (SEQ ID No. 40) y el cebador de la SEQ ID No. 31 en la reacción de PCR con una T baja con el ADN genómico extraído de la cepa de *Cerrena unicolor* (CBS 115.075) como molde en la primera ronda de la reacción de PCR con una T baja. Los fragmentos de la PCR se purificaron con una columna QIAquick spin y se utilizaron como molde en la segunda ronda de la reacción de PCR con una T baja con los cebadores GACTGGCACTTGGAAGCGGG (SEQ ID No. 41) y el cebador de la SEQ ID No. 31. Los fragmentos de la PCR se clonaron en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se amplificaron 22 clones utilizando cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenció un fragmento clonado de la PCR (D2#2).

[0071] Para clonar el extremo 5' del gen A de la laccasa, se diseñó un cebador GGACCAAGCTGGTACTTTC (SEQ ID No. 42) basado en la secuencia del gen B de la laccasa. Se utilizó para amplificar un fragmento de ADN con el cebador de la SEQ ID No. 36. El ADN genómico extraído de la cepa de *Cerrena unicolor* (CBS 115.075) se utilizó como molde de la PCR. Se obtuvo el fragmento de la PCR de 1,7 kb, se purificó con una columna QIAquick spin y se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 22 clones utilizando cuentas de PCR Ready-To-Go. Se secuenció el ADN plasmídico procedente del clon (C5#20). Para la clonación posterior del extremo 5' del gen A de la laccasa, se utilizó el cebador CGTGGTACCAGTCTGCCAGGG (SEQ ID No. 43) y el cebador de la SEQ ID No. 31 en la reacción de PCR con una T baja con el ADN genómico extraído de la cepa CBS115.075 de *Cerrena unicolor* como molde. A partir de la primera ronda de la reacción de PCR con una T

baja, el fragmento de la PCR se purificó con una columna QIAquick spin y se utilizó como molde en la segunda ronda de la reacción de PCR con una T baja con los cebadores GGCAGCATCAGTCACGGTCAG (SEQ ID No. 44) y el cebador de la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR (a3) se amplificó de nuevo y se utilizó como molde en una tercera ronda de reacción de PCR con una T baja con los cebadores GGCAGCATCAGTCACGGTCAG (SEQ ID No. 44) y el cebador de la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR (a3-2) se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se amplificaron 11 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron dos fragmentos clonados de la PCR (a3-2#10 y a3-2#11). La secuencia de ADN del gen A de la laccasa procedente de la cepa CBS 115.075 que incluye la secuencia de 5' y 3' de la región codificante se lista como SEQ ID No. 1 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 2.

Ejemplo 3

a. Clonación y secuenciación del gen B de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa ATCC20013

[0072] Para clonar el fragmento de ADN que codifica el gen de la laccasa de *Cerrena*, se diseñaron cuatro cebadores degenerados basados en la secuencia del péptido AIGPVADLHI (SEQ ID No. 19) y se obtuvieron en Invitrogen. Se denominan

cebador A GCAATCGGACCNGTNGCAGA (SEQ ID No. 23);
 cebador B GCAATCGGACCNGTNGCTGA (SEQ ID No. 24);
 cebador C GCAATCGGACCNGTNGCGGA (SEQ ID No. 25); y
 cebador D GCAATCGGACCNGTNGCCGA (SEQ ID No. 26).

[0073] Se diseñaron dos cebadores degenerados basados en la secuencia del péptido YSFVLNANQP (SEQ ID No. 22) y se obtuvieron en Invitrogen. Se denominan

cebador E GGTTGATTTGCATTNAGNAC (SEQ ID No. 27); y
 cebador F GGTTGATTTGCGTTNAGNAC (SEQ ID No. 28).

en donde N representa una mezcla de los cuatro nucleótidos (A, T, C y G). Se extrajo el ADN genómico de la cepa ATCC20013 y se utilizó como molde en la reacción de PCR con una T baja que contiene la siguiente combinación de cebadores: reacción de PCR 1 no contiene ADN ni cebador; reacción de PCR 2 contiene el cebador A y el cebador E; reacción de PCR 3 contiene el cebador B y el cebador E; reacción de PCR 4 contiene el cebador C y el cebador E; reacción de PCR 5 contiene el cebador D y el cebador E; reacción de PCR 6 contiene el cebador A y el cebador F; reacción de PCR 7 contiene el cebador B y el cebador F; reacción de PCR 8 contiene el cebador C y el cebador F y reacción de PCR 9 contiene el cebador D y el cebador F. La mezcla de la reacción de PCR contenía el molde de ADN, cebadores, tampón 1x, dNTP 0,2 mM y 1 unidad de ADN Taq polimerasa. La reacción de PCR se llevó a cabo en 30 ciclos del 95 °C durante 1 minuto, 45 °C durante 1 minuto y 68 °C durante 1 minuto. La extensión final a 72 °C se realizó durante 7 minutos y la reacción se enfrió a 4 °C. Los fragmentos de la PCR procedentes de la reacción 4, 5 y 8 se recortaron de un gel de agarosa al 1,2 % y se reunieron. Los fragmentos de la PCR se extrajeron del gel con una columna Qiagen spin y se clonaron en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se seleccionaron 32 fragmentos clonados de la PCR y se secuenciaron utilizando cuentas de PCR Ready-To-Go y la secuencia de ADN del clon #A30 se identificó como el gen B de la laccasa.

[0074] Para clonar el extremo 5' del gen de la laccasa, se diseñó un cebador y se obtuvo en Invitrogen: GGACGTGGCCTTGAGCATAC (SEQ ID No. 29). Se utilizó en una primera ronda de reacción de PCR con una T baja con un oligo degenerado GGATCC (SEQ ID No. 31) en el que N representa una mezcla de los cuatro nucleótidos (A, T, C y G). El producto de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin y se usó como molde en una segunda reacción de PCR con una T baja que contiene un cebador TCTGTCAAGTCGTC AATCAC (SEQ ID No. 30) y el cebador de la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin y se diluyó a 1: 10 y 1: 100 y se usó como molde en la primera ronda de la reacción de PCR con una T elevada realizada en 30 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto con dos cebadores (SEQ ID No. 30 y SEQ ID No. 31). La extensión final a 72 °C se realizó durante 7 minutos y la reacción se enfrió a 4 °C. El fragmento de la PCR se purificó con una columna QIAquick spin y se utilizó en la segunda ronda de reacción de PCR con una T elevada con los cebadores de TTACCACGAATCAGAGGACC (SEQ ID No. 32) y la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR (D13) se secuenció.

[0075] Para clonar el extremo 3' del gen B de la laccasa, se diseñó un cebador y se obtuvo en Invitrogen: CCTCACCTGTATTGGCACAG (SEQ ID No. 33) y se utilizó con el cebador de la SEQ ID No. 31 en una primera ronda de reacción de PCR con una T baja. El fragmento de la PCR se purificó en una columna QIAquick spin y se utilizó como molde en una segunda ronda de reacción de PCR con una T baja con el cebador TTGGTATCATGCCCTTGCTC (SEQ ID No. 34) y el cebador de la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR se clonó en un plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se amplificaron 16 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go PCR y se secuenciaron cuatro fragmentos clonados de la PCR (C3, C4, C5 y C7).

[0076] Se obtuvo un fragmento de ADN de 1337 pb. La secuencia de ADN se lista como SEQ ID No. 9 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 10.

b. Clonación del gen B de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS 154.29

[0077] Se diseñaron dos cebadores y se obtuvieron en Invitrogen:

CACCGCGATGTCTCTTCTTCGTAG (SEQ ID No. 46); y
TGRAGRTGGAASGGATGWGGTCC (SEQ ID No. 47).

en donde R representa una mezcla de los nucleótidos A y G, S representa una mezcla de los nucleótidos C y G, y W representa una mezcla de los nucleótidos A y T. Los dos cebadores se utilizaron en la reacción de PCR con una T elevada. El fragmento de la PCR (A3) se purificó utilizando una columna QIAquick spin. El fragmento de la PCR se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se amplificaron 16 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron dos fragmentos de PCR (A3#1 y A3#5).

[0078] Para clonar el extremo 3' del gen B de la laccasa procedente de la cepa CBS154.29, se diseñó un cebador y se obtuvo en Invitrogen: GTCCCTGTACTACTCCAGATCC (SEQ ID No. 48) y se utilizó con un cebador que tiene la SEQ ID No. 31 en una primera ronda de la reacción de PCR con una T baja. El fragmento de la PCR se purificó en una columna QIAquick spin y se utilizó como molde en una segunda ronda de la reacción de PCR con una T baja con el cebador CCAGCAGGAAGCGTGATCGAAC (SEQ ID No. 49) y el cebador de la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se amplificaron 16 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron tres fragmentos de la PCR (7#6, 7#7 y 7#8). Las 2663 pb de la secuencia de ADN de la laccasa B de la cepa CBS 154.29 se listan como SEQ ID No. 7 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 8.

c. Clonación del gen B de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS115.075

[0079] Se diseñó un cebador y se obtuvo en Invitrogen:

GTAATCATGTATCACCTGGGCTCAAGG (SEQ ID No. 50). El cebador se utilizó en la reacción de PCR Herculase (véase Ejemplo 2b) con el cebador de la SEQ ID No. 46. El fragmento de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin. El fragmento de la PCR se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 17 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron los fragmentos de la PCR procedentes de cuatro clones (#1, #2, #4 y #5). El ADN plasmídico se preparó a partir de dos clones (pENTR-laccaseB CBS115075#1 y pENTR-laccaseB CBS115075#3) y ambos plásmidos se secuenciaron. Las 2173 pb de la secuencia de ADN de la laccasa B de la cepa CBS 115.075 se listan como SEQ ID No. 5 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 6.

Ejemplo 4. Clonación del gen C de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS154.29

[0080] Se diseñó un cebador ACGAACGAGTANCGTTGNCC (SEQ ID No. 51), en el que N representa una mezcla de los cuatro nucleótidos (es decir, A, T, C y G), en base a la secuencia del péptido traducido GQRYSFV (SEQ ID No. 52). Este péptido está conservado entre el gen A de la laccasa y el gen B de la laccasa (véanse Ejemplos 2 y 3). El cebador se obtuvo en Invitrogen y se utilizó en la reacción de T baja con el cebador de la SEQ ID No. 24. El fragmento de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin. El fragmento de la PCR se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 33 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron los fragmentos de la PCR procedentes de cuatro clones (#12, #5a, #19a y #21a). Las 1080 pb de la secuencia del gen C de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29 se listan como SEQ ID No. 11 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 12.

Ejemplo 5

a. Clonación del gen D de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS115.075

[0081] Para clonar el extremo 5' del gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS115.075, se diseñó un cebador en base al gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29 (véase Ejemplo 5b) (AACACGGAGACAGTCCAAAC, SEQ ID No. 62). Se utilizó en la reacción de PCR con una T elevada con el cebador de la SEQ ID No. 56. El fragmento de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin y se secuenció.

[0082] Para clonar el gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS 115.075, se diseñaron dos cebadores (CACCTCTCGAGATGGGATTGAAC, SEQ ID No. 63 y CGTTTAAATAGCAGTTCCTTTC, SEQ ID No. 64) en base al gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29 (véase Ejemplo 5b). Los cebadores se utilizaron en una reacción de PCR Herculase (véase Ejemplo 2b) con un molde del ADN genómico procedente de la cepa CBS

115.075. El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO. Se amplificaron 16 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron los fragmentos de la PCR generados a partir de cuatro clones. Los plásmidos se aislaron a partir del clon #2 (pENTRE-laccaseD#2) y se secuenció. Se obtuvo la secuencia de ADN de 2809 pb del gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS 115.075. La secuencia de ADN se lista como SEQ ID No. 15 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 16.

b. Clonación del gen D de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS 154.29

[0083] Se diseñó un cebador, CTGGTTGGTTNGCATTNAG (SEQ ID No. 53), en base a la secuencia peptídica LNaNQP (SEQ ID No. 54). El cebador se obtuvo en Invitrogen y se utilizó en la reacción de PCR con una T baja con el cebador de la SEQ ID No. 26. El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 18 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenció el fragmento de la PCR procedente de un clon.

[0084] Para clonar el extremo 3' del gen D de la laccasa, se diseñó un cebador (CACACGACCCCTGACCGTTG, SEQ ID No. 55). El cebador se utilizó en la reacción de PCR con una T baja con el cebador de la SEQ ID No. 31. El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 24 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenció el fragmento(s) de la PCR procedente de un clon.

[0085] Para clonar más de los extremos 3' y 5' del gen D de la laccasa, se utilizó PCR inversa. 0,4 µg del ADN genómico procedente de la cepa CBS 154.29 de *Cerrena* se digirieron con la enzima de restricción EcoRV a 37 °C durante 1,5 horas. Los fragmentos de ADN genómico digerido se precipitaron con etanol. Los fragmentos de ADN lineal se ligaron con la ADN ligasa de T4 en un volumen de 100 µl durante más de 5 horas. Los fragmentos de ADN ligados se calentaron a 100 °C durante 3 minutos y se utilizaron como molde de ADN en una primera ronda de la reacción de PCR con una T elevada utilizando dos cebadores (TGACCGGTGATCAACGTCCC, SEQ ID No. 56, y GGCGCAGACATCAATCACAG, SEQ ID No. 57). Los fragmentos de la PCR se purificaron utilizando una columna QIAquick spin y se usaron como molde de ADN en la segunda ronda de la reacción de PCR con una T elevada utilizando dos cebadores (TCTTCAGCATCAACAACGCC, SEQ ID No. 58 y TCCGGCAAGCACGGTTGG, SEQ ID No. 59). Los fragmentos de la PCR procedentes de la segunda ronda de la reacción de PCR se purificaron utilizando una columna QIAquick spin y se secuenciaron.

[0086] Para clonar más del extremo 3' del gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29, se utilizó PCR inversa. 0,4 µg del ADN genómico procedente de la cepa CBS 154.29 de *Cerrena* se digirieron con la enzima de restricción SmaI a 37 °C durante 1,5 horas. Los fragmentos de ADN genómico digerido se precipitaron con etanol. Los fragmentos de ADN lineal se ligaron con la ADN ligasa de T4 en un volumen de 100 µl durante más de 5 horas. Los fragmentos de ADN ligados se calentaron a 100 °C durante 3 minutos y se utilizaron como molde de ADN en una primera ronda de la reacción de PCR con una T elevada con el cebador TCGTCTTCGCTGAGGGCATC, SEQ ID No. 60, y el cebador de la SEQ ID No. 56. Los fragmentos de la PCR se purificaron utilizando una columna QIAquick spin y se usaron como molde de ADN en la segunda ronda de la reacción de PCR con una T elevada utilizando el cebador (CAGACCGCTGCAGCCAACCC, SEQ ID No. 61) y el cebador de la SEQ ID No. 59. Los fragmentos de la PCR procedentes de la segunda ronda de la reacción de PCR se purificaron utilizando una columna QIAquick spin y se clonaron en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 21 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron los fragmentos de la PCR procedentes de los clones #Ce11 y #Ce14. Las 2809 pb de la secuencia del gen D de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29.49 se lista como SEQ ID No. 13 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 14.

Ejemplo 6. Clonación del gen E de la laccasa de *Cerrena unicolor* procedente de la cepa CBS154.29

[0087] Se utilizó el cebador de la SEQ ID No. 53 en la reacción de PCR con una T baja con el cebador de la SEQ ID No. 26 (véase Ejemplo 5b). El fragmento de la PCR se purificó utilizando una columna QIAquick spin y se clonó en el plásmido pTOPO utilizando el kit de clonación TOPO. Se analizaron 18 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenció el fragmento de la PCR procedente del clon #Ae17. Las 1163 pb de la secuencia del gen E de la laccasa procedente de la cepa CBS 154.29.49 se lista como SEQ ID No. 17 y la secuencia de la proteína traducida se lista como SEQ ID No. 18.

Ejemplo 7. Expresión del gen A en *Trichoderma*

[0088] Para construir el plásmido de expresión para el gen A de la laccasa de la cepa CBS 115.075, se utilizaron dos cebadores (SEQ ID No. 45 y SEQ ID No. 36) en la reacción de PCR Herculase que contiene el molde de ADN genómico obtenido de la cepa 115.075, dNTPs, y el 4 % de DMSO en tampón 1x. La mezcla de PCR se calentó a 98 °C durante 4 minutos para desnaturalizar el molde de ADN. Se añadió la enzima Herculase® II (Stratagene) al tubo y la reacción de PCR se llevó a cabo en 30 ciclos de 98 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 2 minutos. La extensión final a 72 °C se realizó durante 5 minutos y la reacción se enfrió a 4 °C. El

fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO. Se amplificaron 15 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y el ADN plasmídico se aisló a partir del clon pENTR-laccaseA-CBS 115.075#11. Se secuenció la porción del gen A de la laccasa para confirmar la fidelidad de la amplificación de la PCR del gen A de la laccasa. El plásmido de pENTR-laccaseA-CBS115.075#11 (50 ng) se convirtió en el plásmido de expresión pTrex3g-laccaseA (Figura 1) en una reacción de 10 µl de LB clonasa II (Invitrogen) que contiene 6,5 µl de TE, 1 µl del vector pTrex3g (0,1 mg/ml) y 2 µl de ClonaseII. El plásmido de expresión se confirmó mediante la secuenciación del ADN y se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. La transformación de la cepa de *Trichoderma* mediante el procedimiento de transformación biolística se consiguió utilizando el sistema Biolistic® PDS-1000/he Particle Delivery System de Bio-Rad (Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante (véanse los documentos WO 05/001036 y US 2006/0003408). Se seleccionaron 66 transformantes y se transfirieron a nuevas placas. Se dejaron crecer un total de 15 transformantes estables en 30 ml de medio Proflo durante 2 días a 30 °C. Se transfirieron 5 ml del cultivo del medio Proflo de 2 días de edad a 50 ml de medio definido que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 5 días a 28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

Ejemplo 8

a. Expresión del gen B de la laccasa en *Aspergillus*

[0089] Para construir el plásmido de expresión para el gen B de la laccasa de la cepa CBS 115.075, se utilizaron dos cebadores GCAGATCTGCGATGTCTCTTCTTCGTAGCTTGAC (SEQ ID No. 72) y GAGGTCACCTCTAGATCATGTATCACCTGGGCTCAAGGCATC (SEQ ID No. 73) en la reacción de PCR Herculase que contiene el molde de ADN genómico procedente de la cepa 115.075 (véase Ejemplo 2b). El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se digirió con las enzimas de restricción BglII y XbaI. El fragmento de ADN se purificó de nuevo con la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pGAPT digerido con BglII y XbaI. La fidelidad del plásmido se confirmó mediante la secuenciación del ADN. El plásmido pKB401 (Figura 2) resultante se transformó en *A. niger* 2445 para comprobar la expresión del gen B de la laccasa. Se seleccionaron 34 transformantes y se transfirieron sobre placas MM y se dejaron crecer durante 4 días a 30 °C. Se inocularon en un pequeño tapón con una sola colonia que incluye esporas y micelio sobre una placa CMA y se creció durante 4 días a 30 °C. Un tapón de la placa CMA que contiene esporas y micelio confluentes se transfirieron a 30 ml de caldo especial Promosoy (pH 6,2) que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 5 días a 30 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

b. Expresión del gen B de la laccasa en *Aspergillus* como fusión al dominio catalítico de la glucoamilasa.

[0090] Para construir el plásmido de expresión de fusión para el gen B de la laccasa de la cepa CBS 115.075, se utilizaron dos cebadores TTGCTAGCAACGTGATCTCCAAGCGTGCAATCGGTCCAGTCACTGACCTAC (51-mero, SEQ ID No. 74) y el cebador de la SEQ ID No. 73 en la reacción de PCR Herculase que contiene el molde del ADN genómico obtenido de la cepa CBS 115.075 (véase Ejemplo 2b). El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se digirió con NheI y BstEII y se volvió a purificar con la columna QIAquick spin. Este fragmento purificado se clonó en el vector pGAMP2-R2-GV digerido con NheI y BstEII (véase solicitud de patente de EE.UU. US20050153399). El plásmido resultante pKB403 (Figura 3) se confirmó mediante análisis de secuenciación y se transformó en *A. niger* 2445. Se seleccionaron 28 transformantes y se transfirieron sobre placas MM y se dejaron crecer durante 4 días a 30 °C. Se inocularon en un pequeño tapón con una sola colonia que incluye esporas y micelio sobre una placa CMA y se creció durante 4 días a 30 °C. Un tapón de la placa CMA que contiene esporas y micelio confluentes se transfirieron a 30 ml de caldo especial Promosoy (pH 6,2) (véase solicitud de patente de EE.UU. US20050153399) que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 5 días a 30 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

c. Expresión del gen B de la laccasa en *Trichoderma*

[0091] Para construir el plásmido de expresión para el gen B de la laccasa de la cepa CBS 115.075 (véase Ejemplo 2b), se diseñó un cebador y se obtuvo en Invitrogen: GTAATCATGTATCACCTGGGCTCAAGG (SEQ ID No. 50). El cebador se utilizó en la reacción de PCR Herculase (véase Ejemplo 2b) con el cebador de la SEQ ID No. 46. El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Se amplificaron 17 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se aisló el ADN plasmídico del clon pENTR-CBS 115.075# 1 (véase Ejemplo 3c). Se secuenció la porción del gen B de la laccasa para confirmar la fidelidad de la amplificación por PCR. El plásmido de pENTR-laccaseB-CBS 115.075# 1 (50 ng) se convirtió en el plásmido de expresión pTrex3g-laccaseB (véase Figura 1 con el gen A de la laccasa sustituido por el gen B de la laccasa) en una reacción de 10 µl de LB clonasa II (Invitrogen) que contiene 6,5 µl de TE, 1 µl del vector pTrex3g (0,1 mg/ml) y 2 µl de ClonaseII. El plásmido de expresión se confirmó mediante la secuenciación del ADN y se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. Se seleccionaron 60 transformantes y se transfirieron a nuevas placas. Se dejaron crecer un total de 20 transformantes estables en 30 ml de medio Proflo durante 2 días a 30 °C. Se transfirieron 3 ml del cultivo del medio Proflo de 2 días de edad a 30 ml de medio definido (véase solicitud de patente de EE.UU. US20050153399) que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a

28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

d. Expresión del gen B de la laccasa en *Trichoderma* como fusión CBH1

- 5 [0092] Para construir el plásmido de expresión para el gen B de la laccasa de la cepa CBS 115.075, se diseñó un cebador y se obtuvo en Invitrogen: GGACTAGTGTGCGCCGTTTACAAACGCGCAATCGGTCCAGTCACTGACC, SEQ ID No. 65). El cebador se utilizó junto con el cebador inverso (obtenido en New England Biolab) en la reacción de PCR Herculase que contiene pENTR-laccaseB CBS115075# 1 (véase Ejemplo 3c) como molde de ADN. El fragmento de la PCR (SEQ ID No. 66)

10

```

ACTAGTGTGCG CCGTTTACAA ACGCGCAATC GGTCCAGTCA CTGACCTACA 50
TATAGTGAAC CAGAATCTCG ACCCAGATGG TTCAACCGC CCCACTGTAC 100
TCGCAGGTGG TACTTTCCCC GGTCCCTCTGA TTCGTGGTAA CAAGGTACGC 150
TTCATAACCG CCTCCGCTAG ACGTAGGCTT CGGCTGACAT GACCATCATC 200
TGTAGGGAGA TAACTTTAAA ATTAATGTGA TTGACGACTT GACAGAGCAC 250
AGTATGCTCA AGGCTACGTC CATCGTAAGT CCCTGATTAA CGTTTCACCT 300
GGTCATATCG CTCAACGTCT CGAAGCACTG GCATGGGTTC TTCCAGAAGG 350
GAACCAACTG GGCCGATGGC CCCGCCTTTG TCACCCAATG TCCTATCACA 400
TCAGGAAACG CCTTCCTGTA TGATTTCAAC GTTCCGGACC AAGCTGGTAC 450
TTTCTGGTAC CACAGCCATC TCTCTACACA GTATTGTGAC GGTCTTCGTG 500
GTGCCTTTGT CGTCTATGAT CCTAATGATC CCAACAAGCA ACTCTATGAT 550
GTTGATAACG GCAAGTTCCT TGCATATTTT ATTTCTATCA TATCCTCACC 600
TGTATTGGCA CAGAAAGCAC CGTGATTACC TTGGCTGATT GGTATCATGC 650
CCTTGCTCAG ACTGTCAGTGT GTGTCGCGTG AGTGACAAAT GGCCCTCAAT 700
TGTTACATA TTTTCCTGAT TATCATATGA TAGAGTATCT GATGCAACGT 750
TGATCAACGG ATTGGGACGT TCGGCCACCG GCCCCGCAA TGCCCTCTG 800
GCGGTATCA GTGTCGAGCG GAATAAGAGG TCAGTTCAT AATTATGATT 850
ATTTCCCGCG TTAATTCTTA ACAATTATTT TTGTATCCCT CCACAGATAT 900
CGTTTCCGAT TGGTTTCTAT TTCTTGCGAC CCTAACTTTA TTTTCTCAAT 950
TGACCACCAC CCAATGACCG TAATTGAGAT GGACGGTGTT AATACCCAAT 1000
CTATGACCGT AGATTGATC CAAATATTCG CAGGTCAACG ATATTCATTT 1050
GTCGTAGGTT ATTATAAACT GCCCACCGAT CATCTCTCAC GTAAGTGTTA 1100
TAGATGCAAG CCAACCAACC AGTTGGAAAT TATTGGATCC GCGCTAAACC 1150
TAATGTTGGG AACACAACCT TCCTTGGAGG CCTGAACTCC GCTATATTAC 1200
GATATGTGGG AGCCCTGAC CAAGAACCGA CCACTGACCA AACACCCAAC 1250
TCTACACCGC TCGTTGAGGC GAACCTACGA CCCCTCGTCT ATACTCCTGT 1300
GGTATGTTGT TCTCGTTACA TATACCAAAC CTAATATGAA GACTGAACGG 1350
ATCTACTAGC CGGGACAGCC ATTCCCTGGC GGTGCTGATA TCGTCAAGAA 1400
CTTAGCTTTG GGTTCGTAC GTGTATTTCA CTTCCCTTTT GGCAGTAACT 1450
GAGGTGGAAT GTATATAGAA TGCCGGGCGT TTCACAATCA ATGGAGCGTC 1500
CCTCACACCT CCTACAGTCC CTGTACTACT CCAGATCCTC AGTGGTACTC 1550
ACAATGCACA GGATCTTCTC CCAGCAGGAA GCGTGATCGA ACTTGAACAG 1600
AATAAAGTTG TCGAAATCGT TTTGCCGCT GCGGGCGCCG TTGGCGGTCC 1650
TCATCCTTTT CACTTACATG GTGTAAGTAT CAGACGTCCT CATGCCATA 1700
TTGCTCCGAA CCTTACACAC CTGATTTTCA CACAATTTCT GGGTGGTTCG 1750
TAGCGCCGGT CAAACCACAT ACAATTTCAA TGATGCTCCT ATCCGTGATG 1800
TTGTGAGTAT TGGCGGTGCA AACGATCAAG TCACGATCCG ATTTGTGGTA 1850
TGTATCTCGT GCCTTGCAAT CATTCACGA GTAATGATCC TTACTACTCG 1900
GGTTCTCAGA CCGATAACCC TGGCCCATGG TTCCTTCACT GTCACATTGA 1950
CTGGCATTG GAGGCTGGGT TCGCTGTAGT CTTTGCGGAG GGAATCAATG 2000
GTACTGCAGC TGCTAATCCA GTCCCAGGTA AGACTCTCGC TGCTTTGCGT 2050
AATATCTATG AATTTAAATC ATATCAATTT GCAGCGGCTT GGAATCAATT 2100
GTGCCCATG TATGATGCCT TGAGCCAGG TGATACATGA TTACAAGGGT 2150
GGGCGCGCC 2159
    
```

se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se digirió con las enzimas de restricción SpeI y AclI. A continuación este fragmento (SEQ ID No. 66) se clonó en el vector pTrex4 que también se había digerido con SpeI y AclI para crear el plásmido de expresión (pTrex4-laccaseB, Figura 4). La fidelidad del plásmido de expresión se confirmó mediante secuenciación del ADN y se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. Se generaron más de 100 transformantes y 60 transformantes se transfirieron a nuevas placas. Se dejaron crecer un total de 20 transformantes estables en 30 ml de medio Proflo durante 2 días a 30 °C. Se transfirieron 5 ml del cultivo del medio Proflo de 2 días de edad a 50 ml de medio definido que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a 28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

10 Ejemplo 9

a. Expresión del gen B de la laccasa de la cepa CBS 115.075 en *Streptomyces*

[0093] La secuencia de la proteína B de la laccasa se utilizó para la optimización codónica según el uso codónico en *Streptomyces lividans*. Para construir el plásmido de expresión para el gen B de la laccasa sintetizado de la cepa CBS 115.075 en *Streptomyces*, se utilizaron dos cebadores ACGCAGCCTGAACTAGTTGCGATCCTCTAGAG (SEQ ID No. 75) y CTCTGATCAAGGTCATCAGGTGTCGCCCGGGACAGG (SEQ ID No. 76) en la reacción de PCR Herculase que contiene el molde de ADN optimizado (véase Ejemplo 2b). El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se digirió con XbaI y BclI. El fragmento digerido se purificó con la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pKB105 digerido con XbaI y BamHI (véase documento US 20060154843). La corrección del plásmido pKB251 resultante (Figura 5) se confirmó mediante la secuenciación del ADN. El ADN del plásmido pKB251 se transformó en la cepa g3s3 de *Streptomyces lividans* (véase documento US 20060154843). Se seleccionaron 12 transformantes resistentes a tioestreptona y se transfirieron a un matraz de siembra agitado (20 ml de medio TSG que contiene 50 µg/ml de tioestreptona en DMSO), y se creció durante 2 días a 30 °C. Se transfirieron 3 ml del cultivo de 2 días de edad del matraz de siembra agitado a 30 ml de medio de producción II modificado en *Streptomyces* que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a 30 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

30 Ejemplo 10

Expresión del gen B de la laccasa en *Trichoderma* como fusión CBH1 utilizando un gen sintético optimizado codónicamente

[0094] El gen B sintético optimizado de la laccasa (SEQ ID NO: 67):

ACTAGTGTCG	CCGTTTACAA	ACGCGCAATC	GGTCCCGTCA	CTGACCTGCA	50
TATTGTGAAC	CAGAATCTCG	ACCCCGATGG	TTTCAACCGC	CCCACTGTCC	100
TCCGAGGTGG	TACTTTCCCC	GGTCCTCTGA	TTCGTGGTAA	CAAGGGAGAT	150
AACTTTAAAA	TTAATGTGAT	TGACGACTTG	ACAGAGCACA	GCATGCTCAA	200
GGCTACGTCC	ATCCACTGGC	ATGGCTTCTT	CCAGAAGGGA	ACCAACTGGG	250
CCGATGGCCC	CGCCTTTGTC	ACCCAATGTC	CTATCACATC	AGGAAACGCC	300
TTCTGTACG	ATTTCAACGT	TCCGGACCAA	GCTGGTACTT	TCTGGTACCA	350
CAGCCATCTC	TCTACACAGT	ACTGTGACGG	TCTTCGTGGT	GCCTTTGTCTG	400
TCTACGATCC	TAATGATCCC	AACAAGCAAC	TCTACGATGT	TGATAACGGC	450

AACACCGTGA	TTACCTTGGC	TGATTGGTAC	CATGCCCTTG	CTCAGACTGT	500
CACTGGTGTG	GCAGTCTCTG	ATGCAACGTT	GATCAACGGA	TTGGGACGTT	550
CGGCCACCGG	CCCCGCAAAT	GCCCCTCTGG	CGGTCATCAG	CGTCGAGCGC	600
AATAAGCGCT	ATCGTTTCCG	ATTGGTTTCT	ATTTCTTGCG	ACCCTAACTT	650
TATTTTCTCA	ATTGACCACC	ACCCCATGAC	CGTCATTGAG	ATGGACGGTG	700
TTAATACCCA	ATCTATGACC	GTAGATTCTGA	TCCAAATCTT	CGCAGGTCAA	750
CGATACTCAT	TTGTCATGCA	AGCCAACCAA	CCAGTTGGAA	ATTACTGGAT	800
CCGCGCTAAA	CCTAATGTTG	GCAACACAAC	TTTCCTTGGA	GGCCTGAACT	850
CCGCTATCTT	GCGATACGTG	GGAGCCCCTG	ACCAAGAACC	GACCACTGAC	900
CAAACACCCA	ACTCTACACC	GCTCGTTGAG	GCGAACCTGC	GACCCCTCGT	950
CTACACTCCT	GTGCCGGGAC	AGCCATTCCC	TGGCGGTGCT	GATATCGTCA	1000
AGAACTTGGC	TTTGGGTTTC	AATGCCGGGC	GTTTCACAAT	CAATGGAGCG	1050
TCCCTCACAC	CTCCTACAGT	CCCTGTCCTG	CTCCAGATCC	TCAGCGGTAC	1100
TCACAATGCA	CAGGATCTTC	TCCCGGCAGG	AAGCGTGATC	GAACCTGAAAC	1150
AGAATAAAGT	TGTCGAAATC	GTTTTGCCCG	CTGCGGGCGC	CGTTGGCGGT	1200
CCTCATCCTT	TTCACTTGCA	TGGTCACAAT	TTCTGGGTGG	TTCGTAGCGC	1250
CGGTCAAACC	ACATACAATT	TCAATGATGC	TCCTATCCGT	GATGTTGTCA	1300
GCATTGGCGG	TGCAAACGAT	CAAGTCACGA	TCCGATTTGT	GACCGATAAC	1350
CCTGGCCCAT	GGTTCCTTCA	CTGTACACAT	GACTGGCATT	TGGAGGCTGG	1400
ATTCGCTGTC	GTCTTTGCGG	AGGGAATCAA	TGGTACTGCA	GCTGCTAATC	1450
CCGTCCCGGC	GGCTTGGAAAT	CAATTGTGCC	CGTTGTACGA	TGCCTTGAGC	1500
CCGGGTGATA	CATGAGGCGC	GCC			1523

que codifica el gen B de la laccasa fue sintetizado por McLab Inc. (Molecular Cloning Laboratories, 384 Oyster Point Blvd, Suite15, South San Francisco, CA94080). El ADN plasmídico sintético se digirió con las enzimas de restricción Spel y Ascl y el fragmento de ADN de 1,5 kb se aisló del gel y se clonó en el vector pTrex4 que también se digirió con Spel y Ascl para crear el plásmido de expresión (pTrex4-laccaseBopt), que es similar al plásmido de expresión mostrado en la Figura 4 excepto porque el gen B de la laccasa optimizado codónicamente sustituye al gen B de la laccasa (no optimizado). El plásmido se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. Se generaron más de 30 transformantes y se transfirieron a nuevas placas. Se seleccionaron un total de 20 transformantes estables y los micelios se transfirieron a 30 ml de medio definido que contiene cobre 1 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a 28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

Ejemplo 11

a. Expresión del gen D de la laccasa en *Trichoderma*

[0095] Para construir el plásmido de expresión para el gen D de la laccasa de la cepa CBS 115.075, se utilizaron dos cebadores (SEQ ID No. 63 y SEQ ID No. 64) en la reacción de PCR Herculase que contiene el molde de ADN genómico obtenido de la cepa CBS 115.075 (véase Ejemplo 2b). El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO. Se amplificaron 16 clones utilizando las cuentas de PCR Ready-To-Go y se secuenciaron cuatro ADN plasmídicos. Se seleccionó el clon pENTR-laccaseD CBS115.075#2. El plásmido pENTR-laccaseD CBS115.075#2 (50 ng) se convirtió en el plásmido de expresión pTrex3g-laccaseD, que es similar al plásmido de expresión mostrado en la Figura 1 excepto porque el gen D de la laccasa optimizado codónicamente sustituye al gen A de la laccasa, en una reacción de 10 µl de LB clonasa II que contiene 6,5 µl de TE, 1 µl del vector pTrex3g (0,1 mg/ml) y 2 µl de ClonaseII. El plásmido de expresión se confirmó de nuevo mediante la secuenciación del ADN y se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. Se seleccionaron 45 transformantes y se transfirieron a nuevas placas. Los micelios procedentes de 28 transformantes estables se transfirieron a 30 ml de medio definido que contiene cobre 0,5 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a 28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

b. Expresión del gen D de la laccasa en *Trichoderma* como fusión CBH1

[0096] Para construir el plásmido de expresión para el gen D de la laccasa de la cepa CBS 115.075, se diseñaron dos cebadores (GGACTAGTGTGCGCGTTTACAAACGCGCAATTGGGCCCGTGGCCGAC, SEQ ID No. 68) y (AAGGCGCGCCTTAAATAGCAGTTCCTTTCTTAG, SEQ ID No. 69) y se obtuvieron in vitro. Los cebadores se utilizaron en la reacción de PCR Herculase que contiene ADN genómico de la cepa CBS115.075 como molde de

ADN. El fragmento de la PCR se purificó utilizando la columna QIAquick spin y se digirió con las enzimas de restricción SpeI y Ascl y se clonó en el vector pTrex4 (véase solicitud de patente 10/590.956; WO 05/093050) que también se había digerido con SpeI y Ascl para crear el plásmido de expresión (pTrex4-laccaseD). La fidelidad del plásmido de expresión se confirmó mediante secuenciación del ADN y se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. Se generaron más de 300 transformantes y 60 transformantes se transfirieron a nuevas placas. Los micelios procedentes de 25 transformantes estables se transfirieron a 30 ml de medio definido que contiene cobre 0,5 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a 28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

5

10 **Ejemplo 12**

[0097] Expresión del gen D de la laccasa en *Trichoderma* como fusión CBS1 utilizando un gen sintético optimizado codónicamente

15 **[0098]** El ADN (SEQ ID NO: 70):

```

ACTAGTGTCTG CCGTTTACAA ACGCGCTATT GGACCAGTTG CTGATCTGCA 50
CATCGTTAAC AAGGATTTGG CCCCAGACGG CGTCCAGCGC CCAACTGTTC 100
TGGCCGGTGG AACTTTTCCG GGCACGCTGA TTACCGGTCA AAAGGGCGAC 150
AACTTCCAGC TGAACGTGAT TGATGACCTG ACCGACGATC GCATGTTGAC 200
CCCTACTTCG ATCCATTGGC ATGGTTTCTT CCAGAAGGGA ACCGCCTGGG 250
CCGACGGTCC GGCTTTCGTT ACACAGTGCC CTATTATCGC AGACAACTCC 300

```

```

TTCCTCTACG ATTTTCGACGT TCCCGACCAG GCGGGCACCT TCTGGTACCA 350
CTCACACTTG TCTACACAGT ACTGCGACGG TCTGCGCGGT GCCTTCGTTG 400
TTTACGACCC CAACGACCCT CACAAGGACC TTTATGATGT CGATGACGGT 450
GGCACAGTTA TCACATTGGC TGACTIONGAT CACGTCCTCG CTCAGACCGT 500
TGTCGGAGCT GCTACACCCG ACTCTACGCT GATTAACGGC TTGGGACGCA 550
GCCAGACTGG CCCCGCCGAC GCTGAGCTGG CCGTTATCTC TGTTGAACAC 600
AACAAAGAGT ACCGTTTCAG ACTCGTCTCC ATCTCGTGCG ATCCCAACTT 650
CACTTTTAGC GTCGACGGTC ACAACATGAC GGTTATCGAG GTTGATGGCG 700
TGAATACCCG CCTCTCACC GTCGATTCCA TTCAAATTTT CGCCGGCCAG 750
CGATACTCCT TTGTGCTGAA TGCCAATCAG CCCGAGGATA ACTACTGGAT 800
CCGCGCTATG CCTAACATCG GACGAAACAC CACTACCCTT GATGGCAAGA 850
ATGCCGCTAT CCTGCGATAC AAGAACGCCA GCGTTGAGGA GCCCAAACC 900
GTCGGAGGAC CCGCGCAGAG CCCATTGAAC GAGGCCGACC TGCACCTCT 950
GGTGCCCGCT CCTGTCCCTG GCAACGCAGT TCCTGGTGGT GCGGACATCA 1000
ACCACCGCCT GAACCTGACA TTCAGCAACG GCCTCTTCTC TATCAATAAC 1050
GCATCATTTA CAAACCCAG CGTCCCTGCC TTGTTGCAGA TTCTTTCCGG 1100
CGCACAAAC GCTCAGGATC TGCTTCCCAC CGGTTCTTAT ATCGGCTTGG 1150
AGTTGGGCAA GGTCGTTGAA CTCGTGATCC CTCCCTTGGC CGTTGGTGGC 1200
CCCCATCCAT TCCACTTGCA CGGCCACAAC TTTTGGGTCTG TCCGAAGCGC 1250
TGGTCTGAC GAGTATAATT TCGACGATGC AATTTTGCGC GACGTGGTCA 1300
GCATTGGCGC GGGAACTGAC GAGGTTACTA TCCGTTTTGT CACTGATAAC 1350
CCAGGCCCTT GGTTCTCCA TTGCCACATC GACTGGCACC TCGAAGCCGG 1400
CCTCGCCATT GTTTTCGCCG AAGGCATCAA TCAAACCGCA GCCGCCAACC 1450
CGACTCCACA GGCCTGGGAC GAACTCTGCC CCAAGTATAA CGGACTCTCC 1500
GCTTCCCAGA AAGTGAAGCC CAAGAAGGGA ACAGCCATCT AAGGCGCGCC 1550

```

20

que codifica el gen D de la laccasa (basado en el gen procedente de CBS 115.075) fue sintetizado por DNA2.0 Inc. (1455 Adams Drive, Menlo Park, CA94025). El ADN plasmídico sintético se digirió con las enzimas de restricción SpeI y Ascl y el fragmento de ADN de 1,5 kb se aisló del gel y se clonó en el vector pTrex4 que también se digirió con SpeI y Ascl para crear el plásmido de expresión (pTrex4-laccaseDopt). El plásmido se transformó de manera biolística en una cepa de *Trichoderma*. Se transfirieron 40 transformantes a nuevas placas. Se seleccionaron un total de 24 transformantes estables y los micelios se transfirieron a 30 ml de medio definido que contiene cobre 0,5 mM.

25

Los cultivos se dejaron crecer durante 4 días a 28 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

Ejemplo 13

Expresión del gen D de la laccasa en *Bacillus* como fusión BCE103 utilizando un gen sintético optimizado codónicamente

[0099] El ADN (SEQ ID NO: 71):

```

GGATCCTGAA GCTATCGGTC CGGTTGCAGA TTTACACATC GTAAACAAAG 50
ATCTTGACC TGACGGCGTT CAACGTCCAA CTGTACTTGC TGGTGGAAACA 100
TTCCCTGGTA CACTTATTAC TGGTCAAAAA GGTGACAAC TCCAATTAAA 150
CGTAATTGAC GATCTTACAG ATGACCGTAT GCTTACACCG ACTTCAATTC 200
ACTGGCACGG TTTCTTCAA AAAGGAACAG CATGGGCTGA TGGTCTGCA 250
TTCGTTACAC AATGTCCAAT CATTGCTGAT AACTCTTTC TTTACGATTT 300
TGACGTTCTT GATCAAGCTG GTACATTCTG GTATCACTCA CACTTATCCA 350
CACAACTACTG CGATGGACTT CGCGGAGCTT TCGTAGTTTA CGACCCAAAC 400

GATCCTCATA AAGACCTTTA CGATGTAGAT GATGGTGGAA CAGTTATCAC 450
ATTAGCTGAT TGGTACCATG TACTTGCTCA AACAGTTGTA GGTGCAGCTA 500
CACCAGATTC AACACTTATC AATGGATTAG GACGTTCTCA AACTGGTCCT 550
GCTGACGCAG AACTTGCTGT AATCTCTGTT GAACATAACA AACGTTACAG 600
ATTCCGTCTT GTTAGCATT CTTGCGATCC AAACCTCACA TTTTCAGTTG 650
ACGGACATAA CATGACAGTT ATCGAAGTAG ATGGTGTAAC CACACGTCCA 700
CTTACTGTAG ACTCTATCCA AATCTTCGCA GGACAACGTT ACTCATTCTG 750
ATTAAACGCA AATCAACCAG AAGATAACTA CTGGATTCGT GCAATGCCAA 800
ACATCGGACG TAACACTACA ACTCTTGACG GCAAAAACGC AGCTATTCTT 850
CGTTACAAAA ACGCTTCTGT TGAAGAACCT AAAACAGTTG GTGGACCAGC 900
ACAATCACCA CTTAACGAAG CTGACTTACG TCCACTGGTT CCAGCACCTG 950
TACCTGGAAA CGCTGTACCA GGAGGTGCTG ATATTAATCA TAGACTTAAC 100
CTTACTTTCT CTAACGGTCT GTTCTCAATC AACACGCTT CATTACAAA 1050
TCCTTCAGTT CCAGCACTTT TACAAATTCT TAGCGGTGCA CAAATGCTC 1100
AGGATCTTTT ACCAACTGGA TCTTACATTG GTCTTGAAC TGGTAAAGTA 1150
GTTGAATTAG TAATTCCTCC GCTTGCTGTA GGTGGACCAC ATCCTTTCCA 1200
TCTTCACGGT CATAACTTCT GGGTTGTACG TTCTGCTGGT TCAGATGAAT 1250
ACAACTTCGA TGACGCAATT CTTCGTGATG TTGTATCTAT TGGTGTGGA 1300
ACAGATGAAG TAACTATTCT TTTCGTAACA GATAACCCTG GTCCTTGTT 1350
CTTACATTGT CATATCGATT GGCATCTTGA AGCTGGACTT GCTATTGTTT 1400
TCGCTGAAGG AATCAATCAA ACAGCTGCAG CTAACCCAAC ACCTCAAGCA 1450
TGGGACGAAT TATGTCCAAA ATACAACGCA CTTTCTCCAG GAGATACTTA 1500
AAAGCTT 1507

```

10 que codifica el gen D de la laccasa (basado en el gen procedente de CBS 115.075) fue sintetizado por DNA2.0 Inc. (1455 Adams Drive, Menlo Park, CA94025). El ADN plasmídico sintético se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII y el fragmento de ADN de 1,5 kb se aisló del gel y se clonó en el vector p2JMagk1031nk2 (véase documento US20050202535A1) digerido con las dos mismas enzimas de restricción para crear el plásmido de expresión p2JMagk1031nk2E-laccase (Figura 6). El plásmido se transformó en una cepa de *B. subtilis* (deg^{UHy}32, oppA, DspolIE, DaprE, DnprE, Depr, DispA, Dbpr, Dvpr, DwprA, Dmpr-ybfJ, DnprB, amyE: : xilRPxiiAcomK-ermC) (véase documento US20050202535A1). Se seleccionaron dos transformantes en placas de agar Luria Broth con 5 mg/ml de cloranfenicol, y a continuación para seleccionar los clones con el mayor número de copias de los genes, las colonias se sembraron en serie con un asa bacteriológica en placas de agar Luria Broth con 25 mg/ml de cloranfenicol hasta que se obtuvo un crecimiento rápido de las colonias. Los transformantes amplificados se inocularon en 30 ml de medio MBD (véase documento US20050202535A1) que contiene cobre 0,5 mM. Los cultivos se dejaron crecer durante 60 h a 37 °C. Los caldos de cultivo se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo ABTS.

Ejemplo 14**Blanqueo de índigo solubilizado con diferentes laccasas**

5 **[0100]** Se llevó a cabo un ensayo para el blanqueo del sustrato índigo solubilizado mediante combinaciones de laccasa/mediador en placas de microtitulación de 96 pocillos de la manera siguiente.

10 **[0101]** Se preparó una disolución saturada de índigo en N-metilpirrolidona (NMP) agitando índigo (30 mg) en NMP (10 ml) a temperatura ambiente durante 5 horas. La disolución de NMP se diluyó 10 veces en una disolución acuosa tampón que produjo una disolución azul. Por ejemplo, la dilución en tampón acetato sódico 50 mM a pH 5, o tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7. Las disoluciones se agitaron bien inmediatamente antes de su uso.

15 **[0102]** El ensayo para el blanqueo del sustrato índigo solubilizado se llevó a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos en el que cada pocillo contenía la disolución de índigo soluble en tampón acetato sódico 50 mM a pH 5 (180 µl), laccasa (10 ppm de enzima) y disolución mediadora (de una disolución madre 20 mM en metanol). El volumen total de cada pocillo se ajustó a 200 µl con agua desionizada. Se corrió un control por duplicado que contenía sólo laccasa. La placa se selló y se incubó a 50 °C durante 2 horas a 800 rpm en un agitador calefactado (Thermomixer, Eppendorf). Después de este periodo, las placas se abrieron y se añadió una disolución de ácido ascórbico (20 µl de una disolución acuosa al 10 %) a cada pocillo con el fin de reducir las formas oxidadas de los mediadores. A continuación se valoró el grado de blanqueo del índigo determinando la absorbancia de cada pocillo a 20 600 nm utilizando un lector de placas de microtitulación. Cuanto menor es la lectura de la absorbancia, mayor es el grado de blanqueo del índigo.

25 **[0103]** La Figura 7 muestra los resultados para una laccasa de la especie *Thielavia* (Ecostone LCC10, AB enzymes, Darmstadt, Alemania). Los mediadores utilizados fueron ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ácido siríngico, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA), siringato de metilo (MS), 4-(N-metil-carboxamido)-2,6-dimetoxifenol (MSA), 10-(carboxipropil)-fenotiazina (PTP) y siringaldehído. Los cambios en la absorbancia a 600 nm en relación al control se listan en la Tabla 1 en la que el cambio más grande en la absorbancia corresponde al mayor grado de blanqueo del índigo.

30 **[0104]** A una concentración de mediador de 500 µM, el mediador más eficaz para el blanqueo del índigo fue el ABTS, seguido por la N-metilamida (MSA) y la amida no sustituida, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA). A la concentración de mediador más baja de 50 µM, el ABTS aún era el mediador más eficaz, siendo el resto de mediadores más o menos equivalentes. La excepción fue el ácido siríngico, que blanqueó el índigo soluble no más eficazmente que las condiciones de control.

35 Tabla 1. Cambio en la absorbancia a 600 nm después del blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de la especie *Thielavia* y una variedad de mediadores a unas concentraciones de 500 y 50 µM (n = 2)

Mediador	Concentración 500 mM		Concentración 50 mM	
	ΔA600	Desv. Están.	ΔA600	Desv. Están.
Control	0	0,008	0	0,010
ABTS	0,235	0,019	0,174	0,032
Ácido siríngico	0,024	0,017	0,005	0,009
SA	0,170	0,018	0,088	0,014
Siringato de metilo	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
Siringaldehído	0,132	0,012	0,092	0,017

40

Ejemplo 15. Ensayo de blanqueo de índigo soluble con diferentes laccasas a dos valores de pH

45 **[0105]** Laccasas derivadas de las especies *Myceliophthora* (Denilite® II, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), *Thielavia* (Ecostone LCC 10, AB enzymes, Darmstadt, Alemania) y *Cerreña* se valoraron para su capacidad de blanquear índigo solubilizado junto con mediadores de bajo peso molecular a dos valores de pH.

50 **[0106]** El blanqueo de índigo solubilizado en placas de microtitulación de 96 pocillos se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 14, utilizando 3 laccasas diferentes a valores de pH 5 y 7. Los mediadores utilizados fueron ácido sinapínico, 4-carboxamido-2,6-dimetoxifenol (SA), siringato de metil-4-acetilo (AMS), siringato de metilo (MS) y ácido 2,2'-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados del blanqueo de índigo soluble a valores de pH de 5 y 7 utilizando 3 laccasas derivadas de las especies *Myceliophthora*, *Thielavia* y *Cerreña*, respectivamente. Estos datos están representados en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Cambio en la absorbancia a 600 nm en relación a un control después del blanqueo de índigo soluble utilizando laccasas procedentes de las especies *Myceliophthora*, *Thielavia* y *Cerrena* a pH 5, a una concentración de mediador de 250 μ M.

Mediador	Laccasa					
	<i>Thielavia</i>		<i>Myceliophthora</i>		<i>Cerrena</i>	
	ΔA_{600}	Desv. Están.	ΔA_{600}	Desv. Están.	ΔA_{600}	Desv. Están.
Control 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
Control 2	-0,007	0,017	-0,011	0,007	-0,006	0,005

5 Tabla 3. Cambio en la absorbancia a 600 nm en relación a un control después del blanqueo de índigo soluble utilizando laccasas procedentes de las especies *Myceliophthora*, *Thielavia* y *Cerrena* a pH 7, a una concentración de mediador de 250 μ M.

Mediador	Laccasa					
	<i>Thielavia</i>		<i>Myceliophthora</i>		<i>Cerrena</i>	
	ΔA_{600}	Desv. Están.	ΔA_{600}	Desv. Están.	ΔA_{600}	Desv. Están.
Control 1	0	0,008	0	0,001	0	0,006
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
Control 2	0,007	0,006	-0,004	0,001	0	0,005

10 Ejemplo 16. Purificación y determinación de actividad específica

15 [0107] El gen D optimizado de la laccasa (SEQ ID NO: 70) se expresó mediante el sistema de expresión descrito en la solicitud copendiente WO 2009/058956 titulada "Signal Sequences and co-expressed chaperones for improved heterologous protein production in a host cell", presentada el 1 de noviembre de 2007 en fermentadores de 14 litros. El caldo de fermentación se recogió a las 184 horas y se concentró mediante ultrafiltración (UFC 20070245). El concentrado se sometió a diafiltración en tampón acetato sódico 25 mM, a pH 4,0. A continuación se cargaron 500 ml de la muestra UFC diafiltrada en una columna de intercambio iónico que contiene resina Poros HS-20 (Applied Biosystems, columna de 20 X 275 mm) equilibrada con tampón acetato sódico 25 mM, a pH 4,0. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón acetato sódico 25 mM, a pH 4,0. La proteína D de la laccasa se eluyó de la columna utilizando un gradiente salino (12 volúmenes de columna) de cloruro sódico entre 40 mM y 80 mM en tampón acetato sódico 25 mM, a pH 4,0. Las fracciones que contienen la actividad laccasa se reunieron y se concentraron adicionalmente utilizando una celda de agitación Amicon de 400 ml con una membrana 10K. La proteína total se midió con un gel de proteínas SDS utilizando BSA como patrón a 4 mg/ml (> 90 % puro). La muestra laccasa se diluyó 10.000 veces con agua y se almacenó a temperatura ambiente durante 18 horas y a 4 °C durante más de 24 horas. La actividad del ABTS se midió en 8570 U/ml. La actividad específica de la laccasa D recombinante se calculó a continuación dividiendo las 8570 U/ml por 4 mg/ml dando como resultado 2140 U/mg de proteína, que es más de 100 veces superior a la actividad de la laccasa de *Stachybotrys* (16 U/mg), (véase Mander y col, Appl. Environ. Microbiol. (2006) 72: 5020 – 5026). Así, esta enzima produce una menor liberación de cobre al medio ambiente que otras laccasas, por ejemplo, la laccasa de *Stachybotrys*, en virtud de su alta actividad específica.

Ejemplo 17. Procedimiento para el blanqueo de tejido vaqueroMediadores

5 **[0108]** La 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (siringamida, SA) se obtuvo en Punjab Chemicals & Crop Protection Limited (Mumbai, India). El 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzonitrilo (siringonitrilo, SN) se obtuvo en StereoChemical, Inc., (Newark, DE) o Punjab Chemicals & Crop Protection Limited (Mumbai, India).

Enzima

10 **[0109]** En los experimentos se utilizó la enzima laccasa, derivada de *Cerreña unicolor* (Ejemplo 16, 8570 U/ml, 4 mg de proteína/ml).

Procedimiento

15 **[0110]** Las incubaciones de la enzima se realizaron en un ATLAS LP 2 Launder-O-meter a diferentes condiciones en relación con el pH, la temperatura, la concentración de enzima y la concentración del mediador.

20 **[0111]** Las reacciones se llevaron a cabo en matraces de reacción de acero inoxidable de 500 ml que contienen 100 ml de líquido. A cada matraz se le añadió cinco (7 x 7 cm) retazos de tejido vaquero lavados a la piedra (estilo vaquero ACG 80270) y 6 bolas de acero de 6 mm de diámetro. Los matraces de reacción se cerraron y se introdujeron en el laurider-O-meter que se había calentado previamente hasta la temperatura deseada. La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos, tras los cuales los retazos se lavaron con un chorro de agua del grifo, se secaron por centrifugación en una centrífuga AEG IPX4 y se secaron con una plancha Elna Press Electronic en programa de algodón y se evaluó.

Lavado a la piedra del tejido vaquero

30 **[0112]** El tejido vaquero, 12 perneras con un peso de 3 kg aproximadamente, se desaprestó en una lavadora Unimac UF 50 en las siguientes condiciones:

35 • Desaprestado durante 15 minutos a una relación de líquidos de 10: 1 a 50 °C con 0,5 g/l (15 g) de amilasa Optimize 160 (Genencor) y 0,5 g/l (15 g) de un tensioactivo no iónico (por ejemplo, Rucogen BFA, (Rudolf Chemie) o Ultravon GPN, (Huntsman)).

• 2 aclarados en frío durante 5 minutos a una relación de líquidos de 30: 1.

40 **[0113]** Después del desaprestado el tejido vaquero se lavó a la piedra en una lavadora Unimac UF 50 en las siguientes condiciones:

• Aclarado en frío durante 5 minutos a una relación de líquidos de 10: 1.

45 • Lavado a la piedra durante 60 minutos a una relación de líquidos de 10: 1 a 55 °C con 1 kg de piedra pómez, tampón citrato (30 g de citrato de tri-sodio dihidratado y 30 g de monohidrato de ácido cítrico) y 35 g de celulasa IndiAge 2XL (Genencor).

• 2 aclarados en frío durante 5 minutos a una relación de líquidos de 30: 1.

50 **[0114]** El tejido vaquero se secó en una secadora doméstica Miele Novotronic T494C. A partir de las perneras de tela vaquera se cortaron retazos de 7 x 7 cm.

Evaluación de retazos de tejido vaquero

55 **[0115]** Se midió el color de los cinco retazos de tejido vaquero con un Minolta Chromameter CR 310 en el espacio de color del CIE Lab con una fuente de luz D 65. Las mediciones se realizaron antes y después del tratamiento con la laccasa y los resultados de los cinco retazos se promediaron. Se calculó la diferencia total de color (TCD). La diferencia total de color se puede calcular con la fórmula: $TCD = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$.

Evaluación de las perneras de tejido vaquero

60 **[0116]** Las perneras de tejido vaquero se evaluaron con un Minolta Chromameter CR 310 en el espacio de color del CIE Lab con una fuente de luz D 65. Las mediciones se realizaron sólo después del tratamiento con la laccasa. Para cada pernera de tejido vaquero se tomaron ocho mediciones y los resultados de las 12 perneras (96 mediciones) se promediaron. La diferencia total de color (ΔE) se calcula a partir de la diferencia entre los valores inicial y final de CIE $L^*a^*b^*$, según la fórmula:

65

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

Ejemplo 18. Efecto de la temperatura sobre el comportamiento blanqueante de la laccasa D recombinante (Unimac)

5 [0117] Blanqueo con la laccasa del tejido vaquero lavado a la piedra: El tejido vaquero, 12 perneras de 3 kg aproximadamente, se desaprestó y se lavó a la piedra como se ha descrito en el Ejemplo 17. Después del lavado a la piedra, se realizó un tratamiento con la laccasa en una lavadora Unimac UF 50 según el siguiente procedimiento:

- 10 • 30 minutos a una relación de líquidos de 10: 1.
- pH 6 (21 g de fosfato monosódico y 5 g de ácido adípico, laccasa D) o pH 4,8 (8,6 g de fosfato monosódico y 16,8 g de ácido adípico, laccasa Novoprime Base 268).
- 15 • Laccasa (laccasa D o Novoprime Base 268).
- Mediador (siringamida (SA) y siringonitrilo (SN)).
- Después del tratamiento con la laccasa el tejido vaquero se aclaró dos veces con agua fría durante 5 minutos a una relación de líquido de 30: 1.
- 20

[0118] Se llevaron a cabo los experimentos con la laccasa y los resultados se presentan en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4

Concentración Laccasa D	Mediador	Concentración Mediador	Temperatura (°C)	Nivel de blanqueo (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

Tabla 5

Concentración Novoprime base 268	Concentración Mediador	Temperatura (°C)	Nivel de blanqueo (CIE L)
0,05 g/l	0,023 g/l	60	35,9
0,05 g/l	0,023 g/l	40	33,7

25 [0119] La laccasa D recombinante presenta un mejor comportamiento a bajas temperaturas que las laccasas comerciales disponibles actualmente. La laccasa D (en presencia del mediador) proporciona un efecto blanqueante a temperaturas por debajo de los 60 °C, preferentemente entre 40 °C y 60 °C. Así, la laccasa puede proporcionar un beneficio energético al procesador textil.

30 **Ejemplo 19. Efecto de la concentración de la enzima laccasa recombinante y el mediador sobre el comportamiento blanqueante (Launder-O-meter)**

35 [0120] Se evaluó el efecto de la concentración de la laccasa y el mediador corriendo los experimentos de la tabla siguiente a pH 6 (tampón fosfato monosódico 50 mM con el pH ajustado mediante una disolución de hidróxido sódico 4 N) y una temperatura de 60 °C.

[0121] Los experimentos se realizaron con el mediador siringamida (SA) - y siringonitrilo (SN).

40 [0122] Se añadieron 100 ml de tampón a un vaso de precipitados con cinco retazos de 7 x 7 cm. Peso total 12 g, (relación de tejido vaquero: líquido = 1: 8). Las concentraciones de laccasa y mediador se utilizaron como se indica en las tablas siguientes.

Tabla 6

Concentración de la enzima Laccasa (µl/l)	Correspondencia de la Actividad (Unidades Laccasa/g tejido vaquero)
10	0,67
33	2,17
55	3,67
78	5,17
100	6,67

Tabla 7
Concentración Mediador (mM)

0,10
0,33
0,55
0,78
1,00

5 **[0123]** A cada vaso de precipitados se le añadieron cantidades de mediador siringamida o siringonitrilo tal y como se indica en las tablas siguientes como dilución de una disolución madre de SA o SN 275 mM en metanol al 98 %. La laccasa se añadió a cada vaso de precipitados como se indica en las tablas siguientes, como dilución de una disolución madre de laccasa de 400 U/ml. Los vasos de precipitados se cerraron y se procesaron a 60 °C como se describe en el Ejemplo 17. Los retazos se evaluaron como se describe en el Ejemplo 17.

Tabla 8
LACCASA + SA a 60 °C y pH 6

Laccasa (µl/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	3,1
100	0,55	5,8
78	0,78	5,9
100	0,10	3,2
55	0,10	3,1
10	0,55	3,6

TCD = diferencia total de color

Tabla 9
LACCASA + SN a 60 °C y pH 6

Laccasa (µl/l)	Mediador siringonitrilo (mM)	TCD
100	1,00	7,6
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 = diferencia total de color

[0124] Las Tablas anteriores y las Figuras 10 y 11 muestran que se necesita tanto la enzima como el mediador para conseguir el blanqueo. También muestra que hay flexibilidad en la relación de enzima/mediador en la consecución de cierto nivel de blanqueo.

5 **Ejemplo 20. Efecto de dosis-respuesta de la laccasa D recombinante sobre el comportamiento de blanqueo (Unimac)**

10 [0125] Blanqueo con la laccasa del tejido vaquero lavado a la piedra: El tejido vaquero, 12 perneras de 3 kg aproximadamente, se desaprestó y se lavó a la piedra como se ha descrito en el Ejemplo 17. Después del lavado a la piedra, se realizó un tratamiento con la laccasa según el siguiente procedimiento: 30 minutos a una relación de líquidos de 10: 1 y pH 6 (21 g de fosfato monosódico y 5 g de ácido adípico) y 60 °C con la laccasa y mediador. Después del tratamiento con la laccasa el tejido vaquero se aclaró dos veces con agua fría durante 5 minutos a una relación de líquido de 30: 1.

15 [0126] Se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

- Siringamida 0,33 mM:

Concentración de laccasa en <i>Cerrena unicolor</i> (g/l)	Nivel de blanqueo (CIE L)
0,010	34,6
0,05	36,2
0,25	36,2

- 20 • Siringonitrilo 0,39 mM:

Concentración de Laccasa D (g/l)	Nivel de blanqueo (CIE L)
0,25	37,7
0,4	39,5
0,53	38,8

25 [0127] Los resultados se muestran en las tablas anteriores. Esto demuestra que con la laccasa D recombinante y el mediador amida el nivel de blanqueo se estabiliza rápidamente. Con una concentración de enzima de 0,05 y 0,25 se obtiene el mismo nivel de blanqueo. Para la laccasa D recombinante y el mediador nitrilo el nivel de blanqueo se incrementa hasta 0,4 g/l, que parece ser el óptimo.

30 [0128] Se debe entender que los ejemplos y formas de realización descritos en el presente documento tienen sólo fines ilustrativos y que en vista de ellos son posibles diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una laccasa aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, o que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 % a la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16.
2. Un ácido nucleico aislado que codifica una laccasa según la reivindicación 1.
3. Un ácido nucleico aislado según la reivindicación 2 en el que dicho ácido nucleico tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15.
- 10 4. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
- 15 5. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión según la reivindicación 4.
6. Un procedimiento de blanqueo de colorantes en una disolución, procedimiento que comprende el tratamiento de los colorantes en la disolución con una laccasa de la reivindicación 1 y un mediador eficaz.
- 20 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que el mediador se selecciona del grupo constituido por acetosiringona, siringaldehído, siringamida, metilsiringamida, 2-hidroxietil siringamida, siringato de metilo, siringonitrilo, dimetilsiringamida, y ácido siríngico.
8. El uso de una laccasa según la reivindicación 1 en un procedimiento para el blanqueo de tejidos.
- 25 9. El uso según la reivindicación 8 en el que el procedimiento comprende además la utilización de un mediador seleccionado del grupo constituido por acetosiringona, siringaldehído, siringamida, metilsiringamida, 2-hidroxietil siringamida, siringato de metilo, siringonitrilo, dimetilsiringamida, y ácido siríngico.
- 30 10. Un procedimiento según la reivindicación 8, en donde el tejido se tiñe con un colorante de tina.
11. Un procedimiento según la reivindicación 8, en donde el tejido es un tejido celulósico, una mezcla de fibras celulósicas, o una mezcla de fibras celulósicas y sintéticas.
12. Un procedimiento según la reivindicación 8, en donde el tejido es tejido vaquero.

Figura 1

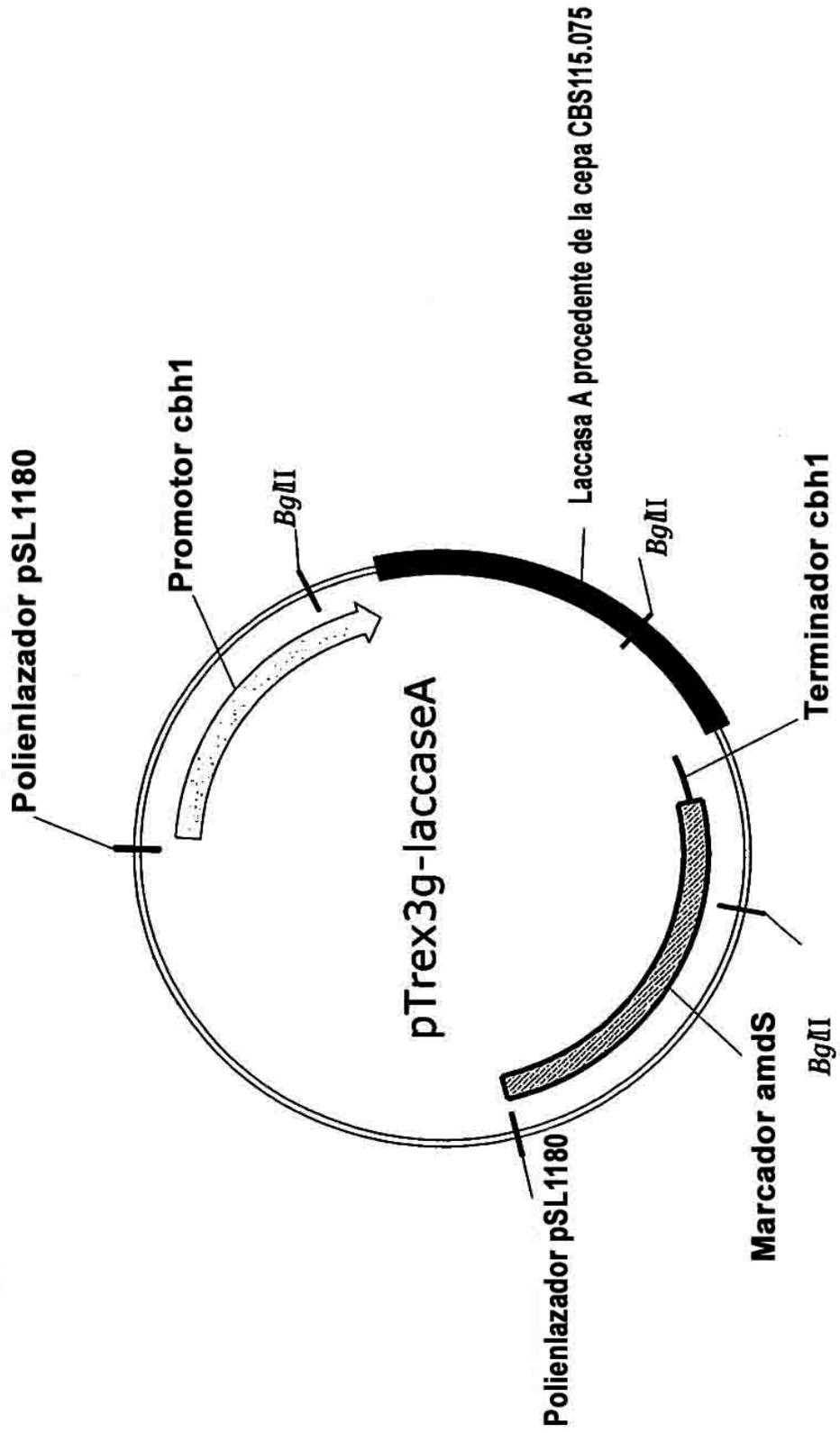


Figura 2

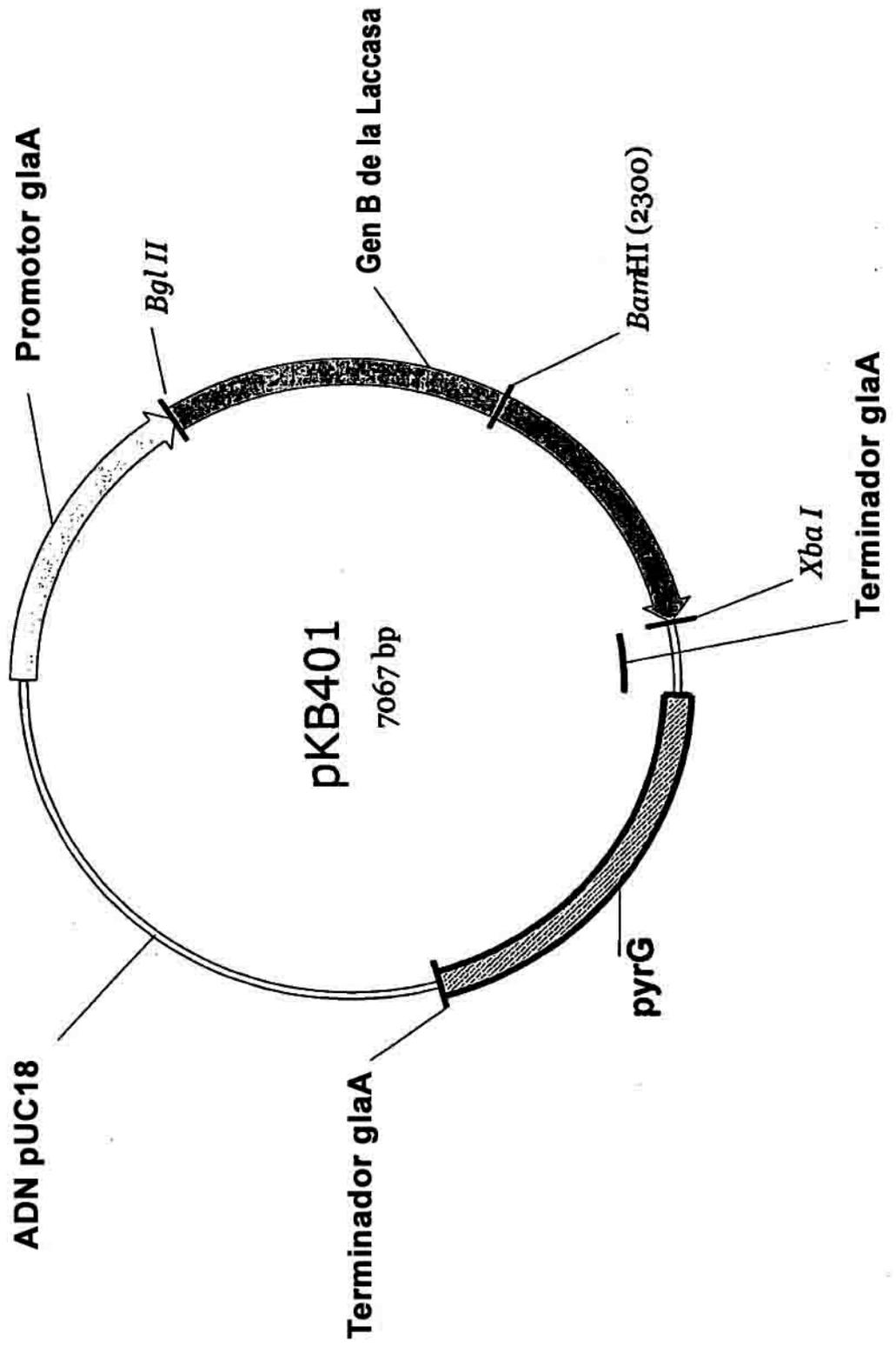


Figura 3

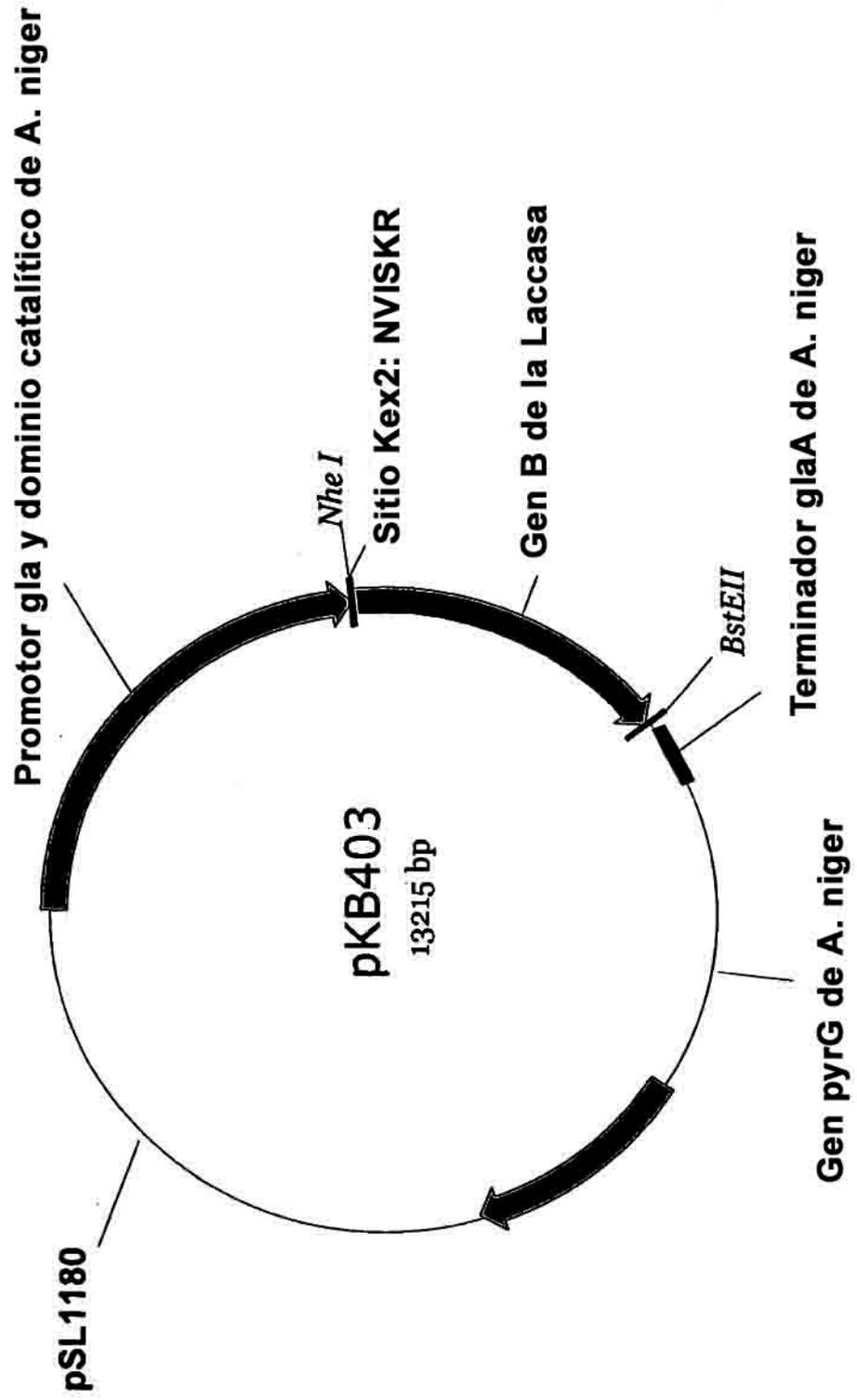
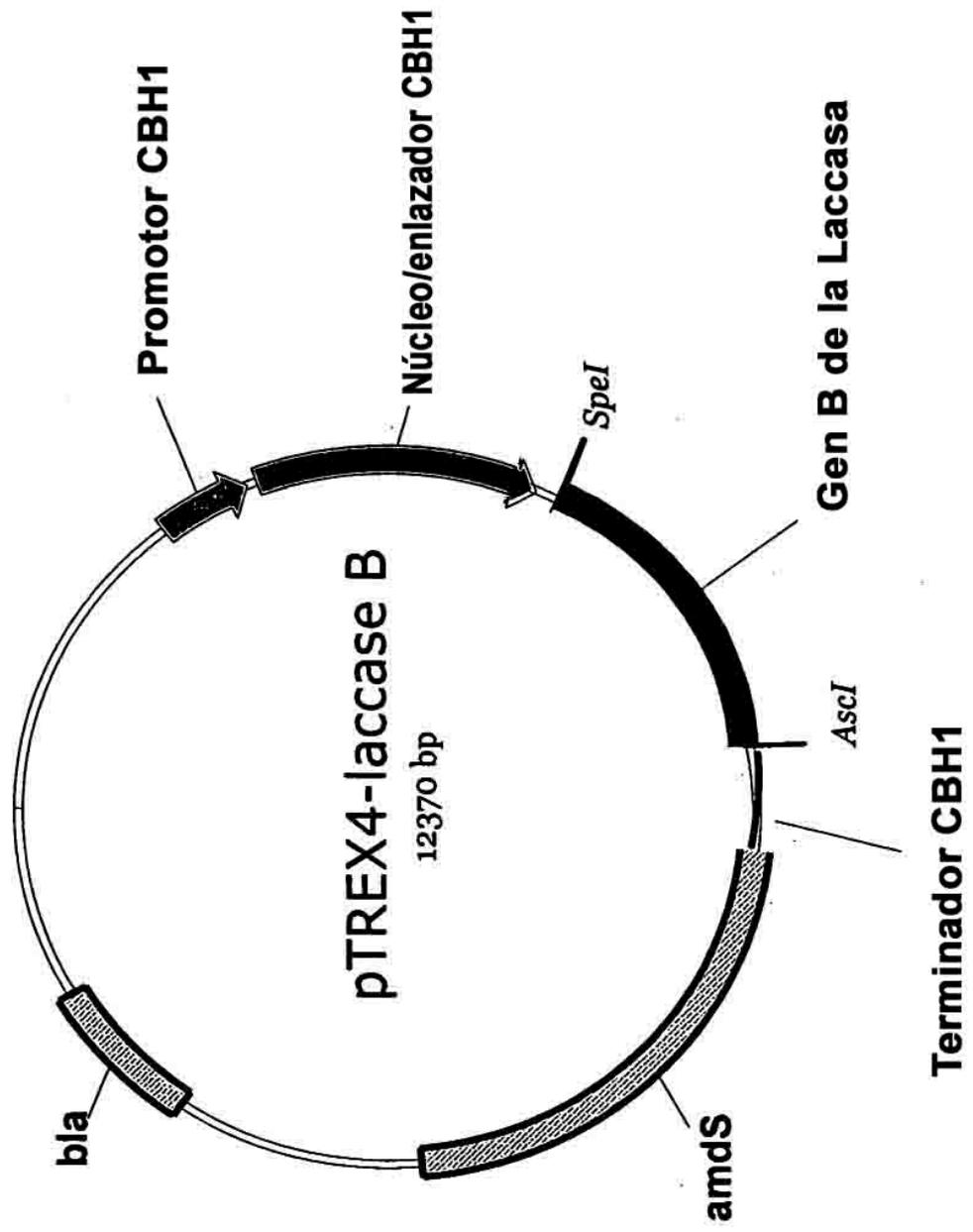


Figura 4



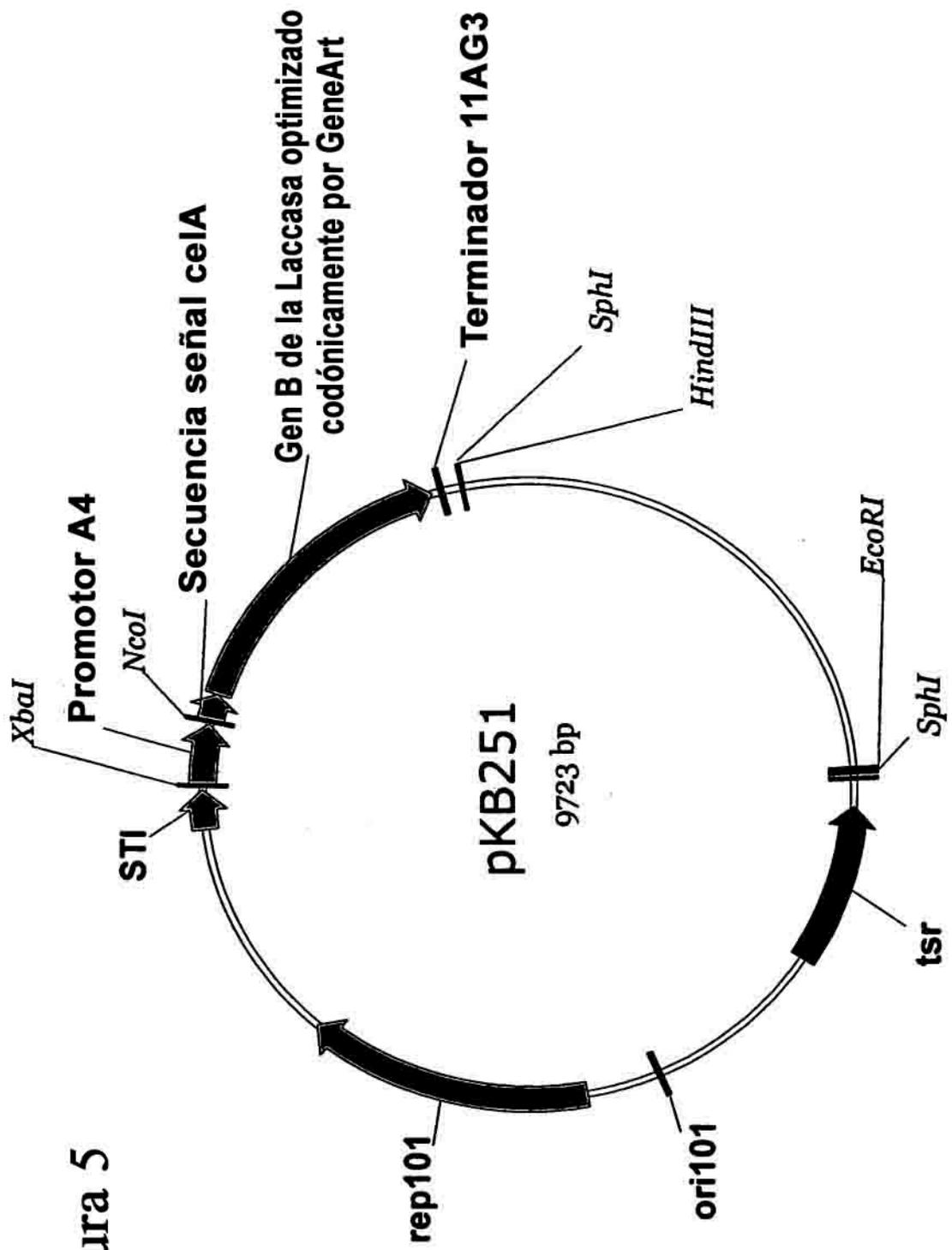


Figura 5

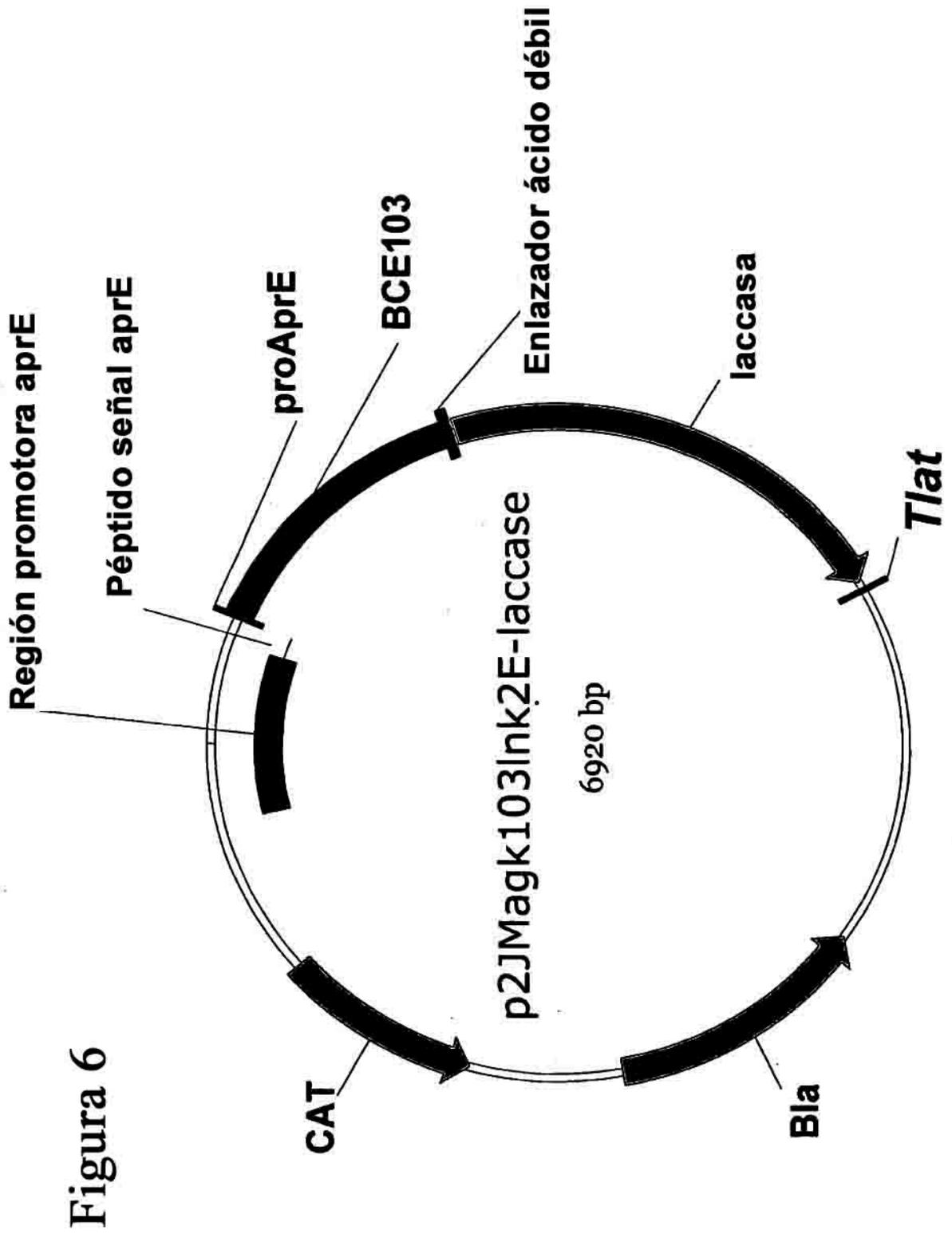


Figura 6

Figura 7. Blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de la especie *Thielavia* y una variedad de mediadores a unas concentraciones de 50 y 500 μM .

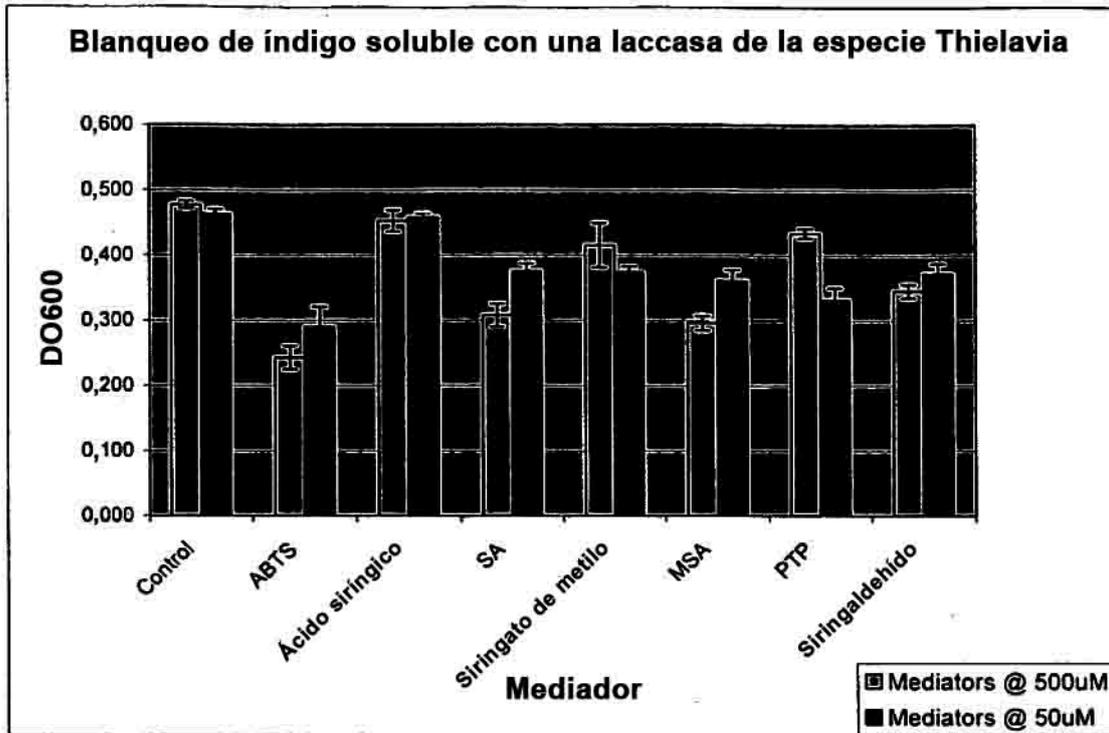


Figura 8. Blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de las especies *Thielavia*, *Myceliophthora* y *Cerrena* y una variedad de mediadores a pH 5.

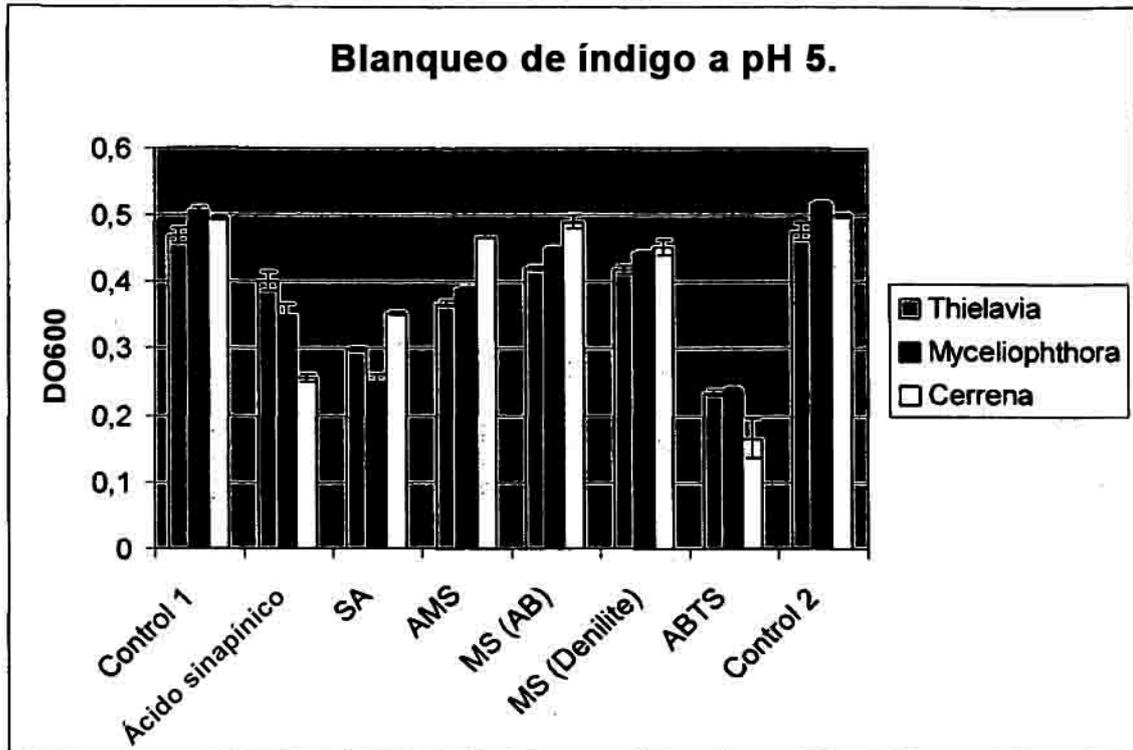


Figura 9. Blanqueo de índigo soluble utilizando una laccasa de las especies *Thielavia*, *Myceliophthora* y *Cerrena* y una variedad de mediadores a pH 7.

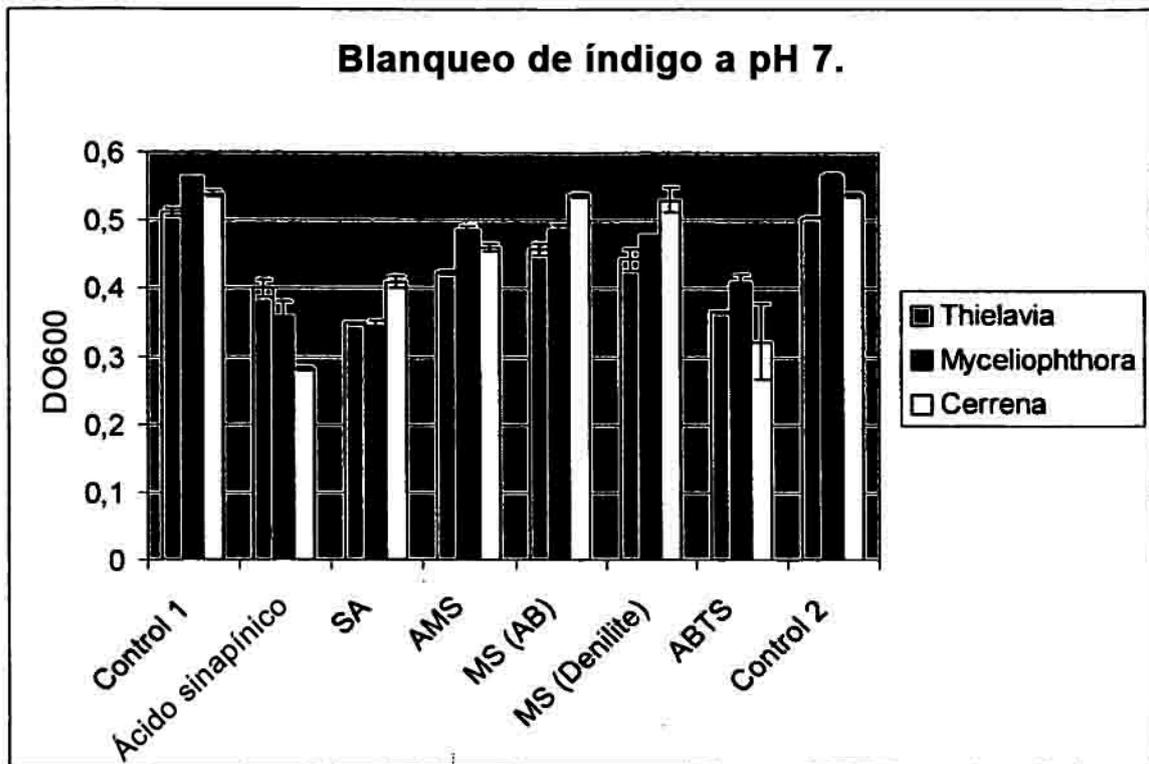


Figura 10

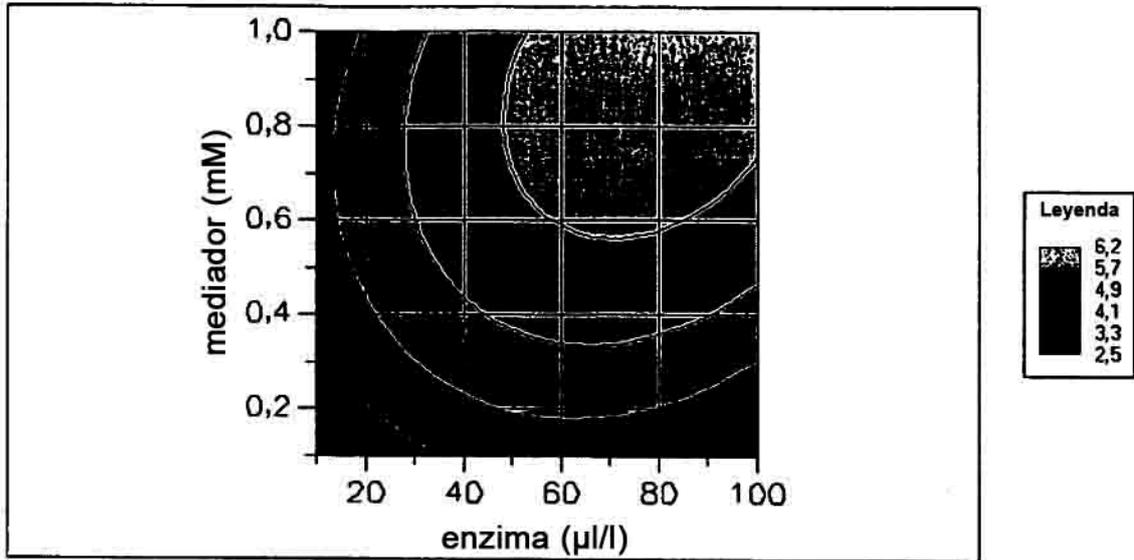


Figura 11

