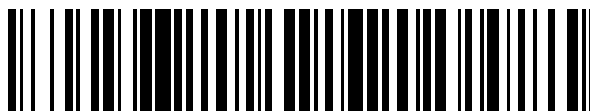


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 242**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2013 PCT/EP2013/068836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2013 E 13759767 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2895599**

54 Título: **Una lacasa novedosa de Ganoderma lucidum capaz de potenciar la degradación enzimática de biomasa lignocelulolítica**

30 Prioridad:

11.09.2012 EP 12183917

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

21.11.2017

73 Titular/es:

**DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET (100.0%)
Anker Engelundsvej 1 Bygning 101A, 2. sal
2800 Kgs. Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**SITARZ, ANNA;
MIKKELSEN, JØRN DALGAARD;
MEYER, ANNE M.B.S. y
LEZYK, MATEUSZ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 242 T3

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

DESCRIPCIÓN

Una lacasa novedosa de *Ganoderma lucidum* capaz de potenciar la degradación enzimática de biomasa lignocelulolítica

Antecedentes de la invención

5 Los materiales lignocelulósicos, tales como residuos agroindustriales (bagazo de caña de azúcar) o forestales son una fuente importante de biomasa renovable para la industria de biocombustibles. La lignocelulosa comprende celulosa, hemicelulosa y lignina, donde la lignina funciona como agente cementante entre las fibras de celulosa y hemicelulosa, protegiéndolas del ataque microbiano y enzimático. La lignina es un biopolímero aromático complejo
10 consistente en unidades fenólicas principalmente de p-hidroxifenilo, guayacilo y fenilpropano de tipo siringilo, que están ligadas conjuntamente por enlaces éter y carbono-carbono. Las fuentes de biomasa de lignocelulosa incluyen bagazo de caña de azúcar (BCA), paja de cebada y paja de trigo.

El BCA es un residuo fibroso de los tallos de caña que sobra después de la trituración y extracción del zumo rico en azúcar del azúcar de caña (*Saccharum officinarum*). El BCA consiste principalmente en 51 % (p/p) de celulosa, 23 % (p/p) de hemicelulosa y 22 % (p/p) de lignina insoluble, y puede usarse como fuente de producción del etanol
15 celulósico.

La utilización de lignocelulosa, tal como BCA, paja de cebada y trigo para la producción de biocombustible está obstaculizada por las dificultades enfrentadas al degradar estos sustratos recalcitrantes, en que se sugiere que la presencia de lignina en los materiales lignocelulósicos retarda las celulasas durante su hidrólisis enzimática de
20 celulosa. El pretratamiento de la biomasa de lignocelulosa se usa para solubilizar parcialmente la biomasa y potenciar así la accesibilidad de la celulosa ante el ataque enzimático. La explosión por vapor (STEX) usa una combinación de vapor a alta presión seguido de una descompresión explosiva para hidrolizar parcialmente hemicelulosas, lo que sirve también para solubilizar temporalmente y relocalizar la lignina, aumentando así la accesibilidad de la celulosa restante. La adición de un catalizador ácido antes del tratamiento con vapor se usa
25 comúnmente para aumentar la hidrólisis de hemicelulosas. Sin embargo, es conocido que la lignina residual en la biomasa tratada se une no específicamente a enzimas hidrolíticas, reduciendo así la eficacia de la hidrólisis de celulosa. El tratamiento con vapor de biomasa, particularmente biomasa tratada con ácido, libera también compuestos inhibidores, incluyendo compuestos fenólicos que pueden tanto inhibir la hidrólisis enzimática de celulosa hasta glucosa como su posterior fermentación para producir alcohol.

El tratamiento con lacasa de la biomasa tratada con vapor se ha investigado por su capacidad de mejorar el procesamiento aguas abajo de biomasa para producir azúcares fermentables y alcohol. La lacasa
30 (bencenodiol:dioxígeno oxidorreductasa; EC 1.10.3.2) es una enzima que contiene cobre azul que cataliza la retirada de un electrón y un protón de grupos hidroxilo fenólicos o amino aromáticos, formando radicales fenoxi y radicales amino libres, respectivamente. Durante esta reacción, se reduce una molécula de oxígeno atmosférico a dos moléculas de agua. La lacasa, actuando a través de un mediador, es también capaz de oxidar unidades de lignina
35 no fenólicas (esterificadas en C₄) hasta radicales.

Se reseña que el tratamiento de madera blanda pretratada con vapor con una lacasa de *Trametes hirsuta* mejora su hidrólisis enzimática, sin embargo la eficacia del tratamiento de lacasa dependía parcialmente de la presencia del mediador N-hidroxi-N-fenilacetamida (Palonen y Viikari, 2004). Se reseña que dos enzimas lacasas, aisladas de
40 *Cerrena unicolor* y *Trametes hirsuta*, potencian la hidrólisis de celulosa de madera de picea tratada con vapor, pero inhiben la hidrólisis de celulosa de caña común tratada con vapor (Moilanen *et al.*, 2011). Se reseña que el tratamiento con lacasa de paja de trigo explotada por vapor causa la polimerización de lignina, lo que puede contribuir a la detoxificación de los productos liberados por el tratamiento con vapor (Jurado *et al.*, 2009). Sin embargo, estos investigadores reseñan que el tratamiento con lacasa de *Coriolopsis rigida*, cuando se efectuaba antes de la hidrólisis enzimática de celulosa, reducía realmente la recuperación de glucosa, lo que se atribuía a la liberación de compuestos fenólicos por lacasas, que inhiben las celulasas. Los investigadores comentan que se
45 reseñan resultados contradictorios con respecto al tratamiento con lacasa, y concluyen que los métodos de detoxificación deben estudiarse independientemente para cada material pretratado.

Existe un gran interés industrial por identificar nuevas fuentes de enzimas que puedan degradar eficientemente la lignina y potenciar la liberación de glucosa durante la degradación de lignocelulosa (hidrólisis). Una búsqueda en
50 lacasas relacionadas filogenéticamente revela que se produce un gran número de lacasas diferentes por hongos de podredumbre blanca (*Basidiomycota*). *Ganoderma lucidum* (*lingzhi*) es uno de los muchos miembros de los hongos de podredumbre blanca. Es bien conocido como hongo medicinal en la medicina tradicional china y se usa comúnmente con fines farmacéuticos y en alimentos saludables.

Se ha clonado un gel de lacasa GLlac1, que codifica la lacasa GLlac1, a partir de *Ganoderma lucidum* (cepa 7071-9 monocariótica) y se ha expresado en *Pichia pastoris*. Se reseña que la lacasa expresada confiere protección
55 antioxidativa ante la degradación de proteína, con aplicaciones biomédicas potenciales (Joo *et al.*, 2008). La lacasa GLlac1, cuando se expresa a partir de un gen sintético *GLCC1* en *Pichia pastoris*, tiene una K_m de 0,995 mM, un pH óptimo de 2,6 y se reseña que es útil para la retirada de color de efluentes de tintes textiles reactivos (Sun *et al.*,

2012). Se ha aislado una lacasa de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* que tiene una masa molecular de 75 kDa y la secuencia N-terminal GQNGDAVP, y se reseña que es capaz de inhibir la RT de VIH-1 (Wang y Ng, 2006). Se divulga una lacasa, aislada a partir de *Ganoderma lucidum* y que se reseña que es útil en la preparación de papel, en el documento CN1657611A.

- 5 El uso eficaz de biomasa de lignocelulosa, en particular bagazo de caña de azúcar, como fuente renovable de bioetanol depende de la provisión de enzimas modificadoras y degradadoras de lignocelulosa individuales que, en combinación con etapas de pretratamiento óptimas, puedan maximizar los rendimientos de azúcar fermentable. Chandler *et al.* 2007 reseñan que la detoxificación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar usando una lacasa aislada a partir de NCIM 3501 de *Cyathus stercoreus* puede mejorar la fermentación de etanol por *Candida shehatae*. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de proporcionar enzimas que puedan potenciar el rendimiento de los rendimientos de azúcar fermentable a partir de biomasa, en particular bagazo de caña de azúcar explotado por vapor, de tal modo que el uso de esta biomasa pueda volverse económicamente viable.

Compendio de la invención

15 La invención proporciona un método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa de lignocelulosa que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una dispersión acuosa de biomasa;
- b. añadir una preparación de lacasa fúngica a la biomasa (a);
- c. añadir una preparación de una o más enzimas hidrolizantes de celulosa a la biomasa (b),

en el que la adición en la etapa b) es simultánea a la adición en la etapa c) o es anterior a la adición en la etapa c);

- 20 d. incubar la biomasa de la etapa b) y la etapa c) simultáneamente o en secuencia,

en el que el método incluye opcionalmente la etapa de:

- e. separar la biomasa soluble del producto de la etapa d) para obtener un hidrolizado acuoso soluble; y

en el que la lacasa fúngica es un polipéptido que tiene al menos un 85 % (o al menos un 90 %) de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5.

25 En una realización del método anterior, la biomasa puede pretratarse con uno o más de calor, presión y vapor para degradar parcialmente y solubilizar la lignocelulosa.

Por ejemplo, la biomasa puede ser bagazo de caña de azúcar, preferiblemente bagazo de caña de azúcar pretratado con explosión por vapor.

30 En una realización del método anterior, se efectúa la etapa (d) a un pH entre 4,2 y 5,2. Adicionalmente, la etapa (d) puede efectuarse por ejemplo a una temperatura de entre 40 y 50 °C. Adicionalmente, la incubación de la etapa (d) puede tener una duración de 16 horas o más, por ejemplo 24 o 30 horas.

35 La invención proporciona una composición enzimática adecuada para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa de lignocelulosa en el método de la invención que comprende una lacasa fúngica, en la que la lacasa fúngica es un polipéptido que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5; y una o más enzimas degradantes de celulosa seleccionadas de una o más de endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).

40 En una realización, la lacasa fúngica en la composición enzimática es un polipéptido recombinante obtenido por expresión recombinante en una célula hospedadora seleccionada de una cualquiera de *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubigenis*, *Aspergillus awemori*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Hansenula polymorpha*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Escherichia coli*; en que el polipéptido puede incluir un péptido carboxiterminal heterólogo que tiene afinidad de unión a sustrato selectiva para purificación del polipéptido.

En una realización, la composición enzimática puede formularse en forma de un polvo seco o un comprimido seco o como alternativa en forma de un líquido.

45 La invención proporciona adicionalmente el uso de una composición enzimática según las realizaciones anteriores para potenciar la hidrólisis mediada por celulasa de la biomasa de lignocelulosa.

Definiciones

Vector: Es una molécula de ADN usada como vehículo para transferir material genético a una célula hospedadora. Los vectores pueden ser plásmidos, que tienen un origen de replicación de al menos una célula hospedadora, un sitio de clonación para insertar material genético y, opcionalmente, un gen que codifica un marcador selectivo.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Comparación de la actividad lacasa expresada por 4 hongos de podredumbre blanca (*Ganoderma lucidum*, *Polyporus brumetis*, *Polyporus ciliatus* y *Trametes versicolor*) crecidos en medio de extracto de malta (MEA) o mínimo (MM) suplementado con BCA, BCA+AV o LA. La actividad lacasa no pudo determinarse para *T. versicolor* crecido en MEA. La actividad lacasa se definía como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de siringaldazina por minuto a 30 °C y pH 6,5. Se monitorizó la oxidación de siringaldazina espectrofotométricamente a 530 nm ($\epsilon_{530} = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Lin, Lloyd, 2006)) durante 10 min. La mezcla de ensayo contenía: tampón fosfato 100 mM (2,2 ml, pH 6,5), siringaldazina (0,3 ml, 0,216 mM) y un extracto bruto fúngico prediluido (0,5 ml) que aseguraba el intervalo lineal de la cinética de Michaelis-Menten. Se filtraron los extractos brutos fúngicos prediluidos a través de un filtro de 0,45 μm (MiniSart-plus, estéril, Sartorius, Alemania) antes de las medidas de actividad.

Figura 2. Electroforesis PAGE-SDS de extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum*. Se evaluaron las proteínas expresadas en el extracto bruto fúngico por electroforesis en poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS), usando un sistema de gel Criterion XT (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Se diluyeron las muestras de proteína (65 μl) en tampón de muestra XT (25 μl , n° de cat. 161-0791) y ditiotreitól 500 mM (10 μl , Sigma Aldrich, Alemania). Se hirvieron las muestras a 95 °C durante 5 min antes de cargarse en un gel de separación al 10 % (n° de cat. 345-0118). Se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 125 V durante 2 h usando XT MPOS diluido 5 veces como tampón de migración (n° de cat. 161-0788). Se visualizaron las proteínas separadas por tinción con azul de Coomassie G-250 (n° de cat. 161-0786). Se hizo la estimación de los pesos molecular (PM) de las proteínas frente a patrones moleculares (teñidos) (de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa) (n° de cat. 161-0374). Todos los productos químicos usados durante la PAGE-SDS se adquirieron en Bio-Rad, CA, EE.UU.

Los pocillos en el gel representan: marcador de proteína (M), proteína lacasa de *Trametes versicolor*, n° de cat. 51639, Sigma Aldrich, Alemania (4) y extracto bruto de proteína de *Ganoderma lucidum* crecida en medio MEA suplementado con BCA (1), BCA+AV (2) o LA (3).

Figura 3. Electroforesis PAGE nativa de extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum*. Se mezclaron muestras de sobrenadante liofilizadas a una relación 1:1 con tampón de muestra XT que no contenía agentes reductores, y se cargaron en un gel Zymogram (n° de cat. 345-0080) sin desnaturalización térmica. El tampón de migración y los patrones de proteína eran los mismos que para PAGE-SDS (Figura 2). Se visualizaron las proteínas separadas por incubación del gel en un tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 5) que contenía: dimetilsulfóxido (al 1 %) y solución de DAN (1,8-diaminonaftaleno) (2 mM) como sustrato.

Los pocillos en el gel representan marcador de proteína (M), proteína lacasa de *Trametes versicolor*, n° de cat. 51639, Sigma Aldrich, Alemania (4) y *Ganoderma lucidum* crecida en medio MEA suplementado con BCA (1), BCA+AV (2) o LA (3).

Figure 4. Efecto de la lacasa de *Ganoderma lucidum* sobre la hidrólisis de bagazo de azúcar de caña explotado por vapor (BCA-STEX) y la liberación de glucosa por Cellic®CTec1 en comparación con una lacasa de *Trametes versicolor*.

A: Una comparación gráfica de la liberación de glucosa (g/l) con el tiempo durante la hidrólisis de BCA-STEX a pH 5,1 y 50 °C por la preparación enzimática Cellic®CTec1 (CC1) sola y en combinación con extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum* crecida en MEA (BCA). Se evaluó el efecto de la liberación de glucosa durante la hidrólisis catalizada por lacasa-celulasa de materia seca al 5 % (p/v) de BCA pretratado en tampón citrato-fosfato 0,1 M a pH 5,1 y 50 °C (óptimo para la preparación de celulasa).

B: Una comparación gráfica de rendimientos de equivalentes de glucosa (mM) (basada en la medida de extremos reductores) liberados con el tiempo durante la hidrólisis de BCA-STEX al 0,8 % (p/p (DM)) a pH 4,8 y 50 °C por la preparación enzimática CC1 sola (Cellic™CTec10); en combinación con lacasa obtenida comercialmente a partir de *Trametes versicolor* (Cellic™CTec1_Tv) y en combinación con un extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum* (crecida en BCA MEA) (Cellic™CTec1_GI).

Se obtuvieron los datos mostrados en la Figura A y B usando la preparación de cóctel de celulasa disponible comercialmente Cellic®CTec1 (relación de enzima a sustrato (E/S) de 0,064 % p/p; Novozymes, Dinamarca) en combinación con un caldo rico en lacasa de lacasa de *Ganoderma lucidum* o *Trametes versicolor* (E/S del 0,4 %, p/p). Se muestrearon las reacciones de hidrólisis después de 0, 1, 3, 5, 16 y 24 horas y se detuvo la reacción por incubación a 99 °C durante 15 min. Se centrifugaron entonces las muestras a 10.000 rpm durante 2 min, se filtraron los sobrenadantes a través de un filtro de 0,2 μm y se cuantificaron los rendimientos de la glucosa liberada usando el kit D-glucose-HK (Megazyme, Dinamarca) a 340 nm en un lector de placas de microvaloración Infinite 200 (Tecan, Salzburgo, Austria). Se corrigieron los rendimientos de glucosa liberada con el tiempo para la glucosa presente en la muestra de hidrólisis a tiempo 0. La dosificación de E/S se basaba en la concentración de proteína total usada. Cellic®CTec1 comprende el complejo de celulasa de *Trichoderma reesei* (actividades exoglucanasa, endoglucanasa y β -glucosidasa) con proteínas estimulantes de la hidrólisis de la familia 61 β -glucosidasa y glicósido hidrolasa (Harris, 2010). Se efectuaron todas las determinaciones de las muestras de hidrólisis enzimática por duplicado, las desviaciones estándares combinadas oscilaban de 0,04-0,26. Se efectuó la cuantificación de proteína usando el

procedimiento en microplaca del kit de ensayo de proteína por BCA (ácido bicinónico) de Pierce según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EE.UU.) como se describe anteriormente (Silva, *et al.* 2011). Se usó BSA como patrón.

5 **Figura 5.** Se alinea la secuencia aminoacídica sin huecos de regiones peptídicas seleccionadas (R1-R4) en el polipéptido de lacasa LacGL1 con las correspondientes regiones peptídicas de otras lacasas fúngicas pertenecientes a la familia de oxidasas multicobre. Se indican los dominios de unión a cobre, con sus aminoácidos conservados que toman parte en la coordinación de cuatro átomos de cobre localizados en las regiones peptídicas seleccionadas. Los aminoácidos en recuadros rojos indican residuos totalmente conservados y los triángulos debajo de los recuadros rojos identifican 11 aminoácidos totalmente conservados que se coordinan con los cuatro átomos de cobre, lo permite distinguir estas lacasas fúngicas dentro de una clase más amplia de oxidasas multicobre. Los triángulos rojos, verdes, rosas y negros indican coordinación con los iones de cobre T1Cu, T2Cu, T3 α Cu y T3 β Cu, respectivamente. Los círculos azules indican los residuos colocados a 4 Å axialmente del ion de cobre T1. Obsérvese que la isoleucina (455I) y fenilalanina (463F) axiales no coordinantes son invariables entre las lacasas fúngicas seleccionadas. Las estructuras secundarias (hélices α y láminas β) por encima del alineamiento están basadas en una estructura cristalográfica de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1GYC) (Piontek *et al.*, 2002). Las hélices α y láminas β coloreadas de negro y verde indican el dominio 1 (residuos 1-131 y 476-499) y el dominio 3 (residuos 301-475), respectivamente. El dominio 2 (residuos 132-300) no se presenta aquí debido a la falta de residuos que sirvan para funcionar en catálisis. Se realizó el alineamiento de secuencias usando el software ClustalW 2.0 (Goujon *et al.*, 2010) y ESPript para el resultado final (Gouet *et al.*, 1999). Se escindieron los péptidos señal antes del alineamiento usando el software SignalP.

Figura 6. Mapa del plásmido recombinante pML α _LacGL1 usado para expresión de la lacasa LacGL1 en X-33 de *Pichia pastoris*. El vector pML α _LacGL1 contiene una secuencia que codifica el péptido señal del prepropéptido de factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* fusionado en fase con LacGL1, con un marcador HIS y un epítipo c-myc fusionado en el extremo C.

25 **Figura 7.** Actividad de tinción de lacasa LacGL1 nativa y expresada recombinantemente en PAGE nativa, con y sin tratamiento con EndoH. (M) patrones de peso molecular, (1) lacasa de extracto bruto de CBS229.93 de *G. lucidum*, (2) lacasa LacGL1 expresada en *Pichia pastoris*, (3) lacasa LacGL1 expresada en *P. pastoris* después de tratamiento con EndoH. Se sumergió el gel de PAGE nativa en 49 ml de citrato-fosfato 0,1 M y 1 ml de ABTS (4 mM) para visualizar la actividad de tinción de lacasa. Se efectuó el tratamiento con EndoH (endoglicosidasa) de la lacasa LacGL1 durante 24 h, según el procedimiento de New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.).

30 **Figura 8.** Gráfica de respuesta de superficie de la actividad relativa (U/ml) de la lacasa LacGL1 expresada en *Pichia pastoris* en función de pH y temperatura. Se modelizó el efecto de pH y temperaturas sobre la actividad lacasa de LacGL1, expresada a partir de *P. pastoris*, mediante un experimento diseñado estadísticamente factorial completo y aleatorizado- programa MODDE versión 7.0.0.1 (Umetrics, Umeå, Suecia). El diseño estadístico consistía en 12 experimentos, incluyendo una repetición por triplicado en el punto central (pH 5 y 40 °C) usando ABTS como sustrato. Se monitorizó la influencia de temperatura y pH entre 25-55 °C y pH 4-6 (para tampón citrato-fosfato 0,1 M), respectivamente. Se incubó la mezcla con ABTS y tampón al valor de pH definido durante 5 min en un termociclador fijado a una temperatura deseada, y después de ello se añadió a una enzima anteriormente prediluida en una placa de microvaloración, que se incubó durante 1 min en un lector de placas de microvaloración fijado a la temperatura deseada. Después de mezclar sustrato y tampón con la enzima, se midió la tasa inicial de formación de producto como se describe anteriormente. Los volúmenes y concentraciones de enzima, sustrato y tampón eran idénticos que para el ensayo de actividad lacasa.

35 **Figura 9.** Perfil de estabilidad a la temperatura de la lacasa LacGL1 en función de LN [U/ml] frente al tiempo de incubación a pH 4,7 y tampón citrato-fosfato 0,1 M. Se observó el impacto máximo sobre la tasa de formación de producto en condiciones de pH y tiempo de incubación óptimos a un perfil de temperatura específico para temp. de 60 y 70 °C, respectivamente. La diferencia relativa entre las medidas individuales era de < 5 %.

40 **Figura 10.** Gráfico de la evolución de la estabilidad de la lacasa LacGL1 al pH óptimo de 4,7 y a dos valores de temperatura diferentes (40 °C y 50 °C). Puesto que el gráfico es una continuación del gráfico de estabilidad a la temperatura (Figura 9), se da la primera medida después de 1 h. Se calcula la actividad lacasa residual [%] basándose en el valor de actividad lacasa medida a pH 4,7 y 25 °C. La diferencia relativa entre las medidas individuales era de < 5 %.

45 **Figura 11.** Comparación gráfica de los rendimientos de glucosa liberada con el tiempo en la hidrólisis de BCA-STEX catalizada por LacGL1-CelliC@CTec1 a diferentes pH y temperaturas. La preparación de celulasa es CelliC@CTec1 (CC1) y la lacasa era LacGL1 de *Ganoderma lucidum* expresada en X-33 de *Pichia pastoris*. Se añadieron CC1 y LacGL1 a una relación de E/S de 0,064 % y 0,4 % (p/p), respectivamente.

50 **Figura 12.** Comparación gráfica de los rendimientos de glucosa liberada con el tiempo en la hidrólisis de BCA-STEX catalizada por LacGL1-CelliC@CTec2 a diferentes pH y temperaturas. La preparación de celulasa es CelliC@CTec2 (CC2) y la lacasa era LacGL1 de *Ganoderma lucidum* expresada en X-33 de *Pichia pastoris*. Se añadieron CC1 y LacGL1 a una relación de E/S de 0,064 % y 0,4 % (p/p), respectivamente.

Figura 13. Comparación gráfica de la glucosa liberada con el tiempo durante la hidrólisis de BCA-STEX a pH 5,1 y 50 °C para cada una de las preparaciones enzimáticas comerciales Celulasa 1 (CC2) [A] o Celulasa 2 [B], solas o en combinación con una enzima lacasa; siendo las lacasas ensayadas, respectivamente, LacGL1 y GLlac1 (LacJooSS; Q9HG17) derivadas de *G. lucidum*; y lacasas derivadas de *Agaricus bisporus* (Sigma 40452), *Pleurotus ostreatus* (Sigma 75117) y *Trametes versicolor* (Sigma 51639).

Figura 14. Comparación gráfica de la glucosa liberada con el tiempo durante la hidrólisis de paja de cebada pretratada a pH 5,1 y 50 °C para cada una de las preparaciones enzimáticas comerciales Celulasa 1 (CC2) [A]; o Celulasa 2 [B], solas o en combinación con una enzima lacasa; siendo las lacasas ensayadas respectivamente LacGL1 y GLlac1 (LacJooSS; Q9HG17) derivadas de *G. lucidum*; y lacasas derivadas de *Agaricus bisporus* (Sigma 40452), *Pleurotus ostreatus* (Sigma 75117) y *Trametes versicolor* (Sigma 51639).

Figura 15. Comparación gráfica de la glucosa liberada con el tiempo durante la hidrólisis de paja de trigo pretratada a pH 5,1 y 50 °C para cada una de las preparaciones enzimáticas comerciales Celulasa 1 (CC2) [A] o Celulasa 2 [B], solas o en combinación con una enzima lacasa; siendo las enzimas ensayadas respectivamente LacGL1 y GLlac1 (LacJooSS; Q9HG17) derivadas de *G. lucidum*; y lacasas derivadas de *Agaricus bisporus* (Sigma 40452), *Pleurotus ostreatus* (Sigma 75117) y *Trametes versicolor* (Sigma 51639).

Descripción detallada

I. Una lacasa fúngica

I.i. Propiedades estructurales de la lacasa fúngica

Se proporciona en la presente memoria una enzima lacasa fúngica (EC 1.10.3.2) que comprende un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica de 499 aminoácidos. El polipéptido de lacasa pertenece a la familia de enzimas oxidasa multicobre, y comprende cuatro dominios de unión a cobre que sirven como coordenadas para cuatro átomos de cobre. La secuencia aminoacídica de cuatro regiones (R1-R4) comprende dominios de unión a cobre que están altamente conservados en esta familia de enzimas. La lacasa fúngica comparte un alto grado de identidad de secuencia aminoacídica con otras lacasas fúngicas en estas cuatro regiones altamente conservadas, como se muestra en el alineamiento de sus secuencias sin huecos de la Figura 5. El alineamiento indica la posición de 1 cisteína y 10 histidinas en estas regiones que se coordinan con los iones de cobre T1Cu, T2Cu, T3 α Cu y T3 β Cu, así como las isoleucina (455I) y fenilalanina (463F) axiales no coordinantes conservadas entre las lacasas fúngicas seleccionadas. 8 de las 10 histidinas son parte de un patrón conservado de motivos HXH, separados entre sí por 25 a 175 residuos aminoacídicos, característicos de dominios de unión a cobre (Kumar *et al.*, 2003). Las secuencias aminoacídicas conservadas de estas regiones se reflejan en las correspondientes estructuras secundarias (hélices α y láminas β) en cada una de estas regiones, que se muestran por encima de las secuencias alineadas en la Figura 5, que están basadas en la estructura cristalográfica de lacasa de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1GYC).

Por consiguiente, la lacasa fúngica es un polipéptido que comprende 499 aminoácidos, teniendo dicho polipéptido 4 regiones peptídicas R1-R4 que tienen la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 respectivamente, que se expresa por el hongo *Ganoderma lucidum*. El polipéptido que comprende 499 aminoácidos tiene al menos un 85, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

En un ejemplo adicional, la lacasa fúngica se expresa *in vivo* en una célula hospedadora como un polipéptido que comprende adicionalmente un péptido señal localizado en el extremo N del polipéptido codificado, con lo que la secuencia señal se escinde durante la expresión y secreción del polipéptido de la célula hospedadora. El péptido señal en el extremo N de la lacasa expresada es uno adecuado para el sistema de expresión en la célula hospedadora seleccionada, tal como aquellos enumerados a continuación con respecto a la expresión recombinante de la lacasa fúngica. En un ejemplo, la lacasa fúngica que comprende un péptido señal es un polipéptido que comprende 520 aminoácidos, cuya secuencia aminoacídica comparte al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9. En otro ejemplo, la lacasa fúngica se expresa con un péptido señal N-terminal que comprende el prepropeptido de factor de apareamiento α (MRIRHRSQD; SEQ ID NO: 7) de *Saccharomyces cerevisiae* (Brake, *et al.* 1983) como se describe en el Ejemplo 5.1.

En un ejemplo adicional, se expresa la lacasa fúngica *in vivo* en una célula hospedadora en forma de un polipéptido que comprende adicionalmente una extensión peptídica C-terminal o N-terminal, cuya secuencia aminoacídica tiene una afinidad de unión a sustrato que posibilita su unión al sustrato, facilitando así el aislamiento de un polipéptido que comprende este péptido durante la purificación (véase la expresión recombinante de lacasa a continuación).

En un ejemplo adicional, se caracteriza la lacasa fúngica que comprende 499 aminoácidos cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, por un pl de 5,07, en que el polipéptido codificado tiene una masa molecular predicha de 54,5 kDa. Puesto que la secuencia aminoacídica de la lacasa fúngica comprende varios sitios de glicosilación predichos, la lacasa fúngica, cuando se expresa *in vivo* en una célula hospedadora eucariótica, estará adicionalmente glicosilada. El grado y forma de la glicosilación dependerán de la célula hospedadora eucariótica en que se exprese la lacasa, y puede conducir a un aumento de la masa molecular de la lacasa fúngica, como se describe a continuación con respecto a

la expresión recombinante de la lacasa.

En un ejemplo adicional, la lacasa fúngica que comprende la SEQ ID NO: 9 está codificada por una molécula de ADN que tiene al menos un 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 % o 99 % de identidad de secuencia nucleotídica con el gen de lacasa que tiene la SEQ ID NO: 6 o un ADNc derivado de ARNm de lacasa que tiene la SEQ ID NO: 8, aislado a partir de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*, como se describe a continuación. La lacasa fúngica (LacGL1) de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9 es distinta de todas las demás secuencias aminoacídicas publicadas, pero está estrechamente relacionada con una lacasa (acceso a UniProt: Q9HG17) de la cepa 7071-9 de *Ganoderma lucidum* (Joo, *et al.* 2008) (SEQ ID NO 29; en que la proteína madura corresponde a los residuos aminoacídicos 22-520) y una lacasa (acceso a UniProt: C5HL41), que comparte un 91 % de identidad de secuencia aminoacídica con cada una de estas secuencias reseñadas, mientras que comparte un 88 % de identidad de secuencia aminoacídica con las lacasas de *G. lucidum* de accesos a UniProt: B5G552 y B5G551. La lacasa fúngica (LacGL1) de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* comparte una identidad de secuencia aminoacídica mucho menor con la lacasa aislada de *T. villosa*.

La lacasa LacGL1 (SEQ ID NO: 5) muestra solo un 75 % de identidad de secuencia aminoacídica con la lacasa divulgada en el documento CN1657611 A que se aisló a partir de *Ganoderma lucidum*.

I.ii Propiedades funcionales de la lacasa fúngica

La lacasa fúngica que comprende 499 aminoácidos cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, se caracteriza por un pH óptimo de 4,7 (Ejemplo 8.1) cuando se mide con el sustrato ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) según el método detallado en el Ejemplo 7 o la Tabla 2. La lacasa fúngica exhibe una afinidad de sustrato, con respecto al ABTS, de 0,107 mM cuando se expresa en CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* (Ejemplo 1.5) y de 0,122 mM cuando se expresa recombinantemente en *Pichia pastoris* (Ejemplo 8.2).

La temperatura óptima predicha de la lacasa fúngica a pH 4,7 es de 55 °C, mientras que retiene altas actividades en el intervalo de temperatura de 25-55 °C (Ejemplo 8.1). Sin embargo, su estabilidad térmica cae con el tiempo a temperaturas mayores de 50 °C.

La lacasa fúngica puede oxidar sustratos fenólicos (p.ej., hidroxiquinona y monofenoles sustituidos con metoxi (p.ej., guayacol y 2,6-dimetoxifenol) como se muestra en la Tabla 5 del Ejemplo 8.2. La actividad enzimática de la lacasa fúngica se inhibe por azida de sodio (90-100 % de inhibición a 0,01 M); fluoruro de sodio (46-56 % de inhibición a 0,1 mM); EDTA (16-30 % de inhibición a 50 mM) y DTT (100 % de inhibición a 0,5 mM), como se muestra en la Tabla 6 del Ejemplo 8.3.

Las propiedades enzimáticas reseñadas en la bibliografía para la lacasa de *Ganoderma lucidum* más estrechamente relacionada, GILCC1 (Q9HG17), cuando se expresa en *P. pastoris*, eran muy diferentes de las de LacGL1; con un pH óptimo de 2,6 y una Km de 0,996 mM para ABTS (Sun *et al.*, 2012). Sin embargo, como se muestra en la presente memoria, las dos lacasas de *Ganoderma lucidum* LacGL1 y GLIac1 (Q9HG17) comparten una identidad de secuencia aminoacídica del 91 % y una capacidad inesperadamente similar de potenciar la hidrólisis de lignocelulosa (véase el Ejemplo 12). Las lacasas LacGL1 y GLIac1 son claramente divergentes de la lacasa de *Ganoderma lucidum* descrita por Wang y Ng, 2006, que tenía una mayor masa molecular (75 kDa) un pH óptimo más amplio (3-5), una mayor temperatura óptima (70 °C) y una secuencia aminoacídica N-terminal diferente (GQNGDAVP).

II Gen *LacGL1* y ADNc de lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*

Se describen en la presente memoria un gen *LacGL1* y ADNc de *LacGL1* clonados a partir de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* que codifican la lacasa fúngica LacGL1.

Se clonó el gen *LacGL1* a partir de ADN genómico aislado de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* empleando amplificación por PCR. Se auxilió la amplificación específica mediante el uso de cebadores de PCR cuya secuencia codificaba secuencias aminoacídicas de péptidos lacasa LacGL1 aisladas que se encontró que se conservaban en la familia de enzimas lacasas, como se describe en el Ejemplo 2 y 4. Se clonó ADNc de *LacGL1* por PCR a partir de ADNc sintetizado a partir de ARNm aislado de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* como se describe en el Ejemplo 4 (véase 4.4).

La secuencia nucleotídica del gen *LacGL1* clonado es de 2093 nucleótidos de longitud, teniendo la SEQ ID NO: 6. La secuencia clonada engloba toda la secuencia de codificación del gen *LacGL1*, que se extiende desde el codón ATG de inicio al codón TGA de terminación. El ADNc de *LacGL1* correspondiente es de 1563 nucleótidos de longitud, teniendo la SEQ ID NO: 8. El gen *LacGL1* comprende 9 intrones, basándose en el alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *LacGL1* y el ADNc de *LacGL1* clonados.

El ADNc de *LacGL1* de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* tiene una secuencia nucleotídica que es distinta de todas las demás secuencias nucleotídicas publicadas, pero comparte un 87 % de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia reseñada de una lacasa de la estirpe 7071-9 de *Ganoderma lucidum* (Joo, *et al.* 2008)

y un 77 % con el gen *Lac1* de *Polyporus brumalis* (Ryu, *et al.* 2008).

III Expresión recombinante de una lacasa fúngica

Se describen en la presente memoria genes recombinantes, vectores de expresión y células hospedadoras recombinantes que facilitan la expresión de una lacasa fúngica como se define anteriormente en la sección I, en los
5 que la lacasa es un polipéptido que comprende al menos 499 aminoácidos cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

III.i. Molécula de ADN que codifica una lacasa fúngica recombinante

Puede sintetizarse *in vitro* una molécula de ADN que codifica una lacasa fúngica cuya secuencia nucleotídica se
10 diseña para proporcionar un uso de codón que sea óptimo para expresión en una célula hospedadora dada, siendo descritos tales métodos en libros de texto estándares en la técnica. En un ejemplo, la molécula de ADN codifica un polipéptido de lacasa fúngica que tiene adicionalmente un péptido señal en el extremo N para facilitar la secreción de la lacasa por una célula hospedadora, y en que el péptido señal tiene un sitio de escisión que define la posición de la retirada del péptido señal durante la expresión. Cuando se expresa la molécula de ADN que codifica el
15 polipéptido de lacasa fúngica en una célula hospedadora que es una célula de levadura, un péptido señal adecuado para facilitar la secreción incluye el prepropéptido de factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* (Brake, *et al.* 1983) como se describe en el Ejemplo 5.1. Son conocidos en la técnica péptidos señal alternativos adecuados para expresión y secreción en hospedadores eucarióticos.

En un ejemplo adicional, la molécula de ADN codifica un polipéptido de lacasa fúngica que tiene adicionalmente un
20 péptido C-terminal o N-terminal (marcador peptídico) cuya secuencia aminoacídica tiene afinidad de unión a sustrato, facilitando la purificación del polipéptido. En una realización, la molécula de ADN codifica un polipéptido de lacasa fúngica que tiene adicionalmente un péptido C-terminal que comprende un epítipo c-myc, como se ejemplifica en el Ejemplo 5.

III.ii Vector de ADN para clonación y/o expresión de una lacasa fúngica recombinante

Se describe en la presente memoria un vector de ADN (plásmido) que comprende una secuencia de ácido nucleico
25 que codifica el polipéptido de lacasa fúngica. El vector de ADN es un vector capaz de autorreplicación en la célula hospedadora o es un vector de integración capaz de integración en el genoma de la célula hospedadora. La molécula de ADN (y vector) puede comprender un promotor de ADN capaz de dirigir la expresión *in vivo* de la lacasa fúngica codificada. La secuencia de ácido nucleico que codifica la lacasa fúngica puede clonarse aguas abajo del promotor de ADN localizado en la molécula de ADN (o vector) y transformarse posteriormente en una célula
30 hospedadora, donde es capaz de autorreplicación o bien toda o parte de la molécula de ADN se integra en el genoma hospedador. Si la molécula de ADN se integra en el genoma hospedador, puede insertarse aguas abajo de un promotor presente en el genoma hospedador, siendo capaz en ambos casos el promotor de dirigir la expresión de la molécula de ADN en la célula hospedadora respectiva *in vivo*. Son conocidas en la materia secuencias promotoras de ADN adecuadas para dirigir la expresión de la molécula de ADN que codifica una lacasa fúngica que
35 incluye sistemas promotores inducibles, como se ejemplifica además en el Ejemplo 5.

III.iii Célula hospedadora que expresa una lacasa fúngica recombinante

La célula hospedadora recombinante que comprende una molécula de ADN recombinante (transgén) que codifica la
40 lacasa fúngica descrita anteriormente es una célula procariótica o eucariótica, capaz tanto de expresar como de secretar la lacasa fúngica. La célula hospedadora puede comprender un vector (plásmido) que comprende la molécula de ADN y capaz de autorreplicación en el hospedador o, como alternativa, la célula hospedadora puede comprender la molécula de ADN en forma de un transgén integrado establemente en el genoma hospedador. Los ejemplos de célula procariótica hospedadora adecuada para expresión recombinante incluyen *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Los ejemplos de célula eucariótica hospedadora adecuada para expresión de la molécula de ADN
45 recombinante (transgén) y secreción de la lacasa fúngica incluyen *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubigensis*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Hansenula polymorpha*.

La expresión de la lacasa fúngica en una célula de levadura se ejemplifica en el Ejemplo 5, en que la lacasa fúngica
50 se expresa en forma de un polipéptido que comprende un péptido señal N-terminal que comprende el prepropéptido de factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* (Brake, *et al.* 1983) y uno C-terminal que comprende 6 residuos de histidina consecutivos y que tiene un epítipo c-myc como se describe en el Ejemplo 5.1. El péptido señal se escinde cotraduccionalmente del polipéptido y se secreta el polipéptido maduro que tiene la SEQ ID NO: 10 en el medio extracelular de la célula de levadura.

III.iv Producción, concentración y/o purificación de una lacasa fúngica expresada recombinantemente

Puede cultivarse o incubarse una célula hospedadora que comprende una molécula de ADN recombinante
55 (transgén) que codifica la lacasa fúngica en un medio que permita la expresión de la molécula de ADN (transgén) que codifica la lacasa fúngica. Los medios adecuados para el cultivo y/o la incubación de una célula hospedadora serán

dependientes del hospedador y conocidos en la técnica. Cuando se expresa recombinantemente y se secreta la lacasa fúngica por una célula hospedadora, se liberará la lacasa fúngica en el medio extracelular. Puede usarse el uso de un promotor inducible, como se describe anteriormente (III.ii), para inducir selectivamente la expresión del gen recombinante que codifica la lacasa fúngica, de tal modo que la lacasa fúngica secretada dé cuenta de la mayoría de la proteína en la fracción extracelular. La concentración y/o purificación adicional de la lacasa fúngica dependerá del grado de pureza requerido para la lacasa fúngica.

En un ejemplo, la lacasa fúngica incluye un marcador peptídico (como se describe en III.i) cuyas propiedades de unión a sustrato faciliten la unión selectiva de la lacasa fúngica secretada a un sustrato sólido. Por ejemplo, una lacasa fúngica que tenga un péptido c-Myc se unirá a una columna de anticuerpo anti-C-myc en virtud del epítipo (AEEQKLISEEDL), y posteriormente la lacasa fúngica puede liberarse específicamente de la columna.

IV Formulación de lacasa fúngica expresada recombinantemente

La lacasa fúngica expresada recombinantemente que tiene al menos un 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, que puede haberse procesado opcionalmente por concentración y/o purificación, puede secarse opcionalmente (por ejemplo, por liofilización) para formulación y/o empaquetado posterior en forma secada (granulada o secada por pulverización). Una realización de la invención proporciona una composición enzimática formulada en polvo seco, comprimido seco o preferiblemente en forma líquida, que comprende la lacasa fúngica que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5, combinada adicionalmente con una o más enzimas degradantes de celulosa seleccionadas de entre endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) (p.ej. Cellic® CTec1 y Cellic®CTec2 suministradas por Novozymes A/S y Laminex C2K, Multifect B, GC 220 y GC 880 suministradas por Dupont/Danisco/Genencor International B.V.).

V. Uso de lacasa fúngica en la hidrólisis de biomasa

Sorprendentemente, la lacasa fúngica, por ejemplo cuando se expresa en su hospedador nativo CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*, es capaz de soportar el crecimiento celular en medios de crecimiento en que la lignina (en forma de lignina alcalina) es la fuente primaria de carbono, así como en medios de crecimiento en que la fuente primaria de carbono es bagazo de caña de azúcar (BCA). La CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* superó a una serie de otros hongos de podredumbre blanca ensayados en su capacidad de crecer tanto en los sustratos de lignina como de lignocelulosa, BCA, como se muestra en el Ejemplo 1. El crecimiento sorprendentemente fuerte de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* sobre estos sustratos basados en lignina es debido a un alto nivel de secreción de lacasa, que cataliza la despolimerización de los sustratos lignina y lignocelulosa.

Se ha aislado la lacasa fúngica, obtenible en forma de una enzima expresada recombinantemente en una célula hospedadora, o a partir de la expresión por un hospedador nativo, por ejemplo CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*, y se ha mostrado que oxida tanto compuestos fenólicos, compuestos sustituidos con metoxi como ABTS, como se muestra en los Ejemplos 2 y 8. La propiedad más importante e inesperada de la lacasa fúngica es su capacidad de potenciar sinérgicamente la despolimerización (hidrólisis) de sustratos de lignocelulosa por celulasas. Los productos de biomasa BCA-STEX (que es BCA pretratado por un proceso de explosión por vapor), paja de cebada y paja de trigo despolimerizados hasta glucosa aumentan notablemente por una combinación de lacasa fúngica junto con mezclas de enzimas de celulosa, como aquellas disponibles en forma comercial, por ejemplo Cellic®CTec1 y CelliC®CTec2, como se ilustra en los Ejemplos 3, 10 y 12. Esta propiedad inesperada y valiosa no se observaba para ninguna otra lacasa disponible comercialmente ensayada. Este efecto sinérgico permite una disminución de la dosificación enzimática total de celulasa (p.ej., Cellic®CTec2) necesaria para la despolimerización de la biomasa pretratada, lo que tiene el potencial de disminuir los costes operativos globales de la conversión de celulosa en glucosa y un aumento simultáneo de los rendimientos del etanol producido. La actividad de la lacasa fúngica es máxima a pH 4,7 y entre 40-50 °C, que es muy cercano a las condiciones óptimas para Cellic®CTec1 y Cellic®CTec2, lo que es un factor adicional que contribuye a la sinergia entre estas enzimas. El uso de lacasa fúngica cuya actividad óptima se exhibe en condiciones que reflejan estrechamente las necesarias para la degradación de celulosa simplifica y acelera también el procesamiento de biomasa.

El uso de la lacasa fúngica en combinación con enzimas hidrolizantes de celulosa puede estimular la tolerancia de este proceso de despolimerización ante compuestos inhibidores producidos durante diferentes formas de pretratamiento, y reducir así la necesidad de lavar la biomasa libre de inhibidores. La lacasa fúngica puede permitir también un recambio de reacción más rápido en el tanque de hidrólisis, lo que tiene un impacto directo sobre la cantidad de espacio de almacenamiento requerido para el material lignocelulósico y reduce la ventana de tiempo para deterioro durante el almacenamiento.

Por tanto, es una realización adicional de la invención el uso de una composición enzimática que comprenda la lacasa fúngica para potenciar la despolimerización de biomasa de lignocelulosa mediada por celulasa, en que la lacasa fúngica es un polipéptido que al menos comprende 499 aminoácidos cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5. La composición enzimática puede usarse en un proceso de despolimerización de biomasa de lignocelulosa en que la lacasa fúngica se añade en combinación con una o más enzimas hidrolizantes de celulosa seleccionadas de entre endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4),

exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21). La hidrólisis de celulosa implica la acción sinérgica de tres tipos de celulasas, incluyendo endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) que, paso a paso, mellan los enlaces β -1,4-glucosídicos intermoleculares, escinden los extremos de

5 Los ejemplos de composiciones enzimáticas que comprenden enzimas hidrolizantes de celulosa incluyen Cellic®CTec1 y Cellic®CTec2 suministradas por Novozymes A/S y Laminex C2K, Multifect B, GC 220 y GC 880 suministradas por Dupont/Danisco/Genencor International B.V.). La lacasa fúngica puede usarse en un proceso en dos etapas, en que se incubaba la biomasa de lignocelulosa con la lacasa fúngica en una primer etapa y entonces se añaden posteriormente una o más enzimas hidrolizantes de celulosa antes de una segunda etapa de incubación. El

10 proceso en dos permite llevar a cabo las dos etapas en condiciones optimizadas además para las preparaciones enzimáticas respectivas. La biomasa para hidrolizar está compuesta por lignocelulosa, y es preferiblemente BCA, paja de cebada o paja de trigo. Más preferiblemente, se pretrata la biomasa con calor y/o vapor, como se describe en los Ejemplos 9 y 12.

VI Método para la despolimerización de biomasa usando una lacasa fúngica

15 En una realización adicional, la invención proporciona un método para la hidrólisis de biomasa de lignocelulosa (despolimerización). Una biomasa adecuada incluye BCA, paja de cebada y paja de trigo, más preferiblemente biomasa de lignocelulosa pretratada. El método emplea la lacasa fúngica que se muestra que potencia la hidrólisis mediada por celulasa de biomasa de lignocelulosa en un grado significativamente mayor en comparación con varias otras lacasas comercialmente disponibles.

20 El método incluye las etapas de:

- a. proporcionar una dispersión acuosa de biomasa de lignocelulosa;
- b. añadir una preparación de lacasa fúngica a la biomasa (a), en el que la lacasa fúngica es como se define en la sección I (opcionalmente una lacasa fúngica expresada recombinantemente como se define en la sección III);
- c. añadir una preparación de una o más enzimas degradantes de celulosa a la biomasa en (b), en el que la adición en la etapa b) es simultánea a la adición en la etapa c) o es anterior a la adición en la etapa c);
- 25 d. incubar la biomasa de la etapa b) y la etapa c) simultáneamente o en secuencia, y opcionalmente
- e. separar la biomasa soluble de la insoluble para obtener un hidrolizado acuoso soluble.

Ha de entenderse que el término “en secuencia” con respecto a la “incubación” en la etapa (d) comprende un primer periodo de incubación del producto de la etapa (b) seguido de un segundo periodo de incubación del producto de la

30 etapa (c). Las enzimas degradantes de celulosa adecuadas en este método incluyen CelliC® CTec1 y CelliC® CTec2 suministradas por Novozymes A/S y Laminex C2K, Multifect B, GC 220 y GC 880 suministradas por Dupont/Danisco/Genencor International B.V.

VI Método para detectar y medir la actividad lacasa de una lacasa fúngica

35 Se detallan en el ejemplo 7 métodos para la medida precisa de la actividad lacasa de una lacasa fúngica para determinar su especificidad de sustrato y las condiciones óptimas para su actividad enzimática (EC 1.10.3.2).

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1: CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* expresa alta actividad lacasa

40 Se cribaron en 44 aislamientos fúngicos de podredumbre blanca pertenecientes a *Ascomycota* (estirpes de *Alternaria*, *Fusarium*, *Memnoniella*, *Stemphylium* y *Ulocladium*) y *Basidiomycota* su capacidad de crecer en bagazo de caña de azúcar, en que solo cuatro aislamientos de *Basidiomycete* (*Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Polyporus brumalis* y *Polyporus ciliatus*) eran capaces de crecer sobre este sustrato recalcitrante, elegido como fuente importante de sustrato ligninolítico. Se prestó una atención especial a *Ganoderma lucidum*, que era el único aislamiento fúngico que podía crecer adicionalmente sobre lignina (lignina alcalina) suplementada al medio de cultivo.

45 Se compararon entonces cuatro hongos de podredumbre blanca diferentes (*Ganoderma lucidum*, *Polyporus brumalis*, *Polyporus ciliatus* y *Trametes versicolor*) como fuente de actividad lacasa. Se hicieron crecer los hongos sobre medio rico en nitrógeno (MEA) o limitado en nitrógeno (MM) suplementados con diversas fuentes de carbono y derivados de lignina, se recogió posteriormente el medio de cultivo y se ensayó la actividad lacasa secretada como se describe a continuación.

50 1.1 Fuente de hongos de podredumbre blanca (*Basidiomycetes*)

Se adquirieron *Ganoderma lucidum* (CBS 229.93), *Trametes versicolor* (CBS 100.29), *Polyporus brumalis* (CBS 470.72) y *Polyporus ciliatus* (CBS 366.74) en el CBS Fungal Biodiversity Center (www.cbs.knaw.nl). Se mantuvo

Ganoderma lucidum en pendientes de agar de extracto de malta (MEA) (2 % de extracto de malta, 0,1 % de peptona, 2 % de glucosa y 1,5 % de agar). Se ajustó el medio a un pH de 6,0 con NaOH 2 M, antes de la esterilización (121 °C, 20 min).

1.2 Medios de crecimiento y cultivo de hongos de podredumbre blanca para ensayar la producción de lacasa

5 El medio de extracto de malta (MEA) contenía: extracto de malta 20 g/l, peptona 1 g/l, glucosa 20 g/l y agar 20 g/l para pendientes de agar. El medio MEA se suplementó con 1 ml de solución madre de oligometales ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,5 g/l).

Se preparó medio mínimo (MM) como se describe anteriormente (Songulashvili, *et al.* 2008) y contenía NH_4NO_3 1 g/l, Na_2HPO_4 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,8 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l.

10 Se suplementaron los medios MEA y MM con una combinación de BCA 5 g/l y Avicel 5 g/l (Sigma Aldrich, Alemania), lignina alcalina 5 g/l (Nacalai Tesque Inc. Kioto, Japón), bagazo de caña de azúcar (BCA) 10 g/l o LA 10 g/l (a los que se hace referencia en el texto como BCA+AV, LA y BCA, respectivamente). Adicionalmente, se suplementó el medio MM con glucosa 2 g/l cuando se añadían LA 10 g/l o BCA 10 g/l.

15 Se ajustó el pH de ambos medios a 5,6 con NaOH 2 M antes del autoclave. Se cultivaron todos los cultivos fúngicos a 25 °C durante un periodo de 16 y 30 días para medios MEA y MM, respectivamente. Se efectuó el crecimiento de los hongos sobre soporte sólido, tal como perlas de arcilla expandida (JohannesFog S/A, Dinamarca), que se añadió y sometió a autoclave junto con el medio.

20 Se congeló extracto bruto fúngico (15 ml), correspondiente a los medios restantes después de la retirada de micelios y perlas de arcilla expandida, mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min y se liofilizó (Lyovac GT 2, Alemania) hasta un sedimento seco. Se concentró el sedimento seco 10 veces por solubilización en 1,5 ml de agua y se usó para ensayar la actividad lacasa (mediante ensayos de placa de ABTS, PAGE-SDS y análisis de PAGE nativa).

1.3 Ensayo de placa de ABTS para la actividad lacasa

25 Se detectó la actividad lacasa usando el sustrato ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS; adquirido en Sigma Aldrich, Alemania) como se describe por Srinivasan *et al.* 1995. Se dispusieron 25 µl de solución de extracto acuoso fúngico bruto concentrada 10x en un pocillo de 4 mm en placa de ABTS-agar. La aparición de un halo verde alrededor del pocillo indica actividad lacasa. Se usaron 25 µl de solución de extracto bruto hervida como control negativo, mientras que se usaron 25 µl de preparación comercial de lacasa (nº de cat. 51639), lignina peroxidasa (nº de cat. 42603) y manganeso peroxidasa (nº de cat. 93014) como controles de la actividad enzimática.

30 Se adquirieron todas las enzimas en Sigma-Aldrich, Alemania, y se diluyeron a la misma concentración de U/ml, antes del ensayo de placa de ABTS.

35 Las lacasas catalizan la oxidación de ABTS en ausencia de H_2O_2 , mientras que la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa requieren al menos un 0,003 % (p/v) de H_2O_2 . Para excluir las oxidasas, potencialmente presentes en el extracto bruto, como la causa de ABTS por oxidación en presencia de peróxido de hidrógeno, se añadió peróxido de hidrógeno a todas las preparaciones enzimáticas comerciales a una concentración final de 0,003 % (p/v). Se monitorizó la respuesta falsa positiva de ABTS ante el peróxido de hidrógeno (los hongos son capaces de producir enzimas productoras de H_2O_2 (Lonergan, Baker, 1995)) presente en el extracto bruto a concentraciones de peróxido de hidrógeno de 30, 0,3, 0,03 y 0,003 % (p/v). Estas pruebas establecieron que se requerían niveles de H_2O_2 tan altos como del 30 % (p/v) para la autooxidación de ABTS, descartando la probabilidad de falsos positivos fúngicos.

40 1.4 Alta actividad lacasa detectada en CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* crecida en medios suplementados con lignina

45 En comparación con los otros hongos de podredumbre blanca ensayados, CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* era más capaz de metabolizar y crecer en medios suplementados con lignina, debido a su crecimiento más fuerte en todos los medios ensayados, incluyendo medios suplementados con lignina alcalina (LA) (Tabla 1). Además, CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* secretaba niveles de actividad lacasa correspondientemente altos, basados en el grado y velocidad de desarrollo del color verde en el ensayo de placa de ABTS. En comparación, *Polyporus brumalis* y *Polyporus ciliatus* eran incapaces de crecer y secretar una actividad de oxidación de ABTS detectable cuando crecían en medio MEA suplementado con LA, aunque eran capaces de crecer en menor grado en todos los demás medios ensayados. El crecimiento de *Trametes versicolor* era similar al de *G. lucidum*; sin embargo, la oxidación detectada de ABTS era mucho menor.

50

Tabla 1. Evaluación del crecimiento fúngico¹ sobre sustrato recalcitrante que suplementa tanto medio MM como MEA

Medios de cultivo usados ²		<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Polyporus brumalis</i>	<i>Polyporus ciliatus</i>	<i>Trametes versicolor</i>
LA ³	MM	+	±	±	±
	MEA	++	-	-	-
BCA + AV ⁴	MM	++	+	+	+
	MEA	+++	+	+	+
BCA ⁵	MM	++	+	+	+
	MEA	+++	+	+	+

¹Clasificación del crecimiento fúngico sobre sustrato recalcitrante que suplementa medio MM y MEA en escala de (+), (-). (±) Crecimiento débil (colonias de micelio simples), (+) buen crecimiento (alfombra micelial que cubre todo el diámetro del tubo experimental), (++) mejor crecimiento (como en el caso de buen crecimiento, pero alfombra micelial más gruesa), (+++) crecimiento excepcional (alfombra micelial gruesa más crecimiento fúngico extendido sobre las paredes del tubo experimental) y (-) sin crecimiento. La clasificación del crecimiento fúngico estaba basada en el área de micelio (tamaño de colonia) que flota sobre el soporte de perlas Leca® añadido al medio de cultivo.

²Medios de cultivo usados en este estudio: MEA (medio de extracto de malta) y MM (medio mínimo)

^{3, 4 y 5}. Suplementación de medios de cultivo: lignina alcalina (LA), bagazo de caña de azúcar y Avicel (BCA + AV.) y bagazo de caña de azúcar (BCA), respectivamente.

1.5 La actividad lacasa producida por *Ganoderma lucidum* es cuantitativamente mayor que en otros hongos de podredumbre blanca

Se midió cuantitativamente la actividad lacasa en los extractos brutos de los cuatro hongos usando siringaldazina (Sigma Aldrich, Alemania), que es un verdadero sustrato de lacasa, debido a su falta de autooxidación por la interferencia de peroxidasas (Harkin, *et al.* 1974). Se midió la actividad lacasa por el método de Ryde (1980).

Las medidas cuantitativas de los cuatro hongos crecidos en medios suplementados con BCA y BCA + AV muestran que se obtenía la actividad lacasa máxima con *Ganoderma lucidum* cuando crecía en medio MEA, que era 3,5 veces mayor en comparación con el cultivo en medio MM en las mismas condiciones (Figura 1). En comparación, los rendimientos de actividad lacasa para *Polyporus brumalis* y *Polyporus ciliatus* eran de 13 a 17 veces menores que para *Ganoderma lucidum*. De forma similar, se detectó un rendimiento de actividad lacasa aproximadamente 6 veces mayor para *Ganoderma lucidum* crecido en MEA suplementado con LA en comparación con *P. ciliatis*, *P. brumalis* y *T. versicolor* (Figura 1).

Ejemplo 2: Caracterización de la lacasa expresada y secretada por CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*

Se caracterizó la lacasa nativa secretada por CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* con respecto a su masa molecular, propiedades cinéticas y secuencia parcial.

2.1 Electroforesis PAGE-SDS de proteínas secretadas por CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*

Los extractos de proteína brutos obtenidos de *Ganoderma lucidum*, crecido en medio MEA suplementado con BCA, BCA + AV o LA, contenían cada uno una proteína de aproximadamente 62,5 kDa, que es ligeramente menor que la masa molecular de la lacasa comercializada de *Trametes versicolor* (Figura 2).

2.2 Electroforesis PAGE nativa de proteínas secretadas por CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*

Se efectuó la PAGE nativa del extracto de proteína bruto de *Ganoderma lucidum* según Hoopes y Dean (2001), donde se detectó actividad lacasa incubando el gel con el sustrato de lacasa 1.8-diaminonaftaleno (DAN). Se identificó así la proteína de 62,5 kDa secretada por *Ganoderma lucidum* como una lacasa activa.

2.3 Medidas cinéticas de la lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* secretada

Se calculó que la lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* tenía un valor de K_m de 0,107 mM para el sustrato ABTS basándose en un gráfico de Hanes-Wolf, Tabla 2, que se encuentra en el intervalo medio con respecto a otras lacasas fúngicas, aunque es distinto y menor que el valor de K_m de la lacasa de *Ganoderma lucidum* GaLc3.

Tabla 2. Constantes cinéticas de lacasas*. Se incluye también el valor de pH al que se midió la K_m .

Sustrato	Lacasa	K_m (μ M)	pH	Referencia
ABTS	Lac4 de <i>Pleurotus sajor-caju</i>	2500	3,3	Soden <i>et al.</i> 2002
	Lcc1 de <i>Myceliophthora thermophila</i>	290	6	Bulter <i>et al.</i> 2003
	POXC de <i>Pleurotus ostreatus</i>	280	3	Palmieri <i>et al.</i> 1997
	POXA2 de <i>Pleurotus ostreatus</i>	120	3	Palmieri <i>et al.</i> 1997
	CBS229.93 de <i>Ganoderma lucidum</i>	107	5	
	POXA1 de <i>Pleurotus ostreatus</i>	90	3	Palmieri <i>et al.</i> 1997
	Lcc4 de <i>Rhizoctonia solani</i>	52	5,3	Xu <i>et al.</i> 1995
	GaLc3 de <i>Ganoderma lucidum</i>	370	5	Ko <i>et al.</i> 2001
	POXL3 de <i>Trametes trogii</i>	30	3,4	Garzillo <i>et al.</i> 1998

* Se midió la constante de Michaelis (K_m) de la lacasa secretada por *Ganoderma lucidum* en las condiciones de reacción detalladas por Bourbonnais y Pace (1992), usando el sustrato ABTS (solución acuosa de ABTS de 50 mg/ml) como se describe por Wolfenden y Willson, 1982, a una concentración final de: 0,0113, 0,0085, 0,006, 0,0025, 0,001, 0,0005 y 0,0001 M.

2.4 Secuencia aminoacídica parcial de la lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* secretada

Las secuencias aminoacídicas parciales de péptidos derivados de lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* mostraban homología con las secuencias de lacasa de *Basidiomycota* (Tabla 3). En particular, las secuencias aminoacídicas entre la posición 88 a 100 y la posición 185 a 197 están bastante conservadas dentro de la familia de los *Ganodermataceae* basándose en los resultados de BLAST en la base de datos UniProt (Apweiler, *et al.* 2004).

Tabla 3. Vista general de la identidad de cuatro glicopéptidos analizados por MALDI-TOF a partir de CBS229.93 de *G. lucidum** con otras lacasas depositadas en la base de datos NCBI.

Identificador UniProt	Organismo identificado	Sec. aa	Identidad de secuencia de los glicopéptidos descubiertos [%]			
			⁸⁸ TTSIHWH GFFQK ¹⁰⁰	²⁴⁵ DDDSTVL TLADWYHV AAR ²⁶³	⁴⁵² TLSNADI APDGFTR ⁴⁶⁶	¹⁸⁵ GSDSTLI NGLGR ¹⁹⁷
Q9GH17	7071-9 <i>Ganoderma lucidum</i>	de 520	100	80	81	100
Q9HDS8	<i>Polyporus cilliatatus</i>	524	90	80	81	100
C5HL41	TR6 <i>Ganoderma lucidum</i>	de 520	100	80	81	100
B5G552	RZ <i>Ganoderma lucidum</i>	de 520	100	75	88	100
Q308Q9	<i>Trametes versicolor</i>	522	100	85	64	93
A3F8Z8	lac1 <i>Polyporus brumalis</i>	de 520	100	90	70	93

Identificador UniProt	Organismo identificado	Sec. aa	Identidad de secuencia de los glicopéptidos descubiertos [%]			
			88TTSIHW GFFQK ¹⁰⁰	245DDDSTVL TLADWYHV AAR ²⁶³	452TLSNADI APDGFTR ⁴⁶⁶	185GSDSTLI NGLGR ¹⁹⁷
A3F8Z8	<i>lac2</i> <i>Polyporus brumalis</i>	de 524	90	-	-	93
Q9UVQ2	<i>lac1</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	de 518	90	75	68	93

*Se extrajo la proteína lacasa de *Ganoderma lucidum* (~62,5 kDa) de gel de PAGE-SDS y se digirió en gel con tripsina antes del análisis de MALDI-TOF como se describe anteriormente por Thaysen-Andersen (2009) y como se detalla por Schiøt (2010). Se obtuvieron las secuencias peptídicas aminoacídicas cortas mediante secuenciación *de novo* y se analizaron usando un 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) en modo MS/MS, seguido de interpretación manual de los espectros de MS/MS obtenidos por el programa AminoCalc (Protana A/S, Odense, Dinamarca). Péptido 88-100 (SEQ ID NO: 11); péptido 245-263 (SEQ ID NO: 12); péptido 452-466 (SEQ ID NO: 13); péptido 185-197 (SEQ ID NO: 14).

Ejemplo 3: La lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* potencia la hidrólisis medida por celulasa de BCA explotado por vapor y la liberación de glucosa por Cellic® CTec1.

La Figura 4A muestra la comparación gráfica de la glucosa liberada con el tiempo durante la hidrólisis de BCA explotado por vapor a pH 5,1 y 50 °C por la preparación enzimática Cellic® CTec1 (CC1) sola y en combinación con extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum* crecido en MEA (BCA) en comparación con lacasa de *Trametes versicolor* comercialmente disponible. Se añadieron CC1 y extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum* a una relación de enzima/sustrato (E/S) de 0,064 % y 0,2 % (p/p), respectivamente. La adición del extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum* aumentaba la liberación de glucosa un 17 % durante un periodo de 24 h cuando se ensayaba en materia seca al 5 % (p/v) de BCA pretratado (BCA-STEX). Cuando se efectuó de nuevo este ensayo comparativo (véase la Figura 4B), pero a un pH de 4,8, con un sustrato de 0,8 % (p/v) de materia seca de BCA pretratado, la adición del extracto de proteína bruta de *Ganoderma lucidum* aumentaba los rendimientos de glucosa un 43 % durante un periodo de 24 h. En contraposición, la lacasa de *Trametes versicolor* reducía realmente la hidrólisis de BCA-STEX mediada por celulasa.

Ejemplo 4: Clonación y caracterización del gen de lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*, *LacGL1*, y de ADNc que codifica la lacasa

Se clonó el gen *LacGL1* que codifica la lacasa LacGL1 por amplificación por PCR a partir de ADN genómico aislado de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*.

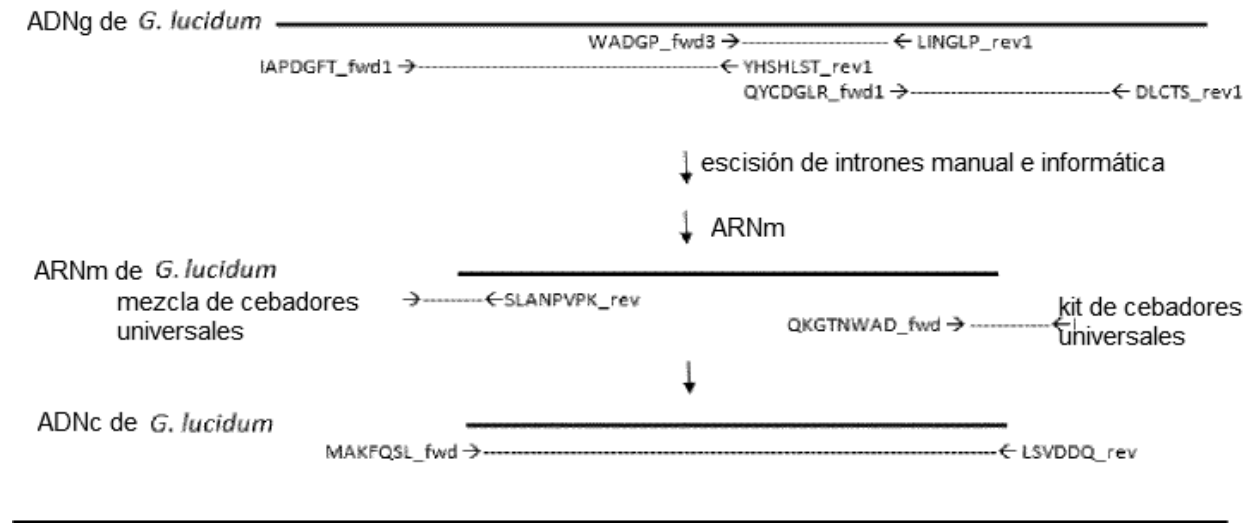
4.1 Aislamiento de ADN genómico aislado de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*

Se recogió micelio de *Ganoderma lucidum* (0,1 a 0,3 g) de placas de MEA usando un escalpelo estéril, se transfirió a mortero y almirez anteriormente enfriados y se molió en nitrógeno líquido. Se aisló el ADN genómico usando el método de cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (25:24:1 v:v:v) anteriormente descrito por Lee y Taylor (1990). Se recogieron sedimentos del ADN extraído de 10 tubos de aislamiento, se resuspendieron en 10 µl de tampón TE cada uno (Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, pH 7,2), se precipitaron conjuntamente usando de 2 a 3 volúmenes de etanol al 96 % (v/v) enfriado con hielo y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y se incubaron a -20 °C durante una noche. Se sedimentó entonces el ADN genómico por centrifugación a 14.000 rpm a 4 °C durante 30 min y se lavó el sedimento con etanol al 70 % (v/v), se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en la cantidad deseada de tampón TE.

4.2 Clonación del gen *LacGL1* a partir de ADN genómico de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*

El análisis de MALDI-TOF de lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* reveló la identidad de secuencia aminoacídica entre los cinco péptidos cortos pertenecientes a lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* y lacasa Q9HG17 de *G. lucidum*, en que los dos péptidos TTSIHWGFFQ y FPIGSDSTLINGIG estaban altamente conservados en varios miembros de los *Basidiomycota* (Tabla 3). Se diseñaron un par de cebadores de PCR directo e inverso (WADGP_fwd3 y LINGLP_rev1 en la Tabla 4) basándose en la correspondiente secuencia de ARNm de Q9HG17 de *G. lucidum* que codifica estas dos secuencias peptídicas conservadas.

Tabla 4 Etapas de clonación para el aislamiento del gen *LacGL1*



Cebadores usados para la amplificación del fragmento de 500 pb del gen <i>LacGL1</i> a partir de ADN genómico		
WADGP_fwd3	5'-CTG GGC GGA TGG TCC CGC-3'	[SEQ ID NO: 15]
LINGLP_rev1 ^c	5'-CGG CCA AGG CCA TTG ATG AG-3'	[SEQ ID NO: 16]
Cebadores para la amplificación del fragmento del gen <i>LacGL1</i> fuera del fragmento de 500 pb		
QYCDGLR_fwd1	5'-CAG TAC TGC GAC GGT CTA AGA GG-3'	[SEQ ID NO: 17]
YHSHLST_rev1	5'-GGT GGA GAG ATG ACT GTG GTA CC-3'	[SEQ ID NO: 18]
Cebadores usados para la amplificación del fragmento de 2 kpb del gen <i>LacGL1</i> a partir de ADN genómico		
IAPDGFT_fwd1 ^c	5'-CAT CGC TCC CGA TGG CTT CAC TC-3'	[SEQ ID NO: 19]
DLCTS_rev1 ^c	5'-CTG ACG TCG GGC AAA GAT CCG-3'	[SEQ ID NO: 20]
Cebadores usados para la amplificación de una secuencia nucleotídica completa del gen <i>LacGL1</i> a partir de ADNc		
SLANPVPK_rev	5'-CTT CGG CAC AGG GTT TGC TAG GGA G-3'	[SEQ ID NO: 21]
QKGTNWAD_fwd	5'-CAG AAG GGC ACG AAC TGG GCT GAC-3'	[SEQ ID NO: 22]
LSVDDQ_rev	5'-TAG CGC GGC CGC CTA TTA TCA TTG ATC ATC GAC CGA GAG CG-3'	[SEQ ID NO: 23]
MAKFQSL_fwd	5'-ATG CGA ATT CAT GGC GAA GTT CCA ATC GTT GC-3'	[SEQ ID NO: 24]
α-FACTOR_fwd	5'-ATG CGA ATT CGG CAT CGG TCC CAA GAC C-3'	[SEQ ID NO: 25]

^aEl nombre del cebador se basaba en la correspondiente región aminoacídica en la lacasa de Q9GH17 de *Ganoderma lucidum*. Las regiones aminoacídicas elegidas para el diseño de cebadores estaban basadas en el ARNm de lacasa de Q9HG17 de *G. lucidum*.

^cLos aminoácidos subrayados en el nombre del cebador representan mutaciones posicionales simples en la lacasa *LacGL1* en comparación con lacasa de Q9GH17 de *G. lucidum*.

Kit de cebadores universales:

5'-ctaatacgactcactatagggc AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' [SEQ ID NO:26] y

5'-ctaatacgactcactatagggc -3' [SEQ ID NO:27]

Se llevó a cabo la amplificación del gen *LacGL1* con el par cebador (WADGP_fwd3 and LINGLP_rev1) con 8 U de polimerasa RUN (A&A Biotechnology, Polonia) por volumen de 25 µl. Se inició el programa de temperatura de PCR a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s, 72 °C durante 2 min y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Se purificaron los productos de PCR usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Dinamarca), se subclonaron y se enviaron para secuenciación en el vector pCR®-BluntII-TOPO®.

La amplificación por PCR procuró un fragmento de 500 pb del gen *LacGL1*, que mostraba un 80 % de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia de ARNm de Q9HG17 de *G. lucidum*, y comprendía secuencias de codificación que codifican una región de la lacasa LacGL1 colocada entre los péptidos conservados TTSIHWGFFQ and FPLGSDSTLINGLG.

5 Para extender el fragmento clonado de 500 pb, se usaron los cebadores externos QYCDGIR_fwd1 e YSHIST_rev1 (Tabla 4), colocados en el fragmento clonado, para amplificar ADN genómico de *G. lucidum* en combinación con los copartícipes fwd y rev, IAPDGF1_fwd1 y DLCTS_rev1, correspondientes al extremo 5' y 3', respectivamente de la secuencia de codificación de ARNm de Q9HG17 de *G. lucidum*. Se inició la amplificación por PCR del gen *LacGL1* mediante desnaturalización de la estirpe de ADN a 96 °C durante 30 s, seguida de 35 ciclos a 96 °C durante 30 s, 63,4 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s y una extensión final a 72 °C durante 5 min, con las siguientes alícuotas de la mezcla de reacción PCR: 0,25 µl de polimerasa Phusion (Finnzymes, Finlandia) 2U/µl, 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5 µl de tampón 5xHF, 0,2 µl de dNTP (Fermentas, Dinamarca) 25 mM, 2,5 µl del correspondiente cebador P1 y P2 10 pmol/µl (véase la Tabla 1) y 1 µl de un ADN apropiadamente diluido.

15 La PCR procuró un fragmento de 1963 pb de parte del gen de lacasa *LacGL1*, correspondiente a los nucleótidos 105-2067 de SEQ ID NO: 6. El análisis manual e informático (Stanke, Morgenstern, 2005) de intrones y exones del gen (SEQ ID NO: 6), reveló la existencia de 9 intrones localizados en 184-250, 320-369, 491-547, 662-722, 787-862, 959-1009, 1167-1218, 1417-1476 y 1741-1796 pb que seguían todos la norma GT-AG en las uniones de exón/intrón, y tenían un motivo característico de *Basidiomycetes* en el CTNA de intrón.

4.4 Clonación del ADNc de *LacGL1* de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*.

20 Se usó la técnica RACE, Ryu, *et al.* 2008, para clonar secuencias en 5' y 3' del fragmento genómico de 1963 pb clonado para obtener entonces la secuencia nucleotídica completa de ADNc de *LacGL1* a partir del ARN total de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*.

25 Se llevaron a cabo la construcción de la colección de ADNc de primera hebra y el experimento de amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE) usando el kit de amplificación de ADN SMARTer™ RACE (Clontech, EE.UU.) y se generaron fragmentos de PCR RACE 5' y 3' usando la mezcla de cebadores universales, como se suministra en el kit, y el cebador específico de gen QKGTNWAD_fwd o SLANPVPK_rev (Tabla 4), respectivamente, cuyas secuencias se basan en la secuencia nucleotídica parcial del gen *LacGL1*. El ciclo de reacción de RACE era como sigue: 94 °C durante 1 min; 5 ciclos a 94 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min; 5 ciclos a 94 °C durante 30 s, 70 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min y 25 ciclos a 94 °C durante 30 s, 68 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min.

30 Se clonaron los productos de RACE generados en el vector pCR®-BluntII-TOPO® y se secuenciaron. La superposición de fragmentos de secuencia 5' y 3' posibilitaba el ensamblaje de toda la secuencia de codificación del gen *LacGL1*. Se amplificó entonces la secuencia nucleotídica completa obtenida del gen *LacGL1* a partir de la colección de ADNc usando el cebador MAKFQSL_fwd y el cebador LSVDDQ_rev (Tabla 1) y se envió para secuenciación a un vector pCR®-BluntII-TOPO®.

35 La secuencia nucleotídica determinada del ADNc de *LacGL1* (SEQ ID NO: 8) y el correspondiente fragmento de 1963 pb del gen *LacGL1* desprovisto de intrones eran idénticos. Basándose en el ADNc de *LacGL1*, el ARNm de *LacGL1* es de 1563 nt de longitud.

Ejemplo 5. Caracterización de lacasa de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum*, *LacGL1*, codificada por el gen *LacGL1*

40 El polipéptido de *LacGL1* codificado por el ADNc y gen de lacasa *LacGL1* (obtenido por traducción usando la herramienta de traducción ExPASy, Gasteiger *et al.* 2005) tiene 520 aminoácidos (SEQ ID NO: 9) que comprenden un péptido señal de 21 aminoácidos de largo y un sitio de escisión, predichos por el software SignalP (Nielsen, *et al.* 1997; Bendtsen, *et al.* 2004). Se calculó que el pI y la masa molecular de la lacasa nativa (menos su péptido señal) eran de 5,07 y 54,5 kDa y de la lacasa *LacGL1* (menos el péptido señal), pero que contenía un marcador de purificación de 27 aminoácidos, se calculó que era de 5,21 y 57,5 kDa. Esta masa molecular es ligeramente menor que la de la lacasa *LacGL1* nativa de 62,5 kDa detectada por PAGE-SDS (Figura 2) y PAGE nativa (Figura 3). Esto es presuntamente debido a la glicosilación de lacasa, puesto que la secuencia *LacGL1* contiene 7 sitios potenciales de N-glicosilación computados por NetNGlyc server (Blom, *et al.* 2004).

50 La secuencia deducida de *LacGL1* compartía un 91 % de identidad de secuencia aminoacídica con la lacasa de estirpe 7071-9 de *Ganoderma lucidum* (identificador UniProt Q9HG17) y un 81 % de identidad de secuencia aminoacídica con la lacasa de *Polyporus brumalis* (A3F8Z8), respectivamente.

55 El análisis de la secuencia aminoacídica de la lacasa *LacGL1* de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* reveló un alto grado de homología en los dominios de unión a cobre conservados, que comprenden aminoácidos que toman parte en la coordinación con cuatro átomos de cobre (Figura 5). Estos dominios consisten en 4 regiones de secuencia sin huecos, identificados como R1-R4, que contienen 1 cisteína y 10 histidinas como residuos conservados que están implicados en la unión a 4 iones de cobre (Thurston, 1994). 8 de las 10 histidinas aparecían en un patrón altamente conservado de motivos HXH (Figura 5) en la proteína. Una X en este motivo representa un residuo no definido. Además, los motivos HXH estaban separados entre sí por segmentos de 25 a 175 aminoácidos (Kumar, *et al.* 2003).

Los residuos más importantes que se coordinan con los iones de cobre se localizaban en el dominio 1 y 3.

Ejemplo 6. Clonación y expresión recombinante del gen *LacGL1* de CBS229.93 de *Ganoderma lucidum* en *Pichia pastoris*

5 Se clonó el ADNc de *LacGL1* en un vector de expresión junto con una secuencia de codificación del péptido señal de factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (pML α _LacGL1, Figura 6) para dirigir el transporte extracelular de la proteína LacGL1 expresada, cuando se expresa en *P. pastoris*.

6.1 Construcción de un vector de expresión pML α _LacGL1

10 Se amplificó el ADNc de lacasa *LacGL1* usando una polimerasa de corrección: la ADN polimerasa Phusion® Hot Start II High-Fidelity (Finnzymes, Finlandia). Se subclonó el ADNc de lacasa amplificado con la secuencia nucleotídica que codifica un prepropéptido de factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* (Brake, *et al.* 1983), usando los cebadores α -FACTOR_fwd y LSVDDQ_rev (Tabla 1), y se digirió el producto amplificado con *EcoRI* y *NotI* y se clonó en el plásmido pPICZ α A, generando el vector pML α _LacGL1 (Figura 6). El vector pML α _LacGL1 comprende además secuencias que codifican un epitopo c-myc y un marcador HIS (27 aminoácidos adicionales) que se extienden desde el extremo C-terminal de la lacasa expresada.

15 6.2 Expresión de la lacasa *LacGL1* en X-33 de *P. pastoris* y visualización de su secreción

20 Se transformó la estirpe X-33 de *P. pastoris* por electroforesis con el vector pML α _LacGL1. Se usó el plásmido pPICZ α A como control negativo para la expresión de lacasa (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se linealizaron todos los vectores de expresión con *PmeI* (*MssI*) antes de la transformación. Se seleccionaron las células transformantes en placas de agar de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPDS) (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 2 % de dextrosa, sorbitol 1 M, 2 % de agar) que contenían zeocina 100 μ g/ml. Se detectó la expresión en agar de lacasa LacGL1 a partir de transformantes positivos de *P. pastoris* por la aparición de halos rojos amarrados después de 7 días de crecimiento a 30 °C en placas de agar de metanol mínimo tamponado (BMM) (fosfato de potasio 100 mM, pH 6, 1,34 % de base nitrogenada de levadura (YNB), 4×10^{-5} % de biotina, 1 % de metanol y 1,5 % de agar) suplementado con CuSO₄ 0,3 mM y 0,04 % de guayacol.

25 Se efectuó también la producción de lacasa LacGL1 recombinante en cultivos líquidos antes de la fermentación. La inoculación de los clones positivos seleccionados en medio de glicerol tamponado (BGMY) (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, fosfato de potasio 100 mM, pH 6, 1,34 % de YNB, 4×10^{-5} % de biotina, 1 % de glicerol) estuvo seguida por incubación a 30 °C durante una noche en una incubadora rotatoria. Se recolectaron las células cuando la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 1, se resuspendieron en medio de metanol tamponado (BMMY) (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, fosfato de potasio 100 mM, pH 6, 1,34 % de YNB, 4×10^{-5} % de biotina, 0,5 % de metanol) suplementado con CuSO₄ 0,3 mM y se incubaron durante 5 días con la adición de metanol a una concentración final del 0,5 % cada 24 h. Se eligió para fermentación la estirpe que exhibe la actividad lacasa específica máxima para ABTS.

30 6.3 Producción heteróloga de lacasa *LacGL1* por *P. pastoris* recombinante

35 Se inoculó la cepa X-33 de *P. pastoris* que comprende el vector pML α -LacGL1 durante una noche a 30 °C a 150 rpm en matraces agitados en medio BMG (glicerol mínimo tamponado) (fosfato de potasio 100 mM, pH 6, 1,34 % de YNB, 4×10^{-5} % de biotina, 1 % de glicerol) hasta que la densidad celular alcanzó un valor de 1,7. Siguió a esta etapa la inoculación en un fermentador Sartorius Biostat Aplus de 5 l. La producción a escala de 5 l de lacasa recombinante de *P. pastoris* se efectuó esencialmente según Stratton *et al.* (1999) y como se detalla por Silva *et al.* (2011), excepto porque se llevó a cabo la fase de alimentación por lotes de metanol a 20 °C para mejorar la estabilidad enzimática. Se mantuvo la agitación por debajo de 750 rpm para evitar una disrupción celular excesiva de las células de *P. pastoris* y a su vez para limitar el proceso de purificación aguas abajo. Se añadió automáticamente oxígeno adicional para adaptarse al crecimiento y expresión enzimática óptimos. El tiempo total para el procedimiento de fermentación era de 112 h.

45 Durante la fermentación a escala de 5 l (112 h), se monitorizó el crecimiento de levadura metanólica mediante la medida de la DO₆₀₀, que aumentaba de 1,7 a 630, mientras que las proteínas extracelulares, incluyendo LacG1, alcanzaban una concentración de 14,7 g/l. Se centrifugó el caldo de fermentación a 5300 x g a 5 °C durante 1 h, se esterilizó por filtración entonces el sobrenadante que comprende las proteínas extracelulares totales y se concentraron las proteínas por ultrafiltración usando un sistema biorreactor de flujo cruzado con una membrana de corte de 30 kDa (Millipore, Sartorius, Dinamarca), como se describe por Silva *et al.* (Silva *et al.* 2011). Se almacenaron las alícuotas enzimáticas que contenían glicerol al 25 % (ρ/v) a -80 °C.

50 Se detectó actividad lacasa lacGL1 entre las proteínas extracelulares expresadas por la fracción de *P. pastoris* recombinante, que se separaron por PAGE nativa y se ensayó la actividad lacasa en gel (Figura 7) como se describe en el Ejemplo 2, pero usando ABTS como sustrato. La lacasa lacGL1 expresada tenía una masa molecular relativamente alta de 125 kDa. El tratamiento con EndoH de la lacasa lacGL1 expresada disminuía su masa molecular a 62,5 kDa (Figura 7), mostrando que la alta masa era debida principalmente a una extensa glicosilación

de la lacasa expresada por *Pichia*.

Ejemplo 7: Método para medir la actividad lacasa sobre sustratos definidos

Se midió la actividad lacasa basándose en un método modificado de Ters *et al.* (2009). Se definió la actividad lacasa como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto a 25 °C y a pH 4,7. La mezcla de ensayo contenía: tampón citrato-fosfato 0,1 M (255 μl , pH 4,7), ABTS (5 μl , 4 mM (solución madre de ABTS)) y lacasa prediluida (5 μl) que aseguraba el intervalo lineal de la cinética de Michaelis-Menten. Se monitorizó la oxidación de ABTS a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 2 min en un lector de placas de microvaloración Infinite 200 (Tecan, Salzburgo, Austria). Se realizaron ensayos de actividad lacasa sobre los sustratos: hidroquinona (248 nm), 2,6-dimetoxifenol (470 nm) y guayacol (436 nm) de forma similar a la concentración de sustrato descrita en la Tabla 2, usando los siguientes valores de coeficiente de extinción: 17.542 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 35.645 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y 6.400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente (Minussi *et al.* 2007). Se monitorizó la recogida de datos por el programa Tecan i-control versión 1.5.14.0 (Tecan, Salzburgo, Austria). Se corrigió la actividad lacasa calculada por la absorbancia de una muestra de control que contenía: tampón citrato-fosfato 0,1 M (255 μl , pH 4,7), ABTS (5 μl , 4 mM) y 5 μl de agua destilada en lugar de la enzima. Se efectuaron todas las determinaciones de la actividad lacasa por duplicado, con una desviación estándar media de muestra menor del 5 %.

Ejemplo 8. Caracterización de la lacasa LacGL1 expresada por *P. pastoris* recombinante

Se midió que la actividad lacasa de LacGL1 expresada por *P. pastoris* recombinante era de 17,5 U/ml después de esterilización por filtración, según el método del ejemplo 7.

8.1 Evaluación de la influencia de pH y temperatura sobre la actividad lacasa de LacGL1

Se determinó el efecto de pH y temperatura sobre la actividad lacasa de LacGL1 con un experimento diseñado estadísticamente, aleatorizado y factorial completo como se describe en la Figura 8. Se calculó la actividad lacasa relativa basándose en la actividad de LacGL1 a pH 4,7 y 25 °C. Se obtuvo la actividad relativa máxima a pH 4,7 (área central del gráfico) y 55 °C y era casi independiente de la temperatura, mientras que se observó la actividad relativa mínima a valores de pH por debajo de 6 (área periférica del gráfico). El coeficiente de correlación del modelo R^2 (0,99) sugería que el modelo ajustado podía explicar un 99 % de la variación total en los datos. Junto con los altos valores de predictividad Q^2 (0,97) y reproducibilidad (0,98), pudo concluirse que el modelo era fiable.

Se validaron las condiciones óptimas predichas para la actividad lacasa de LacGL1 midiendo el efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la lacasa LacGL1 a pH 4,7. A temperaturas de 25, 40 e incluso 50 °C, la actividad no cambiaba significativamente al cabo de una hora, sin embargo temperaturas de 60 y 70 °C reducían la actividad lacasa al 19 y 3 % respectivamente (Figura 9). Estos resultados confirmaban los datos del modelo con respecto al intervalo de temperatura de 25 a 50 °C. Adicionalmente, la lacasa LacGL1 mostraba una estabilidad bastante alta a 50 y 40 °C para un tiempo prolongado de incubación, reteniendo un 33 % de actividad después de 24 h a 40 °C en contraposición con un 23 % de actividad después de 5 h a 50 °C (Figura 10).

8.2 Especificidad de sustrato de la lacasa LacGL1

La lacasa LacGL1 era capaz de oxidar tanto ABTS como otros compuestos fenólicos (Tabla 5) tales como: hidroquinona, guayacol y 2,6-dimetoxifenol, sin embargo a una tasa más lenta que para ABTS. La comparación de la tasa de formación de producto de la lacasa de extracto bruto de *G. lucidum* (Lac_GLCE) mostraba un patrón similar, sin embargo la lacasa LacGL1 expresada era ligeramente más rápida.

Tabla 5 Especificidad de sustrato de la lacasa LacGL1

Sustrato [1 mM]	Tasa relativa de formación de producto de lacasa [%] ^a	
	LacGL1 ^b	Lac_GLCE ^c
ABTS	100	100
Hidroquinona	80	66
Guayacol	66	57
2,6-Dimetoxifenol	61	51

^aTodos los valores representan la media de medidas duplicadas con una diferencia relativa entre medidas individuales < 5 %.

^bLacasa de *Ganoderma lucidum*, expresada en *P. pastoris*,

^cLacasa en extracto bruto de *Ganoderma lucidum*, usada como referencia para lacasa LacGL1.

Se calculó que el valor de K_m de la lacasa LacGL1 para ABTS como sustrato era de 0,122 mM a partir de un gráfico de Hanes-Wolf que prueba 5 μ l de preparación de lacasa LacGL1 con un intervalo de concentración de ABTS de: 0,015, 0,031, 0,041, 0,062, 0,077 y 0,092 mM.

8.3 Inhibidores de lacasa LacGL1

- 5 La lacasa LacGL1 y la lacasa del extracto bruto de *G. lucidum* se inhibían fuertemente por azida de sodio (0,01 y 0,1 mM) y ditioneitol (0,5 mM), pero a un nivel menor pero significativo por fluoruro de sodio, como se muestra en la Tabla 6. El EDTA afectaba a la actividad lacasa en una menor extensión.

Tabla 6. Efecto de las sustancias inhibitoras sobre la oxidación de ABTS por la lacasa LacGL1 de *Ganoderma lucidum*, expresada en *Pichia pastoris*.

Compuesto	Concentración [mM]	Inhibición [%] ^a	
		LacGL1	Lac_GLCE
Azida de sodio	0,0001	16	18
	0,0005	50	47
	0,001	57	57
	0,01	100	89
	0,1	100	100
Fluoruro de sodio	0,0001	8	23
	0,0005	13	24
	0,001	19	28
	0,01	22	38
	0,1	46	56
EDTA	50	16	30
Ditioneitol	0,5	100	100

10

Ejemplo 9. Composición de bagazo de caña de azúcar antes y después de pretratamiento por explosión de vapor

Se obtuvo BCA (bagazo de caña de azúcar) de la compañía American Society of Sugarcane Technologists, Florida Division (LaBelle, FL, EE.UU.). Se lavó la biomasa cruda con agua destilada para retirar cualquier partícula de arena y se secó a 50 °C antes del pretratamiento. Después de ello, se pretrató materia seca al 15 % (p/v) de BCA por el procedimiento de explosión por vapor a 175 °C durante 10 min, a 11 bares de presión y con una doble adición de oxígeno (3 min cada sesión) como se describe anteriormente (Sørensen *et al.* 2007). Después de la explosión por vapor, se mezclaron conjuntamente la torta de filtro y el hidrolizado, se secaron a 55 °C durante 44 h y se molieron en molinillo para pasar un tamaño de tamiz de 210 μ m (Endecotts, Londres, RU). El BCA pretratado (BCA-STEX) contenía: 48,8 % (p/p) de celulosa, 13,8 % (p/p) de hemicelulosa y 19,3 % (p/p) de lignina insoluble.

15

20

Se determinó el contenido de materia seca y la composición de la biomasa según el procedimiento del National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter *et al.* 2010). Se determinaron los niveles de glucosa y xilosa liberados después de hidrólisis con ácido fuerte mediante HPAEC usando el sistema Dionex BioLC equipado con la columna analítica Dionex CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA, EE.UU.) y un detector electroquímico usado en modo de detección amperométrica por pulsos principalmente como se describe anteriormente (Sørensen *et al.* 2003).

25

Ejemplo 10. La lacasa LacGL1 potencia la hidrólisis mediada por celulasa de bagazo de caña de azúcar pretratado

Se ensayó la capacidad de la lacasa LacGL1 expresada recombinante de potenciar la hidrólisis mediada por celulosa de bagazo de caña de azúcar pretratado hasta azúcares fermentables en combinación con composiciones de celulosa comercialmente disponibles.

30

10.1 Determinación de la liberación de glucosa como medida de la hidrólisis catalizada por lacasa-celulasa de bagazo de caña de azúcar pretratado (explotado por vapor)

Se evaluó materia seca al 5 % (p/v) de BCA pretratado (BCA-STEX) en tampón citrato-fosfato 0,1 M a pH 4,7 y 40 °C (óptimo para la lacasa LacGL1) o a pH 5,1 y 50 °C (óptimo para preparaciones de celulasa), respectivamente. Se usaron las preparaciones de cóctel de celulasa comercialmente disponibles: Cellic®CTec1 y Cellic®CTec2 (0,064 % de relación de enzima/sustrato (E/S), p/p; Novozymes, Bagsværd, Dinamarca) con la combinación de lacasa LacGL1 (0,4 % de E/S, p/p). Se recogieron las reacciones de hidrólisis después de 0, 1, 3, 5, 16 y 24 horas y se detuvieron por incubación a 99 °C durante 15 min. Se centrifugaron entonces las muestras a 10.000 rpm durante 2 min, se filtraron los sobrenadantes a través de un filtro de 0,2 µm y se cuantificaron los rendimientos de glucosa liberada usando el kit D-glucose-HK (Megazyme, Dinamarca). Se corrigieron los rendimientos de glucosa liberada con el tiempo para el contenido de glucosa de la muestra de hidrólisis a tiempo 0. La dosificación de E/S estaba basada en la concentración de proteína total usada. Se efectuó la cuantificación de proteína usando el procedimiento en microplaca del kit de ensayo de proteína por BCA (ácido bicinónico) de Pierce según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EE.UU.) usando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón, como se describe anteriormente (Silva *et al.* 2011). Las preparaciones de celulasa Cellic®CTec1 (CC1) y Cellic®CTec2 (CC2) están basadas en el complejo de celulasa de *Trichoderma reesei* (actividades exoglucanasa, endoglucanasa y β-glucosidasa) con proteínas estimulantes de la hidrólisis de la familia 61 β-glucosidasa y glicosido hidrolasa (Harris, 2010). Se efectuaron todas las determinaciones de las muestras de hidrólisis enzimática por duplicado.

10.2 La lacasa LacGL1 potenciaba la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar pretratado (explotado por vapor) por celulasa

La liberación de glucosa durante la hidrólisis de celulosa de BCA-STEX se potencia por la adición de lacasa LacGL1 de manera dependiente de la dosificación (datos no mostrados). Se efectuó el tratamiento combinado de lacasa más celulasa de BCA-STEX en dos condiciones diferentes: en primer lugar, a pH 4,6, 40 °C, que es óptimo para la lacasa LacGL1 (como se muestra anteriormente en el modelo de pH-temp-actividad MODDE, Figura 8, y los gráficos de estabilidad térmica, Figuras 9, 10), que es ligeramente menos óptimo para celulasas; y en segundo lugar a 50 °C y pH 5,1, que son las condiciones de referencia para la actuación óptima de CC1 y CC2. A partir de los datos de MODDE, se observaron tres efectos diferentes sobre los niveles de glucosa y dependientes de tres factores: el tipo de preparación de celulasa, la adición de LacGL1, la temperatura y el pH de la reacción (Figura 11, 12). Globalmente, se obtuvo la tasa máxima de hidrólisis de BCA-STEX, considerando todos los factores anteriormente mencionados, para la combinación de LacGL1-Cellic®CTec2 a pH 5,1 y 50 °C. Los rendimientos de glucosa total eran un 19 y 27,5 % mayores, en comparación con la hidrólisis mediada por CC2 (sola) en las mismas condiciones, y a un pH de 4,6 y 40 °C, respectivamente. El mayor pH y temperatura potenciaban la hidrólisis catalizada por LacGL1-CC2 un 12 % (Figura 12).

La LacGL1 potenciaba también la hidrólisis mediada por CC1 a pH 4,6 y 40 °C un 30 % (Figura 11). Para esta combinación enzimática, las condiciones óptimas eran pH 4,6 y 40 °C, dando una mejora de los rendimientos de glucosa de un 48 % y 66 % frente a las muestras hidrolizadas por LacGL1-CC1 y CC1 a pH 5,1 y 50 °C.

Ejemplo 11. Clonación y expresión recombinante de GLlac1 de *Ganoderma lucidum* en *Pichia pastoris*

11.1 Clonación de lacasa GLlac1 de *Ganoderma lucidum* en *Pichia pastoris*

Se descargó el ADNc de GLlac1 de *Ganoderma lucidum* (nº de acceso a GenBank FJ656307) que codifica una lacasa GLlac1 que comprende su péptido señal nativo desde GenBank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/224037823?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=2XPBZ0Z4015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/224037823?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=2XPBZ0Z4015)). Se sintetizó la secuencia de codificación de *GLlac1* de 1497 pb (SEQ ID NO: 28) que codifica una lacasa *GLlac1* (SEQ ID NO: 29) por DNA 2.0 (Menlo Park, EE.UU.), se ligó la secuencia de codificación sintética en el plásmido pJ912 y se clonó en DH5α de *E. coli*. Se linealizó el plásmido purificado pJ912 por digestión con la enzima *MssI* y se transformó entonces en células competentes de *P. pastoris* por electroporación (Bio-Rad Genepulser, Hercules, EE.UU.). Se impulsó la expresión inducida por metanol de la secuencia de codificación de *GLlac1* sintética en el hospedador *P. pastoris* transformado por el promotor AOX1. Después de electroporación, se sembraron células de *P. pastoris* en placas de YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 0,4 % de dextrosa, 2 % de agar) que contenían zeocina (100 µg·ml⁻¹) y se cribaron los transformantes positivos en placas de agar indicadoras con agar BMM (tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, de base nitrogenada de levadura 3,4 g·l⁻¹ sin aminoácidos, 400 µg·l⁻¹ de biotina, 0,5 % de metanol y 2 % de agar) que contenían ABTS 0,2 mM y CuSO₄ 0,1 mM a 30 °C durante 96 h.

11.2 Producción de lacasa GLlac1 de *G. lucidum* recombinante en *P. pastoris*

Se usó un fermentador Sartorius (BIOSTAT® Aplus) (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) con un volumen total de 4 l para fermentaciones alimentadas por lotes a 25 °C siguiendo las "Pichia Fermentation Process Guidelines" de Invitrogen con ligeras modificaciones. Se suplementó el medio salino basal con CuSO₄ 0,1 mM y sales de oligometales de *Pichia* (PTM1). Se inoculó la fermentación por lotes (2,5 l de volumen de partida) con 200 ml de precultivo de 33 de *P. pastoris* recombinante que comprende la secuencia de codificación de *GLlac1* en medio de matraz agitado de Invitrogen. Se mantuvo el flujo de aire constante a 4 l·min⁻¹ y se fijó la velocidad de agitador a un máximo de 800 rpm. Se mantuvo el pH a 5,0 con NH₄OH, se fijó la DO al 25 % de saturación y se controló agitando

y por enriquecimiento de gas usando oxígeno puro. Después del agotamiento del glicerol en el medio del lote, se inició la fase alimentada por lotes con una alimentación constante de 100 ml de glicerol al 50 % que contenía 12 ml·l⁻¹ de PTM1 a 0.6 ml·h⁻¹. Después de la fase alimentada por lotes de glicerol, se añadió un pulso de 4 ml de metanol que contenía 12 ml·l⁻¹ de sales PTM1 para inducción rápida. Después de ello, se aceleró gradualmente la tasa de alimentación de metanol a 0,41 ml·h⁻¹ disminuyendo la temperatura a 20 °C. Se tomaron muestras de recolección para la medida de la actividad lacasa y del contenido de proteína soluble total. Se inyectó antiespumante manualmente según se requiriera a lo largo de la fermentación.

Se centrifugó el caldo de fermentación de *P. pastoris* recombinante a 5300 x g a 5 °C durante 1 h, se esterilizó entonces por filtración el sobrenadante que contenía proteínas extracelulares totales y se concentraron las proteínas por ultrafiltración como se describe por Silva *et al.* (Silva *et al.*, 2011). Se almacenaron las alícuotas enzimáticas que contenían 25 % (p/v) de glicerol a -80 °C.

Se detectó la actividad lacasa de GLlac1 entre las proteínas extracelulares expresadas por *P. pastoris* recombinante. La lacasa GLlac1 madura expresada y secretada corresponde a los residuos aminoacídicos 22-520 de SEQ ID NO: 28, de la que se ha retirado el péptido señal.

15 **Ejemplo 12. Las lacasas LacGL1 y GLlac1 de Ganoderma lucidum proporcionan una potenciación significativamente mayor de la hidrólisis de biomasa mediada por celulosa en comparación con otras lacasas microbianas usadas en la industria de la biomasa**

Se comparó la capacidad de las lacasas LacGL1 y GLlac1 (Q9HG17) de *G. lucidum* de potenciar la hidrólisis mediada por celulosa de biomasa lignocelulósica con las lacasas fúngicas comerciales ampliamente usadas de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. Se ensayaron las enzimas en tres formas diferentes de biomasa.

12.1 Hidrólisis de biomasa mediada por una celulosa con y sin una lacasa seleccionada

Se adquirieron las lacasas fúngicas comerciales en forma de muestras de proteína liofilizada en Sigma Aldrich. Se preparó una solución de cada una de las 5 lacasas anteriores en tampón cítrico que contiene 20 % de glicerol (pH 5,1, 100 mM). Se midió la actividad lacasa de cada lacasa con ABTS (sal de diazonio del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) como sustrato a 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) para asegurar que se usaban cantidades comparables de enzima en las pruebas comparativas.

Eran dos preparaciones de enzima celulasa disponibles comercialmente diferentes usadas en el estudio comparativo "Celulosa 1" y "Celulosa 2", que se ensayaron en combinación con cada una de la lacasas enumeradas anteriormente.

Los tres tipos diferentes de biomasa pretratada usados en el estudio comparativo eran bagazo de caña de azúcar, paja de cebada y paja de trigo. La fuente y el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar por explosión por vapor fueron como se expone en el Ejemplo 9. La paja de cebada y paja de trigo usadas se cultivaron y recolectaron en Dinamarca, y se sometieron entonces a un procedimiento de pretratamiento de tres etapas, que comprende un triple tratamiento de calentamiento de la paja (balas enteras) que implica: calentar la paja que tiene aproximadamente un 16 % de materia seca a 60 °C durante 15 min; retirar entonces los líquidos del producto por calentamiento a 180 °C durante 10 min, seguido de calentamiento a 195 °C durante 3 min (como se describe en Rosgaard *et al.*, 2007). Se determinaron la composición de la biomasa seca y pretratada según los procedimientos del US National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter *et al.*, 2010).

Se efectuó la hidrólisis catalizada por lacasa-celulosa de las muestras de biomasa pretratadas para liberar glucosa como sigue: se ensayó la hidrólisis de muestras al 5 % (p/v) de biomasa de bagazo de caña de azúcar pretratado, paja de cebada y paja de trigo usando una relación de enzima/sustrato (E/S) de 0,064 % p/p para lacasas y de 0,4 % p/p para cada preparación de celulosa comercial en cada reacción de hidrólisis. La dosificación de E/S se basaba en la concentración de proteína total usada, como se determina usando el procedimiento en microplaca del kit de ensayo de proteína por BCA (ácido bicinconínico) de Pierce según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EE.UU.).

Se incubaron muestras de hidrólisis por triplicado durante 30 horas a pH 5,1 (100 mM) a 50 °C en un termomezclador ajustado a 800 rpm. Se recogieron las muestras después de 0, 1, 3, 5, 24 y 30 horas y se terminó la reacción de hidrólisis por incubación a 99 °C durante 15 min. Se centrifugaron entonces las muestras a 10.000 rpm durante 2 minutos, se retiraron los sobrenadantes y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm. Se determinó espectrofotométricamente la cantidad de glucosa liberada en el filtrado usando un reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa cromogénico (GOPOD) (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Irlanda). Los rendimientos de glucosa liberada con el tiempo se corrigieron por la cantidad de glucosa presente en la muestra de hidrólisis a tiempo 0. Se dan los datos como medias de duplicados por triplicado \pm desviación estándar.

12.2 Las lacasas LacGL1 y GLlac1 potencian significativamente la hidrólisis mediada por celulosa de un intervalo de biomasa pretratadas

Se muestra gráficamente en las Figuras 13, 14 y 15 la hidrólisis mediada por lacasa y celulasa de 3 formas de biomasa, medidas como liberación de glucosa. Se sometió a análisis estadístico la eficacia de las diferentes combinaciones enzimáticas para potenciar la liberación de glucosa para las 3 muestras de biomasa en el punto temporal de 30 h.

- 5 Bagazo de caña de azúcar: La liberación de glucosa por combinación de LacGL1 o GLlac1 con celulasa (celulasa 1 o 2) era la misma, y estaba significativamente potenciada en comparación con una combinación de cualquiera de las otras lacasas ensayadas con las dos celulastas ($p < 0,05$).

- 10 Paja de cebada: La glucosa liberada por LacGL1 era significativamente mayor que por GLlac1 cuando se combinaba con celulasa (celulasa 1 o 2) ($p < 0,05$); mientras que tanto LacGL1 como GLlac1 daban una liberación de glucosa significativamente potenciada en comparación con una combinación de cualquiera de las otras lacasas ensayadas con las dos celulastas ($p < 0,05$).

Paja de trigo: La liberación de glucosa por una combinación de LacGL1 o GLlac1 con celulasa (celulasa 1 o 2) era la misma, pero estaba significativamente potenciada en comparación con una combinación de cualquiera de las otras lacasas ensayadas con las dos celulastas ($p < 0,05$).

15 Referencias citadas:

- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh L-SL. (2004) "UniProt: the Universal Protein knowledgebase". *Nucleic Acid Res.*; 32: D115- D119.
- 20 Bendtsen JD, Nielsen G, von Heijne G, Brunak S (2004) "Improved prediction of signal peptides: SignalP3.0". *J. Mol. Biol* 340: 783-795.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. (2004) "Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from amino acid sequence". *Proteomics* 4: 1633-1649.
- Bourbonnais R, Paice MG. (1992) "Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)". *Appl Microbiol Biotechnol.* 36: 823-827.
- 25 Brake AJ, Julius DJ, Thorner J (1983) "A functional prepro-alpha-factor gene from *Saccharomyces cerevisiae* can contain 3, 4, or 5 repeats of the mature pheromone sequence". *Mol Cell Biol* 3: 1440-1450.
- Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, Arnold FH. (2003) "Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution". *Appl Environ Microbiol.*; 69(2): 987-995.
- 30 Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kudah RC (2007) "Detoxification of sugar cane bagasse hydrolysates improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501". *Biores Technol* 98: 1947-1950.
- Garzillo AMV, Colao MC, Caruso C, Caporale C, Celletti D, Buonocore V. (1998) "Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*". *Appl Microbiol Biotechnol.*; 49: 545-551.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) "Protein identification and analysis tool on the ExPASyserver". pág. 571-607, en J. M. Walker (ed.), "The Proteomics Protocols Handbook". Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- 35 Gouet P, Coufcelle E, Stuart DI, Métoz F (1999) "ESPrnt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript". *Bioinformatics* 15: 305-8
- Goujon M, McWilliam H, Weizhong L, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI". *Nucl Acid Res* W695- W9.
- 40 Harkin JM, Larsen MJ, Obst JR. (1974) "Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi". *Mycologia*; 66(3): 469-476.
- Harris PV, Weiner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Leggio LL (2010) "Stimulation of lignocellulosic hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of large, enigmatic family". *Biochem* 49: 3305-3316.
- 45 Hoopes J, Dean JFD. (2001) "Staining electrophoretic gels for laccase and peroxidase activity using 1,8-Diaminonaphthalene". *Anal Biochem.*; 293: 96-101.
- Joo SS, Ryu IW, Park J-K, Yoo YM, Lee D-H, Hwang KW, Coi H-T, Lim C-J, Kim K (2007) "Molecular cloning and expression of laccase from *Ganoderma lucidum*, and its antioxidative properties". *Mol Cells* 25(1): 112-118.
- Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá Á, Martínez Á, Martínez MJ (2009) "Laccase detoxification of steam-exploded

- wheat straw for second generation bioethanol". Bioresource Technology 100: 6378-6384.
- Ko E-M, Leem Y-E, Choi HT. (2001) "Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*". Appl Microbiol Biotechnol; 57: 98-102.
- 5 Kumar SVS, Phale PS, Durani S, Wangikar PP (2003) "Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family". Biotechnol Bioeng 83: 386-94.
- Lee SB, Taylor JW (1990) "Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR protocols: A guide to methods and applications" 282-287.
- Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L (2011) "The laccase-catalysed modification of lignin for enzymatic hydrolysis". Enzyme and Microbiol Technology 49: 492-498.
- 10 Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Eng 10: 1-6.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia A. (1997) "A novel laccase from *Pleurotus ostreatus*". J Biol Chem; 272(50): 31301-31307.
- 15 Palonen H, Viikari L (2004) "Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood". Biotechnol Bioengin 86(5): 550-557.
- PIONTEK, K.; ANTORI NI, M. y CHOINOWSKI, T. (2002). "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers". The Journal of Biological Chemistry, vol. 277, n° 40, pág. 37663-37669
- 20 Rosgaard L, Pedersen S, Meyer AS. "Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw". Appl Biochem Biotechnol (2007) 143: 284-296.
- Ryde JP. (1980) "The effect of induced lignifications on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation". Phys. Plant Pathology; 16: 187-196.
- Ryu S-H, Lee A-V, Kim M (2008) "Molecular characterization of two laccase from the basidiomycete fungus *Polyporus brumalis*". J. Microbiol 46(1): 62-69.
- 25 Schiøt M, Rogowska-Wrzęsinska A, Roepstorff P, Boomsma JJ. (2010) "Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complex reminiscent of phytopathogenic fungi". BMC Biol; 156: 1-12.
- Silva IR, Larsen OM, Meyer AS, Mikkelsen JO (2011) "Identification, expression, and characterization of a novel bacterial RGI lyase enzyme for the production of bio-functional fibers". Enz Microb Technol 49: 160-6.
- 30 Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton O, Crocker P. "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure (LAP)", NREL/TP-510-42618, 2011: 1-15; revisado en junio de 2010.
- Soden DM, O'Callaghan J, Dobson ADW. (2002) "Molecular cloning of laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host". Microbiol; 148: 4003-4014.
- 35 Stanke M, Morgenstern B (2005) "AUGUSUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows a user-defined constraints". Nuc Acid Res 33: W465-W467.
- Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M (1999) "High-well density fermentation". En: Higgins D, Cregg J, editores. "Pichia protocols", vol. 103. Totowa, NJ., EE.UU.: Humana Press pág. 109-20.
- Sørensen A, Teller PJ, Hilstrøm T, Ahring BK (2008) "Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with explosion pre-treatment and enzymatic treatment. Biores Technol 99(14): 6602-6607.
- 40 Sørensen HR, Meyer AS, Pedersen S., (2003) "Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. I. Synergy between α -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- β -xylanase, and β -xylosidase activities". Biotechnol Bioeng 81: 726-731.
- Thaysen-Andersen M, Mysling S, Højrup P., (2009) "Site-specific glycoprofiling of N-linked glycopeptides using MALDI-TOF MS: Strong correlation between signal strength and glycoform quantities". Anal Chem; 81: 3933-3943.
- 45 Ters T, Kuncinger T, Srebotnik E., (2009) "Carboxylic acids used in common buffer systems inhibit the activity of fungal laccases". J Mol Cat B:Enz 61: 261-267.
- Thurston CF., (1994) "The structure and function of fungal laccases". Microbiol 140: 19-26.

- Sun J, Peng RH, Xiong A-S, Tian Y, Zhao W, Xu H, Liu D-T, Chen J-M, Yao Q-H (2012) "Secretory expression and characterization of a soluble laccase from the *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 in *Pichia pastoris*". Mol. Biol Rep 39: 3807-3814
- 5 Wang HX y Ng TB (2006) "A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*". Appl. Microbiol Biotechnol 72: 508-513
- Wolfenden BS, Willson RL. (1982) "Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)". J Chem Soc Perkin Trans.; II: 805-812.
- 10 Xu F, Shin W, Brown SH, Wahlethner JA, Sundaram UM, Solomon EI. (1996) "A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability". Biochimica et Biophysica Acta.; 1292: 303-311.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Technical University of Denmark
- 5 <120> Una lacasa novedosa de *Ganoderma lucidum* capaz de potenciar la degradación enzimática de biomasa lignocelulolítica
- <130> P1337EP00
- <160> 29
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 24
- 15 <212> PRT
<213> Ganoderma lucidum
- <220>
<221> PEPTIDO
20 <222> (1)..(24)
<223> Péptido R1 de lacasa LacGL1
- <400> 1
His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro
1 5 10 15
- Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile
20
- 25 <210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Ganoderma lucidum
- 30 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(22)
<223> Péptido R2 de lacasa LacGL1
- 35 <400> 2
Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly
1 5 10 15
- Leu Arg Gly Pro Phe Val
20
- 40 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Ganoderma lucidum
- <220>
45 <221> PEPTIDO
<222> (1)..(8)
<223> Péptido R3 de lacasa LacGL1
- <400> 3
His Pro Phe His Leu His Gly His
50 1 5
- <210> 4
<211> 22
<212> PRT

<213> Ganoderma lucidum

<220>
 <221> PEPTIDO
 5 <222> (1)..(22)
 <223> Péptido R4 de lacasa LacGL1

<400> 4
 Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Val Val Phe Ala
 20

10 <210> 5
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Ganoderma lucidum

15 <220>
 <221> mat_péptido
 <222> (1)..(499)
 <223> Lacasa LacGL1 madura (carga negativa del péptido señal)

20 <400> 5
 Gly Ile Gly Pro Lys Thr Asp Leu Thr Ile Ser Asn Ala Asp Val Ala
 1 5 10 15

Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val Asn Gly Val Phe Pro
 20 25 30

Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val
 35 40 45

Ile Asp Gln Met Thr Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His
 50 55 60

Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala
 65 70 75 80

ES 2 643 242 T3

Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ser Ser Gly His Ser Phe Leu Tyr Asp
 85 90 95
 Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu
 100 105 110
 Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Phe Val Val Tyr Asp
 115 120 125
 Pro Lys Asp Pro Leu Lys Lys Leu Tyr Asp Ile Asp Asp Asp Ser Thr
 130 135 140
 Val Ile Thr Leu Thr Asp Trp Tyr His Val Ala Ala Arg Leu Gly Pro
 145 150 155 160
 Arg Phe Pro Leu Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg
 165 170 175
 Ser Thr Thr Asn Val Thr Ala Asp Leu Ala Val Ile Asn Val Thr Gln
 180 185 190
 Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn
 195 200 205
 Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Asp His Asn Met Thr Val Ile Glu Ala Asp
 210 215 220
 Gly Ile Glu Thr Gln Pro Val Thr Val Asn Ala Ile Gln Ile Phe Ser
 225 230 235 240
 Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Thr Ala Asn Gln Thr Ile Asp Asn
 245 250 255
 Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Asn Phe Gly Asn Val Gly Phe Thr Asp
 260 265 270
 Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Ala Gly Ala Asp Pro Val Glu
 275 280 285
 Pro Thr Thr Ser Gln Gln Thr Thr Gln Asn Leu Leu Asn Glu Val Asp
 290 295 300
 Leu His Pro Phe Val Pro Lys Arg Thr Pro Gly Gln Pro Thr Gln Gly
 305 310 315 320
 Gly Val Asp Thr Ala Ile Asn Met Val Phe Asn Phe Asn Gly Ser Asn
 325 330 335

ES 2 643 242 T3

Phe Phe Ile Asn Asn Ala Ser Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val Leu
 340 345 350

Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser
 355 360 365

Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Val Asn Lys Ser Ile Glu Leu Thr Phe
 370 375 380

Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His
 385 390 395 400

Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly Ser Thr Val Tyr Asn
 405 410 415

Tyr Asp Asn Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser Thr Gly Thr Pro Ala
 420 425 430

Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr Asp Asn Pro Gly Pro
 435 440 445

Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala
 450 455 460

Val Val Phe Ala Glu Asp Pro Thr Asp Thr Ser Leu Ala Asn Pro Val
 465 470 475 480

Pro Lys Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Val
 485 490 495

Asp Asp Gln

<210> 6
 <211> 2093
 5 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum

<220>
 <221> gene
 10 <222> (1)..(2093)
 <223> gen LacGL1

<220>
 <221> exon
 15 <222> (1)..(183)

<220>
 <221> Intron
 20 <222> (184)..(250)
 <223> Intron 1

<220>
 <221> exon
 25 <222> (251)..(319)

<220>
 <221> Intron
 <222> (320)..(369)
 <223> Intron 2

<220>
 <221> exon
 <222> (370)..(490)
 5
 <220>
 <221> Intron
 <222> (491)..(547)
 <223> Intron 3
 10
 <220>
 <221> exon
 <222> (548)..(661)
 15
 <220>
 <221> Intron
 <222> (662)..(722)
 <223> Intron 4
 20
 <220>
 <221> exon
 <222> (723)..(786)
 25
 <220>
 <221> Intron
 <222> (787)..(862)
 <223> Intron 5
 30
 <220>
 <221> exon
 <222> (863)..(958)
 35
 <220>
 <221> Intron
 <222> (959)..(1009)
 <223> Intron 6
 40
 <220>
 <221> exon
 <222> (1010)..(1166)
 45
 <220>
 <221> Intron
 <222> (1167)..(1218)
 <223> Intron 7
 50
 <220>
 <221> exon
 <222> (1219)..(1416)
 55
 <220>
 <221> Intron
 <222> (1417)..(1476)
 <223> Intron 8
 60
 <220>
 <221> exon
 <222> (1477)..(1740)
 65
 <220>
 <221> Intron
 <222> (1741)..(1796)
 <223> Intron 9
 70
 <220>
 <221> exon

ES 2 643 242 T3

<222> (1797)..(2093)

<400> 6

atg gcg aag ttc caa tcg ttg ctc tcc tgc gtt acc ctc ctt ttc gcc	48
Met Ala Lys Phe Gln Ser Leu Leu Ser Cys Val Thr Leu Leu Phe Ala	
1 5 10 15	
gcc tcc gcc tat gcg ggc atc ggt ccc aag acc gac ctc acc att tcc	96
Ala Ser Ala Tyr Ala Gly Ile Gly Pro Lys Thr Asp Leu Thr Ile Ser	
20 25 30	
aat gcg gac gtc gcc ccc gat ggc tat act cgt gct gcc gtt gtg gtc	144
Asn Ala Asp Val Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val	
35 40 45	
aac ggt gtc ttc cct gcc ccg ctc att aca ggg aat aag gtgggcggcg	193
Asn Gly Val Phe Pro Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys	
50 55 60	
tatcgccacc cttttcccta agatgtccac taacatgccg gccatactgt tcaccag	250
gga gac cgc ttc cag ctc aat gtc att gac caa atg acg aac cac acg	298
Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Met Thr Asn His Thr	
65 70 75	
atg ctg aag agc acc agc att gtacgctgtc ttcgattgct aaatcaatgt	349
Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile	
80	
ctcactcatt atttttccag cat tgg cat gcc ttt ttc cag aag ggc acg aac	402
His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn	
85 90 95	
tgg gct gac gga ccc gcc ttc atc aac cag tgt cca att tct agc ggg	450
Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ser Ser Gly	
100 105 110	
cac tct ttc ctc tac gat ttc cag gtc ccg gac cag gcc g gtaagctata	500
His Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala	
115 120	
tcattggtgg tgtgtgttac gctcgggtac tcacgccggt cgtgtag gc acc ttt	555
Gly Thr Phe	
125	
tgg tac cac agc cac ctc tct aca cag tac tgc gat ggt ctc aga gga	603
Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly	
130 135 140	
cca ttt gtg gta tat gat ccg aag gat ccc ctc aag aag ctc tac gac	651

5

ES 2 643 242 T3

Pro Phe Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro Leu Lys Lys Leu Tyr Asp 145 150 155	
atc gat gac g gtcagttctt actgtcatta ctactgcaac tttgggtttg Ile Asp Asp 160	701
tctgacgtct atttcacata g ac tcg acc gtg atc acc ctt acc gac tgg Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Thr Asp Trp 165 170	751
tat cac gtt gct gcc agg ctt gga ccg cgc ttc cc gtgagtatct Tyr His Val Ala Ala Arg Leu Gly Pro Arg Phe Pro 175 180	796
taccgctggc gcccatcgac gttcttctca cgaagaatat caatgctaata tcgacatggg	856
atgtag t ctc ggg tcg gac tcg act ctc att aac ggc ctt ggc cgt agc Leu Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser 185 190 195	905
act acc aac gtc acg gct gac ctt gcc gtc ata aat gtc acg cag ggc Thr Thr Asn Val Thr Ala Asp Leu Ala Val Ile Asn Val Thr Gln Gly 200 205 210	953
aaa cg gtatatgcac tctcgacgtt aatgcaagag gatgctcact tctttaata g Lys Arg 215	1009
c tac cgc ttc cgc ctt gtg tcc ttg tca tgc gac ccc aac tac act ttc Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe 220 225 230	1058
agc atc gac gac cat aac atg acc gtt ata gag gcg gat ggg att gaa Ser Ile Asp Asp His Asn Met Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Ile Glu 235 240 245	1106
act cag ccc gtg acc gtt aac gcc att cag att ttc tcc gct caa cgc Thr Gln Pro Val Thr Val Asn Ala Ile Gln Ile Phe Ser Ala Gln Arg 250 255 260	1154
tat tct ttc gtg gtaagtaatc ctcgctccgct ttttgacgct gaagctaaat Tyr Ser Phe Val 265	1206
ggtctcttct ag cta act gca aac cag acg att gac aac tac tgg atc cgt Leu Thr Ala Asn Gln Thr Ile Asp Asn Tyr Trp Ile Arg 270 275 280	1257
gcc aac ccg aac ttt ggt aac gtt ggt ttc acg gat gga atc aac tct Ala Asn Pro Asn Phe Gly Asn Val Gly Phe Thr Asp Gly Ile Asn Ser 285 290 295	1305
gcc atc ctg cgc tac gcg gga gcg gac ccc gtc gag cca acg aca tcc Ala Ile Leu Arg Tyr Ala Gly Ala Asp Pro Val Glu Pro Thr Thr Ser 300 305 310	1353
caa caa acg aca cag aac ctg ctt aat gag gtc gac ctc cac ccc ttt Gln Gln Thr Thr Gln Asn Leu Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Phe 315 320 325	1401
gtc ccc aaa cgc acg gtacgtgata cgttcaatgc atgaacaat gttcaatact Val Pro Lys Arg Thr	1456

ES 2 643 242 T3

330

tatgacatct ctttctccag cct ggc cag cct acg cag ggt ggt gtc gat acg	1509
Pro Gly Gln Pro Thr Gln Gly Gly Val Asp Thr	
335 340 345	
gcc atc aac atg gtc ttc aac ttc aac ggc tcg aat ttc ttc atc aac	1557
Ala Ile Asn Met Val Phe Asn Phe Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn	
350 355 360	
aac gca tcc ttt gta cct ccc act gtt ccc gtc ctc ctc cag att ttg	1605
Asn Ala Ser Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu	
365 370 375	
agt ggg gcg cag gct gcc cag gat ctc ttg cca tct gga agc gtc tac	1653
Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr	
380 385 390	
aca ctg ccg gtc aac aag tct atc gag ctc acc ttc ccc gca acg gcc	1701
Thr Leu Pro Val Asn Lys Ser Ile Glu Leu Thr Phe Pro Ala Thr Ala	
395 400 405	
aac gct cct gga gct ccc cat ccc ttc cac ttg cac ggt gtaagtccac	1750
Asn Ala Pro Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His Gly	
410 415 420	
cacacatcta ttgcacacca cacactcacc tcttctcccc ccacag cac gcc ttc	1805
His Ala Phe	
425	
gct gtg gtc cgc agc gca ggt tcc acc gtg tac aac tat gac aac cct	1853
Ala Val Val Arg Ser Ala Gly Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro	
430 435 440	
gtc tgg cgg gac gtc gtc tcc acg ggc acc ccc gcc gcg ggc gac aac	1901
Val Trp Arg Asp Val Val Ser Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn	
445 450 455	
gtc acg atc cgc ttc cag acc gac aac ccc ggt ccg tgg ttc ctc cac	1949
Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His	
460 465 470	
tgc cac atc gac ttc cac ctc gag gcc ggc ttc gcc gtc gtg ttc gcc	1997
Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Phe Ala	
475 480 485	
gaa gac ccc acc gac acc tcc cta gca aac cct gtg ccg aag gcg tgg	2045
Glu Asp Pro Thr Asp Thr Ser Leu Ala Asn Pro Val Pro Lys Ala Trp	
490 495 500 505	
tcg gat ctc tgc ccg acg tac gac gcg ctc tcg gtc gat gat caa tga	2093
Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Val Asp Asp Gln	
510 515 520	

<210> 7

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> PEPTIDO

10 <222> (1)..(9)

<223> factor alfa de acoplamiento de pre pro péptido

<400> 7

Met Arg Ile Arg His Arg Ser Gln Asp

1

5

15

<210> 8

<211> 1563

ES 2 643 242 T3

<212> DNA
 <213> Ganoderma lucidum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1563)
 <223> LacGL1 cADN

5

<400> 8
 atg gcg aag ttc caa tcg ttg ctc tcc tgc gtt acc ctc ctt ttc gcc 48
 Met Ala Lys Phe Gln Ser Leu Leu Ser Cys Val Thr Leu Leu Phe Ala
 1 5 10 15

 gcc tcc gcc tat gcg ggc atc ggt ccc aag acc gac ctc acc att tcc 96
 Ala Ser Ala Tyr Ala Gly Ile Gly Pro Lys Thr Asp Leu Thr Ile Ser
 20 25 30

 aat gcg gac gtc gcc ccc gat ggc tat act cgt gct gcc gtt gtg gtc 144
 Asn Ala Asp Val Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val
 35 40 45

 aac ggt gtc ttc cct gcc ccg ctc att aca ggg aat aag gga gac cgc 192
 Asn Gly Val Phe Pro Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg
 50 55 60

 ttc cag ctc aat gtc att gac caa atg acg aac cac acg atg ctg aag 240
 Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Met Thr Asn His Thr Met Leu Lys
 65 70 75 80

 agc acc agc att cat tgg cat ggc ttt ttc cag aag ggc acg aac tgg 288
 Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp
 85 90 95

 gct gac gga ccc gcc ttc atc aac cag tgt cca att tct agc ggg cac 336
 Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ser Ser Gly His
 100 105 110

 tct ttc ctc tac gat ttc cag gtc ccg gac cag gcc ggc acc ttt tgg 384
 Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp
 115 120 125

 tac cac agc cac ctc tct aca cag tac tgc gat ggt ctc aga gga cca 432
 Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140

 ttt gtg gta tat gat ccg aag gat ccc ctc aag aag ctc tac gac atc 480
 Phe Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro Leu Lys Lys Leu Tyr Asp Ile
 145 150 155 160

 gat gac gac tcg acc gtg atc acc ctt acc gac tgg tat cac gtt gct 528
 Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Thr Asp Trp Tyr His Val Ala

10

ES 2 643 242 T3

165										170					175					
gcc	agg	ctt	gga	ccg	cgc	ttc	cct	ctc	ggg	tcg	gac	tcg	act	ctc	att	576				
Ala	Arg	Leu	Gly	Pro	Arg	Phe	Pro	Leu	Gly	Ser	Asp	Ser	Thr	Leu	Ile					
			180						185					190						
aac	ggc	ctt	ggc	cgt	agc	act	acc	aac	gtc	acg	gct	gac	ctt	gcc	gtc	624				
Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Thr	Thr	Asn	Val	Thr	Ala	Asp	Leu	Ala	Val					
		195					200					205								
ata	aat	gtc	acg	cag	ggc	aaa	cgc	tac	cgc	ttc	cgc	ctt	gtg	tcc	ttg	672				
Ile	Asn	Val	Thr	Gln	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Phe	Arg	Leu	Val	Ser	Leu					
	210					215						220								
tca	tgc	gac	ccc	aac	tac	act	ttc	agc	atc	gac	gac	cat	aac	atg	acc	720				
Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ile	Asp	Asp	His	Asn	Met	Thr					
	225				230					235					240					
gtt	ata	gag	gcg	gat	ggg	att	gaa	act	cag	ccc	gtg	acc	gtt	aac	gcc	768				
Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly	Ile	Glu	Thr	Gln	Pro	Val	Thr	Val	Asn	Ala					
			245						250					255						
att	cag	att	ttc	tcc	gct	caa	cgc	tat	tct	ttc	gtg	cta	act	gca	aac	816				
Ile	Gln	Ile	Phe	Ser	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe	Val	Leu	Thr	Ala	Asn					
			260					265					270							
cag	acg	att	gac	aac	tac	tgg	atc	cgt	gcc	aac	ccg	aac	ttt	ggt	aac	864				
Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Asn	Pro	Asn	Phe	Gly	Asn					
		275					280						285							
gtt	ggt	ttc	acg	gat	gga	atc	aac	tct	gcc	atc	ctg	cgc	tac	gcg	gga	912				
Val	Gly	Phe	Thr	Asp	Gly	Ile	Asn	Ser	Ala	Ile	Leu	Arg	Tyr	Ala	Gly					
	290					295					300									
gcg	gac	ccc	gtc	gag	cca	acg	aca	tcc	caa	caa	acg	aca	cag	aac	ctg	960				
Ala	Asp	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Ser	Gln	Thr	Thr	Gln	Asn	Leu						
	305				310					315					320					
ctt	aat	gag	gtc	gac	ctc	cac	ccc	ttt	gtc	ccc	aaa	cgc	acg	cct	ggc	1008				
Leu	Asn	Glu	Val	Asp	Leu	His	Pro	Phe	Val	Pro	Lys	Arg	Thr	Pro	Gly					
				325					330					335						
cag	cct	acg	cag	ggt	ggt	gtc	gat	acg	gcc	atc	aac	atg	gtc	ttc	aac	1056				
Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Gly	Val	Asp	Thr	Ala	Ile	Asn	Met	Val	Phe	Asn					
			340					345					350							
ttc	aac	ggc	tcg	aat	ttc	ttc	atc	aac	aac	gca	tcc	ttt	gta	cct	ccc	1104				
Phe	Asn	Gly	Ser	Asn	Phe	Phe	Ile	Asn	Asn	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Pro					
		355					360					365								
act	gtt	ccc	gtc	ctc	ctc	cag	att	ttg	agt	ggg	gcg	cag	gct	gcc	cag	1152				
Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Ala	Ala	Gln					
	370					375					380									
gat	ctc	ttg	cca	tct	gga	agc	gtc	tac	aca	ctg	ccg	gtc	aac	aag	tct	1200				
Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Val	Asn	Lys	Ser					
	385				390					395					400					
atc	gag	ctc	acc	ttc	ccc	gca	acg	gcc	aac	gct	cct	gga	gct	ccc	cat	1248				
Ile	Glu	Leu	Thr	Phe	Pro	Ala	Thr	Ala	Asn	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	His					
				405					410					415						
ccc	ttc	cac	ttg	cac	ggt	cac	gcc	ttc	gct	gtg	gtc	cgc	agc	gca	ggt	1296				

ES 2 643 242 T3

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430

tcc acc gtg tac aac tat gac aac cct gtc tgg cgg gac gtc gtc tcc 1344
 Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445

acg ggc acc ccc gcc gcg ggc gac aac gtc acg atc cgc ttc cag acc 1392
 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr
 450 455 460

gac aac ccc ggt ccg tgg ttc ctc cac tgc cac atc gac ttc cac ctc 1440
 Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
 465 470 475 480

gag gcc ggc ttc gcc gtc gtg ttc gcc gaa gac ccc acc gac acc tcc 1488
 Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Phe Ala Glu Asp Pro Thr Asp Thr Ser
 485 490 495

cta gca aac cct gtg ccg aag gcg tgg tcg gat ctc tgc ccg acg tac 1536
 Leu Ala Asn Pro Val Pro Lys Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr
 500 505 510

gac gcg ctc tcg gtc gat gat caa tga 1563
 Asp Ala Leu Ser Val Asp Asp Gln
 515 520

<210> 9
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Ganoderma lucidum

5

<400> 9
 Met Ala Lys Phe Gln Ser Leu Leu Ser Cys Val Thr Leu Leu Phe Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Tyr Ala Gly Ile Gly Pro Lys Thr Asp Leu Thr Ile Ser
 20 25 30

Asn Ala Asp Val Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val
 35 40 45

Asn Gly Val Phe Pro Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg
 50 55 60

Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Met Thr Asn His Thr Met Leu Lys
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp
 85 90 95

Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ser Ser Gly His
 100 105 110

10

ES 2 643 242 T3

Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp
 115 120 125

Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140

Phe Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro Leu Lys Lys Leu Tyr Asp Ile
 145 150 155 160

Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Thr Asp Trp Tyr His Val Ala
 165 170 175

Ala Arg Leu Gly Pro Arg Phe Pro Leu Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile
 180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Ser Thr Thr Asn Val Thr Ala Asp Leu Ala Val
 195 200 205

Ile Asn Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
 210 215 220

Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Asp His Asn Met Thr
 225 230 235 240

Val Ile Glu Ala Asp Gly Ile Glu Thr Gln Pro Val Thr Val Asn Ala
 245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ser Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Thr Ala Asn
 260 265 270

Gln Thr Ile Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Asn Phe Gly Asn
 275 280 285

Val Gly Phe Thr Asp Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Ala Gly
 290 295 300

Ala Asp Pro Val Glu Pro Thr Thr Ser Gln Gln Thr Thr Gln Asn Leu
 305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Phe Val Pro Lys Arg Thr Pro Gly
 325 330 335

Gln Pro Thr Gln Gly Gly Val Asp Thr Ala Ile Asn Met Val Phe Asn
 340 345 350

Phe Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn Asn Ala Ser Phe Val Pro Pro
 355 360 365

ES 2 643 242 T3

Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln
370 375 380

Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Val Asn Lys Ser
385 390 395 400

Ile Glu Leu Thr Phe Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Ala Pro His
405 410 415

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
420 425 430

Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser
435 440 445

Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr
450 455 460

Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
465 470 475 480

Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Phe Ala Glu Asp Pro Thr Asp Thr Ser
485 490 495

Leu Ala Asn Pro Val Pro Lys Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr
500 505 510

Asp Ala Leu Ser Val Asp Asp Gln
515 520

<210> 10

<211> 526

5 <212> PRT

<213> Ganoderma lucidum

<220>

<221> mat_péptido

10 <222> (1)..(526)

<223> LacGL1 Recombinante maduro

<400> 10

Gly Ile Gly Pro Lys Thr Asp Leu Thr Ile Ser Asn Ala Asp Val Ala
1 5 10 15

Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val Asn Gly Val Phe Pro
20 25 30

Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val

15

ES 2 643 242 T3

Pro Thr Thr Ser Gln Gln Thr Thr Gln Asn Leu Leu Asn Glu Val Asp
 290 295 300

Leu His Pro Phe Val Pro Lys Arg Thr Pro Gly Gln Pro Thr Gln Gly
 305 310 315 320

Gly Val Asp Thr Ala Ile Asn Met Val Phe Asn Phe Asn Gly Ser Asn
 325 330 335

Phe Phe Ile Asn Asn Ala Ser Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val Leu
 340 345 350

Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser
 355 360 365

Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Val Asn Lys Ser Ile Glu Leu Thr Phe
 370 375 380

Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His
 385 390 395 400

Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly Ser Thr Val Tyr Asn
 405 410 415

Tyr Asp Asn Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser Thr Gly Thr Pro Ala
 420 425 430

Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr Asp Asn Pro Gly Pro
 435 440 445

Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala
 450 455 460

Val Val Phe Ala Glu Asp Pro Thr Asp Thr Ser Leu Ala Asn Pro Val
 465 470 475 480

Pro Lys Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Val
 485 490 495

Asp Asp Gln Ala Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 500 505 510

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 515 520 525

<210> 11

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Ganoderma lucidum

<220>

<221> PEPTIDO

10 <222> (1)..(12)

<223> Residuos aminoacídicos 88-100 de péptido LacGL1

<400> 11

ES 2 643 242 T3

Thr Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 18
 5 <212> PRT
 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 <221> PEPTIDO
 10 <222> (1)..(18)
 <223> Residuos aminoacídicos 245-263 de péptido LacGL1
 <400> 12
 Asp Asp Asp Ser Thr Val Leu Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Arg
 15 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ganoderma lucidum
 20 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> Residuos aminoacídicos 452-466 de péptido LacGL1
 25 <400> 13
 Thr Leu Ser Asn Ala Asp Ile Ala Pro Asp Gly Phe Thr Arg
 1 5 10
 <210> 14
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 35 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <223> Residuos aminoacídicos 185-197 de péptido LacGL1
 <400> 14
 Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg
 40 1 5 10
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(18)
 50 <223> cebador WADGP_fwd3
 <400> 15
 ctgggcggat ggtccgc 18
 55 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum

<220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(20)
 <223> cebador LINGLP_rev1
 5
 <400> 16
 cggccaaggc cattgatgag 20
 <210> 17
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 15 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(23)
 <223> cebador QYCDGLR_fwd1
 <400> 17
 20 cagtactgcg acggtctaag agg 23
 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(23)
 30 <223> cebador YHSHLST_rev1
 <400> 18
 ggtggagaga tgactgtggt acc 23
 35 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 40 <220>
 <221> cebador_uniónADN
 <222> (1)..(23)
 <223> cebador IAPDGFT_fwd1
 45 <400> 19
 catcgctccc gatggcttca ctc 23
 <210> 20
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 <221> cebador_unión
 55 <222> (1)..(21)
 <223> cebador DLCTS_rev1
 <400> 20
 60 ctgacgtcgg gcaaagatcc g 21
 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 65 <220>

<221> cebador_unión
 <222> (1)..(25)
 <223> cebador SLANPVPK_rev
 5 <400> 21
 cttcggcaca gggtttgcta gggag 25
 <210> 22
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(24)
 <223> cebador QKGTNWAD_fwd
 15 <400> 22
 cagaagggca cgaactgggc tgac 24
 20 <210> 23
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 25 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(41)
 <223> cebador LSVDDQ_rev
 30 <400> 23
 tagcgcgcc gcctattatc attgatcatc gaccgagagc g 41
 <210> 24
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(32)
 <223> cebador MAKFQSL_fwd
 40 <400> 24
 atgcgaattc atggcgaagt tccaatcggt gc 32
 45 <210> 25
 <211> 28
 <212> ADN
 50 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(28)
 <223> cebador alpha-FACTOR_fwd
 55 <400> 25
 atgcgaattc ggcatcggtc ccaagacc 28
 60 <210> 26
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum
 65 <220>
 <221> cebador_unión

ES 2 643 242 T3

<222> (1)..(45)
 <223> Cebador universal - largo

<400> 26
 5 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Ganoderma lucidum

<220>
 <221> cebador_unión
 <222> (1)..(22)
 15 <223> Cebador universal - corto

<400> 27
 ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 28
 <211> 1563
 <212> ADN
 <213> Ganoderma lucidum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1563)
 <223> GLlac1 cADN que codifica el péptido señal (1-63bp) y polipéptido maduro (64-1560)

<400> 28
 30 atg gtg aaa ttc caa tcg ttg ctc tcc tgc gtc acc ctt ctt ttc gcc 48
 Met Val Lys Phe Gln Ser Leu Leu Ser Cys Val Thr Leu Leu Phe Ala
 1 5 10 15

gcc tca gcc cat gcg ggc att ggc ccc aag gcc gac ctt acc att tcc 96
 Ala Ser Ala His Ala Gly Ile Gly Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ile Ser
 20 25 30

aac gcg aac atc gcc cct gat ggc tac acc cgt gcc gcc gtt gtg gtg 144
 Asn Ala Asn Ile Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val
 35 40 45

aat ggt gtc ttc cct ggg ccg ctc atc aca ggg aac aag gga gac cgt 192
 Asn Gly Val Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg
 50 55 60

ttc cag ctg aat gtc atc gac caa ctg acg aac cac aca atg ctg aag 240
 Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Leu Thr Asn His Thr Met Leu Lys
 65 70 75 80

acc acc agc att cat tgg cat ggc ttt ttc cag aag ggc acg aac tgg 288
 Thr Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp
 85 90 95

gcg gat ggt ccc gcg ttc atc aac cag tgt ccg att gct agc ggg cac 336
 Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His
 100 105 110

tcg ttc ctc tac gat ttc cag gtt ccg gat cag gcc gcc act ttt tgg 384
 Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp
 115 120 125

tac cac agc cat ctc tcc acg cag tac tgt gac ggt ctc agg ggt cca 432
 Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140

ttc gtg gta tat gac cct aag gac ccc ctc aag gga ctg tac gac gtc 480
 Phe Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro Leu Lys Gly Leu Tyr Asp Val

ES 2 643 242 T3

145		150		155		160	
gac aac gac tcg act gtg atc acc ctc tcc gac tgg tat cac gtg gct							528
Asp Asn Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ser Asp Trp Tyr His Val Ala		165		170		175	
gcc agg ctt gga ccg agc ttc ccg ctc ggc tcg gac tcg act ctc atc							576
Ala Arg Leu Gly Pro Ser Phe Pro Leu Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile		180		185		190	
aat ggc ctt ggc cgt agc act acc aac gct acc gcc ggc ctc gct gtt							624
Asn Gly Leu Gly Arg Ser Thr Thr Asn Ala Thr Ala Gly Leu Ala Val		195		200		205	
atc aac gtc aca cag ggc aaa cgt tat cgc ttc cgc ctt gtg tcc ttg							672
Ile Asn Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu		210		215		220	
tca tgc gac ccc aac tac acc ttc agc atc gac ggc cat gac atg tcc							720
Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asp Met Ser		225		230		235	240
ggt att gag gcg gat ggt att gca acg caa ccc gtg acc gcg aac gct							768
Val Ile Glu Ala Asp Gly Ile Ala Thr Gln Pro Val Thr Ala Asn Ala		245		250		255	
att caa atc ttc tct gct caa cga tat tct ttc gtg ctg act gca aat							816
Ile Gln Ile Phe Ser Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Thr Ala Asn		260		265		270	
cag aca att ggc aac tat tgg att cgc gcc aac ccg agc ttt gga aat							864
Gln Thr Ile Gly Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ser Phe Gly Asn		275		280		285	
att ggt ttc acg aat gga atc aac tct gcc atc ctg cgc tac tcg gga							912
Ile Gly Phe Thr Asn Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Ser Gly		290		295		300	
gcg gat ccc atc gaa cct acg acg gcc caa caa acc aca cag aac ctc							960
Ala Asp Pro Ile Glu Pro Thr Thr Ala Gln Thr Thr Gln Asn Leu		305		310		315	320
ctc aat gag gtc gac ctc cac ccc ttt gtc gct aaa cag acg cct ggc							1008
Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Phe Val Ala Lys Gln Thr Pro Gly		325		330		335	
cgc gct aca cag ggt ggt acc gat gtg gcc atc aac atg gtc ttc aac							1056
Arg Ala Thr Gln Gly Gly Thr Asp Val Ala Ile Asn Met Val Phe Asn		340		345		350	
ttt aac ggc tcg aac ttc ttc atc aac aac gcg tcc ttc acg cct ccc							1104
Phe Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn Asn Ala Ser Phe Thr Pro Pro		355		360		365	
act gtc ccc gtc ctc ctt cag att ttg agc ggc gca cag gcc gcc cag							1152
Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln		370		375		380	
gac ctc ctg cct tcc gga agt gtc tac acg ctg ccg atc aac aag tcc							1200
Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Lys Ser		385		390		395	400
atc gag ctc acc ttc ccc gcc acg gtc aac gcc ccc ggg gct ccc cac							1248

ES 2 643 242 T3

Ile Glu Leu Thr Phe Pro Ala Thr Val Asn Ala Pro Gly Ala Pro His
 405 410 415

ccc ttc cac ctg cac ggt cat tcg ttc gct gtg gtc cgc agc gcc ggc 1296
 Pro Phe His Leu His Gly His Ser Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430

tcc aca gaa tac aac tat aac aat ccc gta tgg cgc gac gtc gtt tcg 1344
 Ser Thr Glu Tyr Asn Tyr Asn Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445

acc ggc acc cct gca gcg ggc gac aac gtc acg atc cgc ttc cag acc 1392
 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr
 450 455 460

gac aac ccc gga ccg tgg ttc ctc cat tgc cac atc gac ttc cat ctc 1440
 Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
 465 470 475 480

gag gcg ggc ttc gct gtc gtg ttc gcc gag gac acc gct gat act tct 1488
 Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Phe Ala Glu Asp Thr Ala Asp Thr Ser
 485 490 495

ctg gcg aac cat gtc cca caa gca tgg tcg gat ctt tgc ccg acg tac 1536
 Leu Ala Asn His Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr
 500 505 510

gat gcg ctc tcg gct gat gat cac tga 1563
 Asp Ala Leu Ser Ala Asp Asp His
 515 520

<210> 29
 <211> 520
 5 <212> PRT
 <213> Ganoderma lucidum

<400> 29
 Met Val Lys Phe Gln Ser Leu Leu Ser Cys Val Thr Leu Leu Phe Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Ala His Ala Gly Ile Gly Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ile Ser
 20 25 30

Asn Ala Asn Ile Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Ala Val Val Val
 35 40 45

Asn Gly Val Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg
 50 55 60

Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Leu Thr Asn His Thr Met Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp
 85 90 95

10

ES 2 643 242 T3

Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His
 100 105 110

Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp
 115 120 125

Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140

Phe Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro Leu Lys Gly Leu Tyr Asp Val
 145 150 155 160

Asp Asn Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ser Asp Trp Tyr His Val Ala
 165 170 175

Ala Arg Leu Gly Pro Ser Phe Pro Leu Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile
 180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Ser Thr Thr Asn Ala Thr Ala Gly Leu Ala Val
 195 200 205

Ile Asn Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
 210 215 220

Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asp Met Ser
 225 230 235 240

Val Ile Glu Ala Asp Gly Ile Ala Thr Gln Pro Val Thr Ala Asn Ala
 245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ser Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Thr Ala Asn
 260 265 270

Gln Thr Ile Gly Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ser Phe Gly Asn
 275 280 285

Ile Gly Phe Thr Asn Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Ser Gly
 290 295 300

Ala Asp Pro Ile Glu Pro Thr Thr Ala Gln Gln Thr Thr Gln Asn Leu
 305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Phe Val Ala Lys Gln Thr Pro Gly
 325 330 335

Arg Ala Thr Gln Gly Gly Thr Asp Val Ala Ile Asn Met Val Phe Asn
 340 345 350

ES 2 643 242 T3

Phe Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn Asn Ala Ser Phe Thr Pro Pro
 355 360 365

Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln
 370 375 380

Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Lys Ser
 385 390 395 400

Ile Glu Leu Thr Phe Pro Ala Thr Val Asn Ala Pro Gly Ala Pro His
 405 410 415

Pro Phe His Leu His Gly His Ser Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430

Ser Thr Glu Tyr Asn Tyr Asn Asn Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445

Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr
 450 455 460

Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
 465 470 475 480

Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Phe Ala Glu Asp Thr Ala Asp Thr Ser
 485 490 495

Leu Ala Asn His Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr
 500 505 510

Asp Ala Leu Ser Ala Asp Asp His
 515 520

REIVINDICACIONES

1. Un método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica, que comprende las etapas de:
- a. proporcionar una dispersión acuosa de biomasa;
 - 5 b. añadir una preparación de lacasa fúngica a la biomasa (a);
 - c. añadir una preparación de una o más enzimas hidrolizantes de celulosa a la biomasa (b), en el que la adición en la etapa b) es simultánea a la adición en la etapa c) o es anterior a la adición en la etapa c);
 - d. incubar la biomasa de la etapa b) y la etapa c) simultáneamente o en secuencia;
- 10 en el que la lacasa fúngica es un polipéptido que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5.
2. El método para potenciar la hidrólisis de biomasa lignocelulósica de la reivindicación 1, que comprende una etapa (e) adicional de separar una biomasa soluble del producto de la etapa d) para obtener un hidrolizado acuoso soluble.
- 15 3. El método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de la reivindicación 1 o 2, en el que la una o más enzimas hidrolizantes de celulosa se seleccionan de entre endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).
4. El método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la biomasa se somete a pretratamiento con uno o más de calor, presión y vapor para degradar y solubilizar parcialmente la lignocelulosa.
- 20 5. El método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la etapa (d) se efectúa a un pH de entre 4,2 y 5,2.
6. El método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la etapa (d) se efectúa a una temperatura de entre 40 y 50 °C.
- 25 7. El método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la incubación de la etapa (d) tiene una duración de 16 horas o más.
8. El método para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia aminoacídica de la lacasa fúngica (EC 1.10.3.2) es de al menos 499 aminoácidos de longitud y tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.
- 30 9. Una composición enzimática adecuada para potenciar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:
- a. una lacasa fúngica, en la que la lacasa es un polipéptido que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5; y
 - b. una o más enzimas hidrolizantes de celulosa seleccionada de entre endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).
- 35 10. La composición enzimática según la reivindicación 9, en la que la composición se formula como uno cualquiera de un polvo seco, comprimido seco o líquido.
11. La composición enzimática según las reivindicaciones 9 o 10, en la que el polipéptido comprende adicionalmente un péptido carboxiterminal heterólogo y en la que el péptido tiene una afinidad de unión a sustrato selectiva adecuada para la purificación del polipéptido.
- 40 12. La composición enzimática según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la secuencia aminoacídica de la lacasa fúngica (EC 1.10.3.2) es de al menos 499 residuos aminoacídicos de longitud y tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5.
- 45 13. La composición enzimática según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la lacasa fúngica es un polipéptido recombinante obtenido por expresión recombinante en una célula hospedadora seleccionada de una cualquiera de *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubigensis*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Hansenula polymorpha*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Escherichia coli*.

14. Uso de una composición enzimática que comprende una lacasa fúngica para potenciar la hidrólisis mediada por celulasa de biomasa lignocelulósica, en el que la lacasa es un polipéptido que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia aminoacídica con la SEQ ID NO: 5.

5 15. Uso de una composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 9-13 para potenciar la hidrólisis mediada por celulasa de biomasa lignocelulósica.

Figura 1

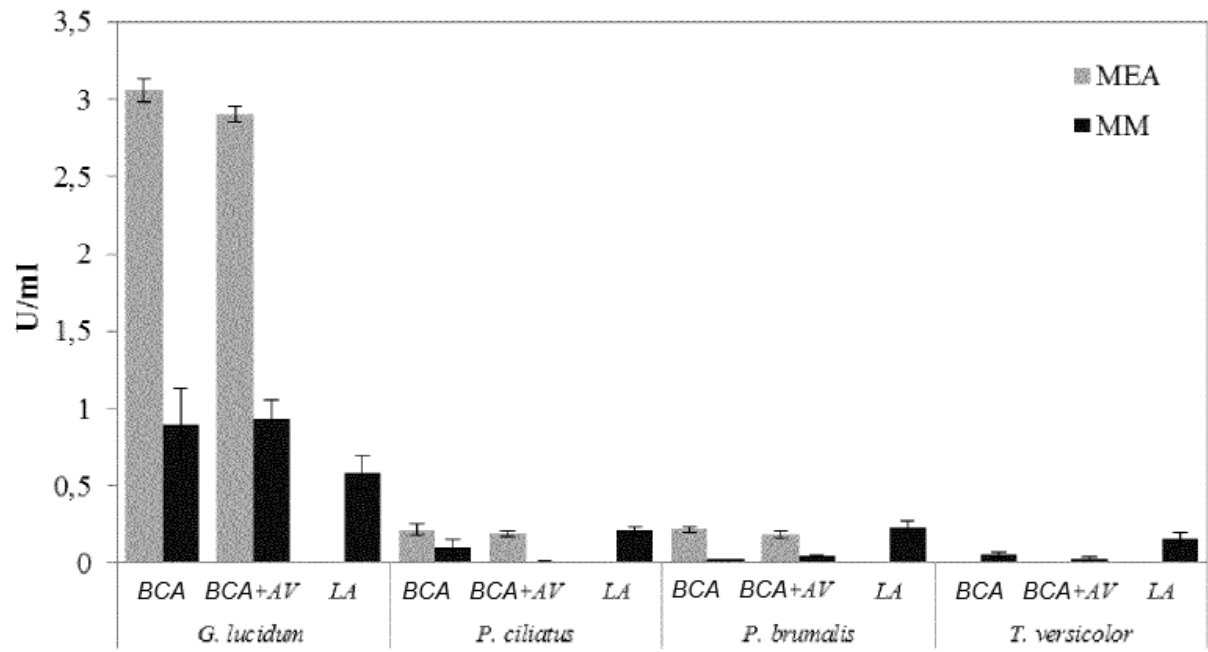


Figura 2

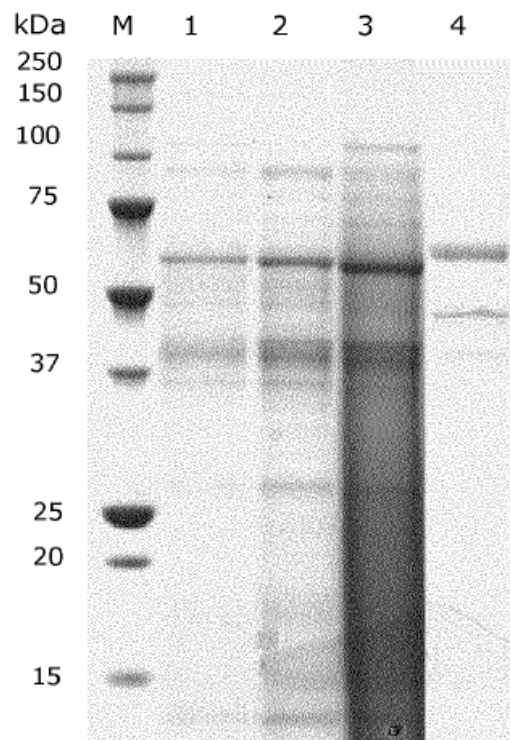


Figura 3

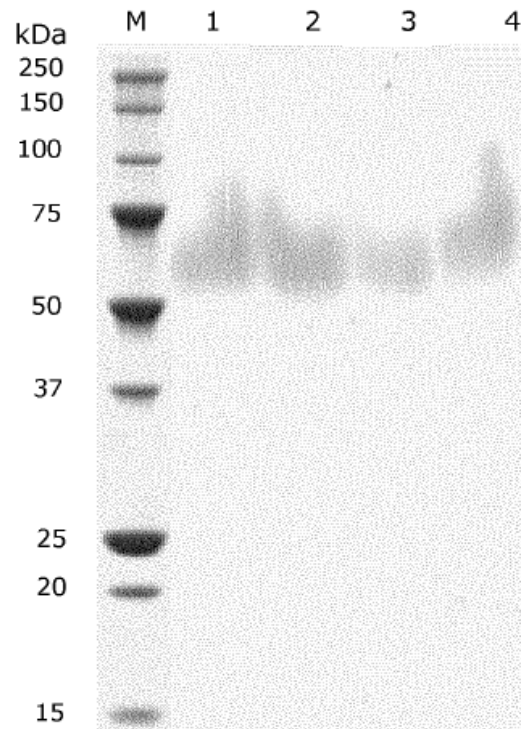


Figura 4A

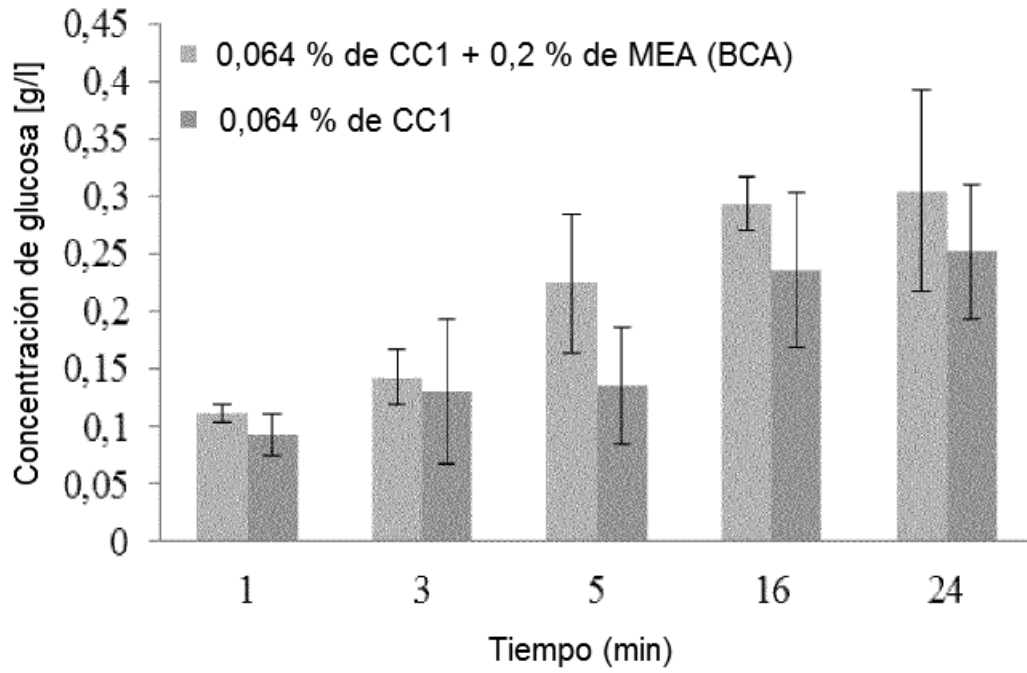


Figura 4B

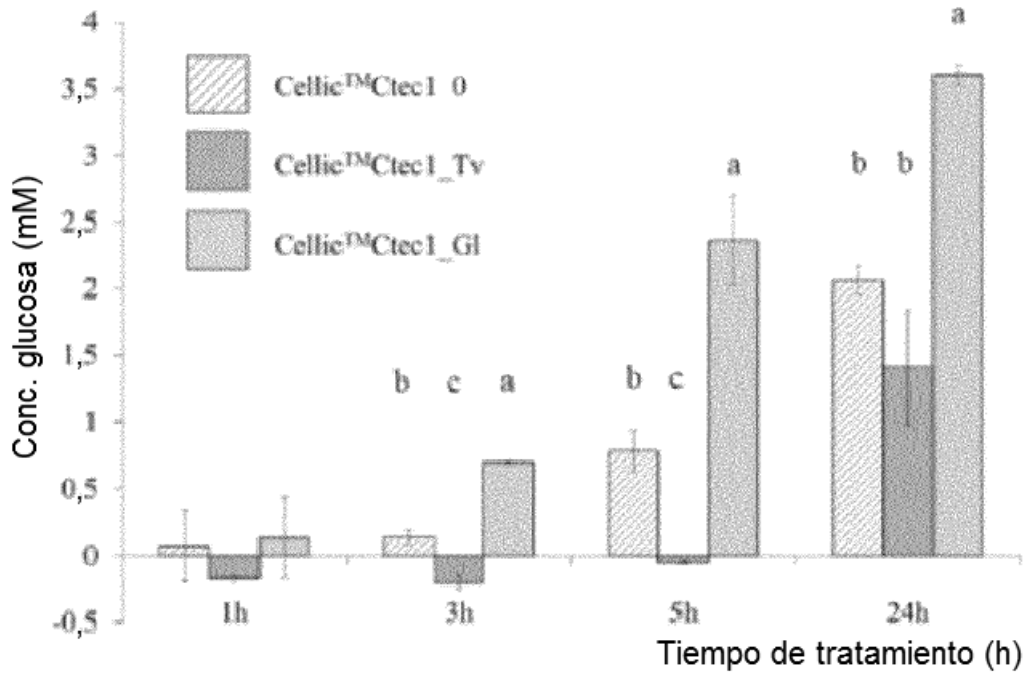


Figura 6

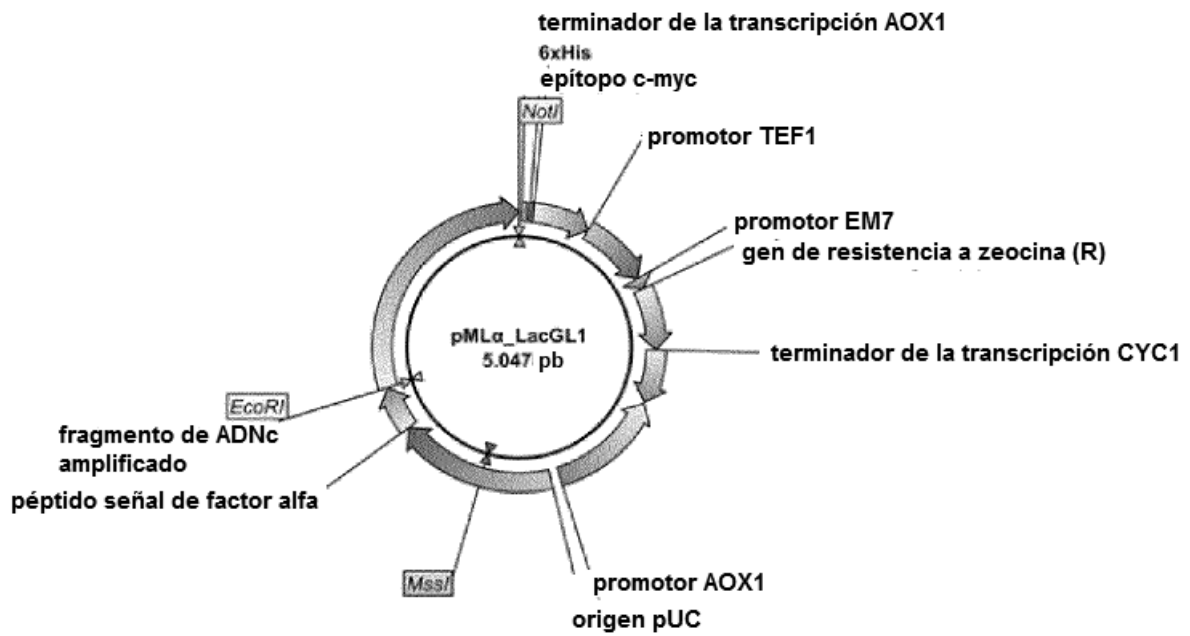


Figura 7

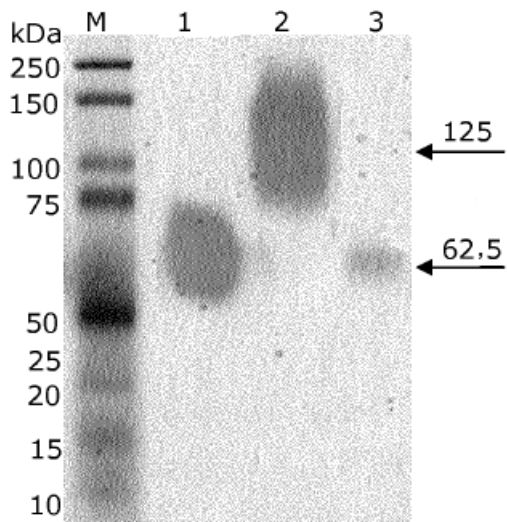


Figura 8

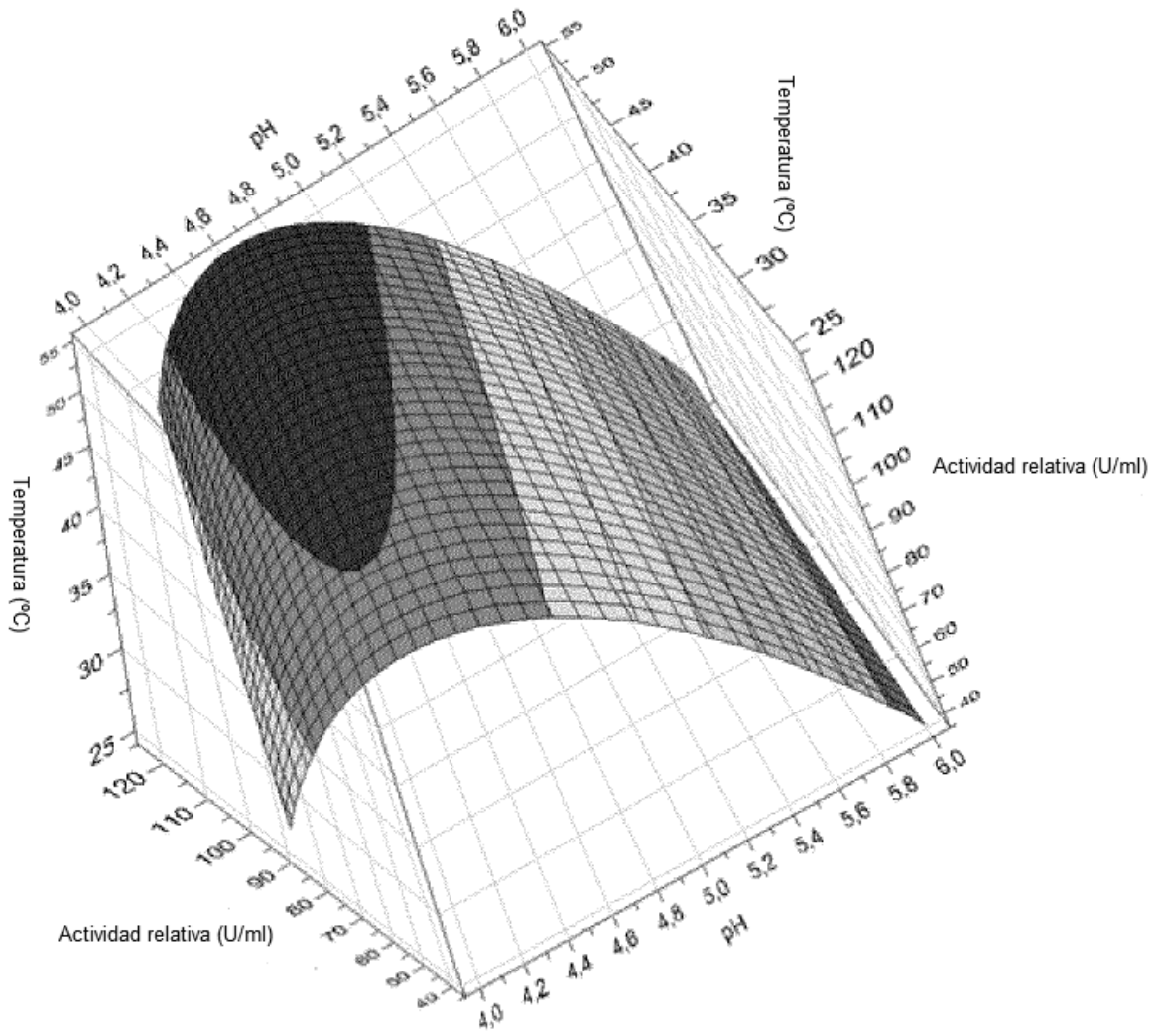


Figura 9

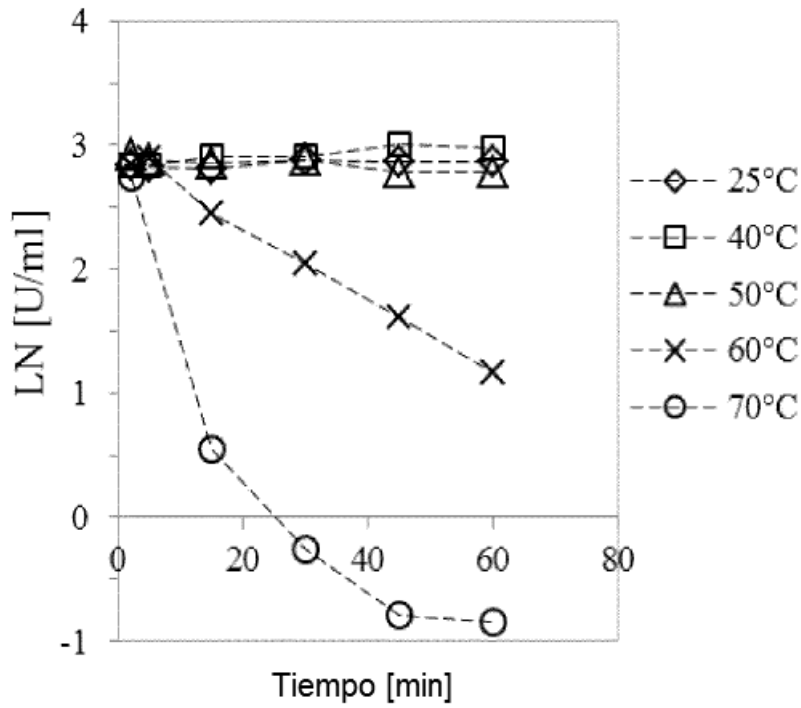


Figura 10

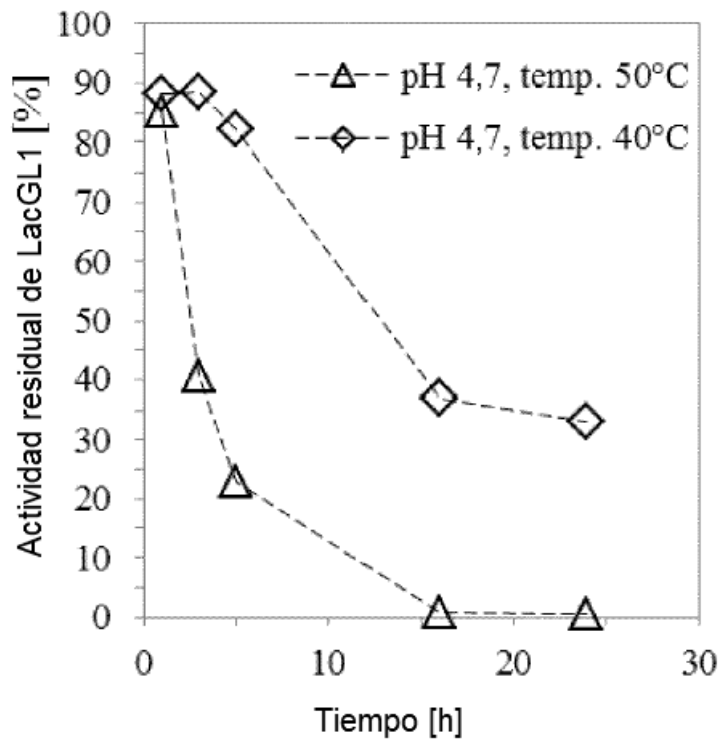


Figura 11

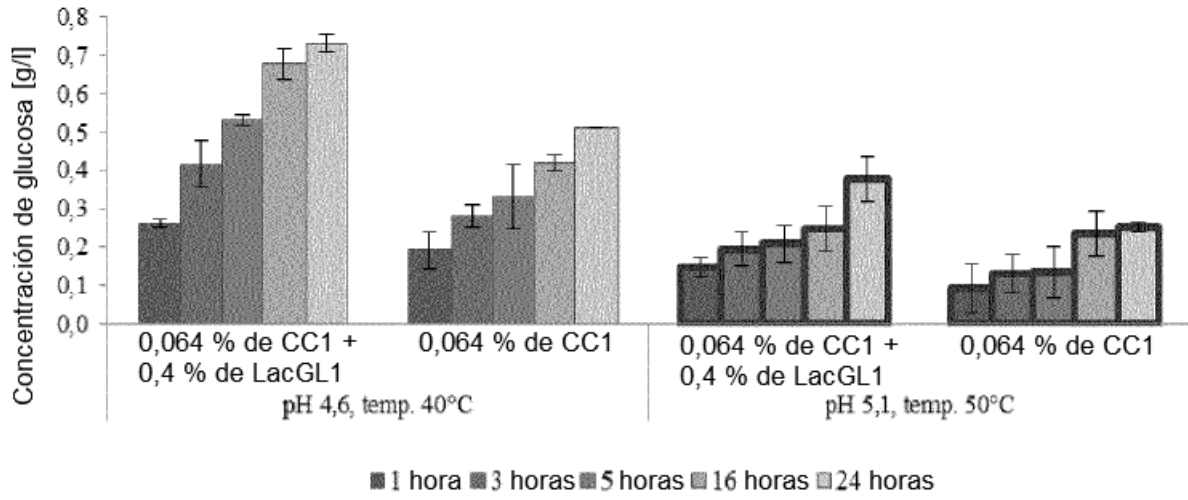


Figura 12

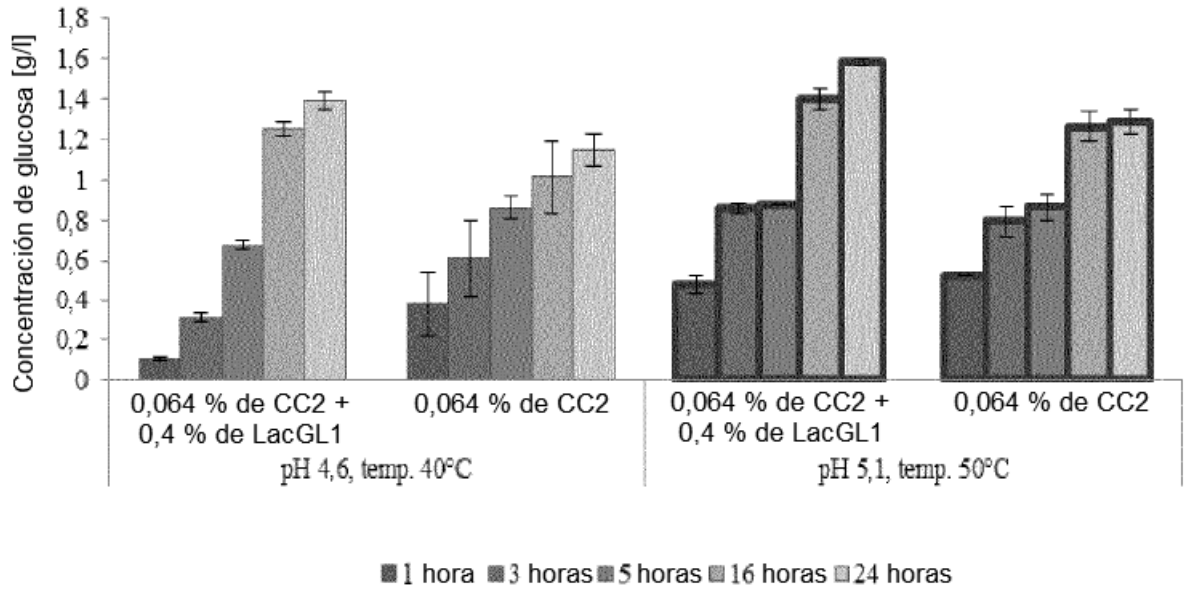


Figura 13A

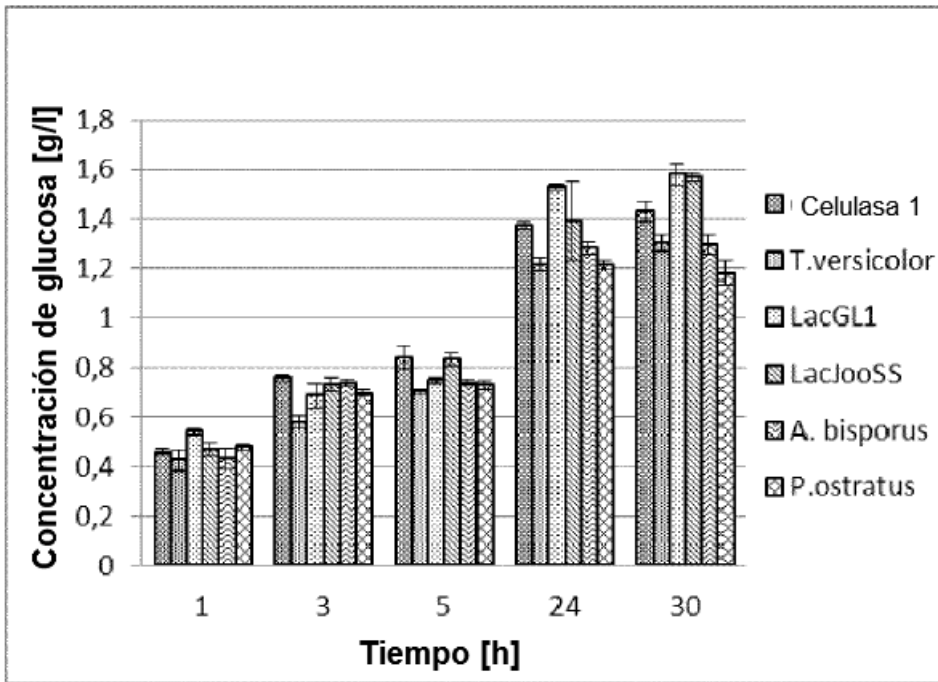


Figura 13B

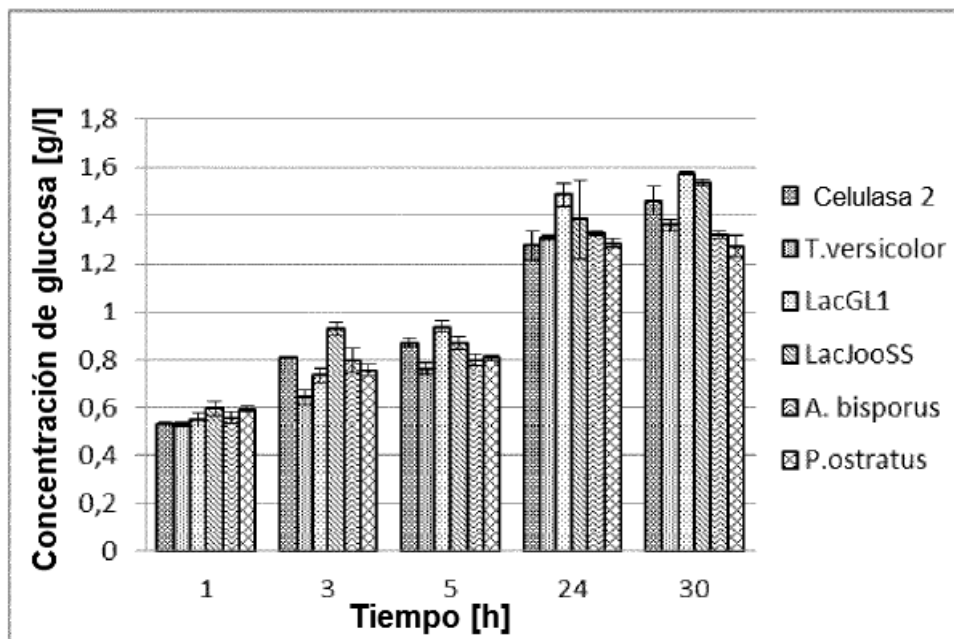


Figura 14A

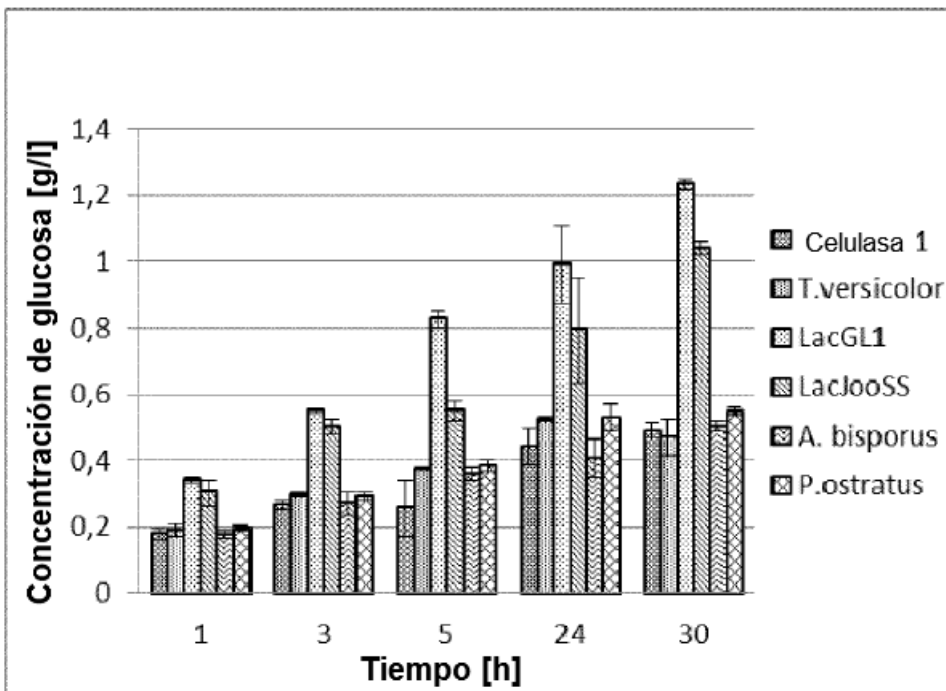


Figura 14B

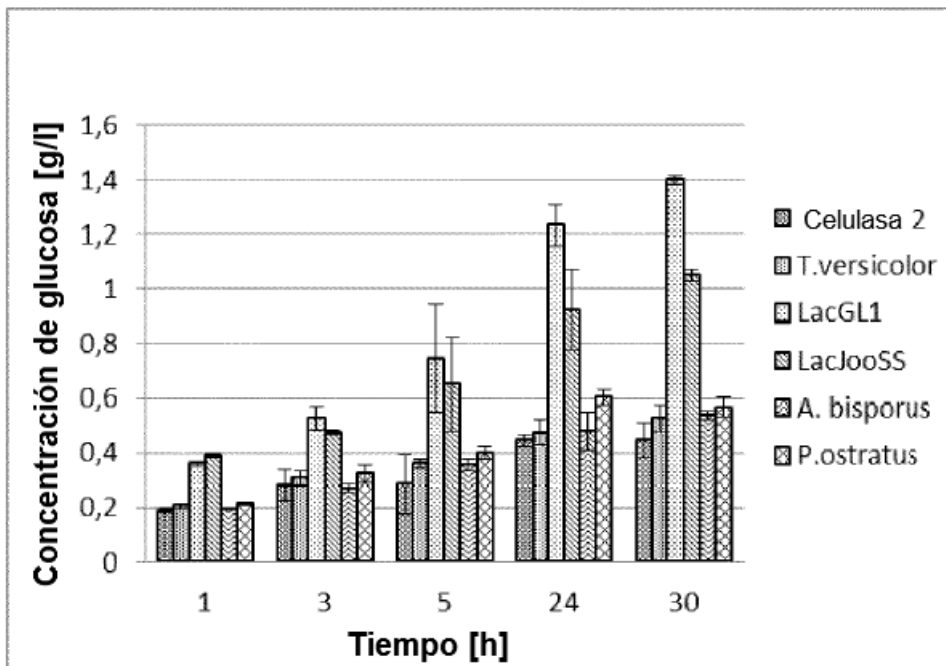


Figura 15A

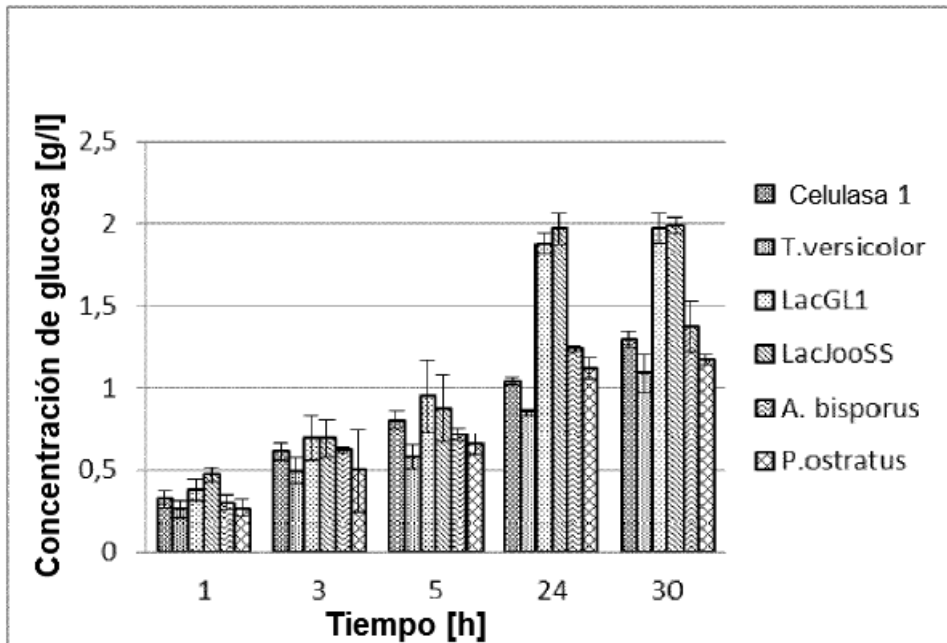


Figura 15B

