



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 097**

51 Int. Cl.:
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07859323 .3**
96 Fecha de presentación : **21.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2121912**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: *β -mananasa de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, y usos de la misma.*

30 Prioridad: **21.11.2006 US 866705 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.08.2011

73 Titular/es: **FEDERACION NACIONAL DE
CAFETEROS DE COLOMBIA
Calle 73 No. 8-13
Bogota, D.C., CO
CORNELL RESEARCH FOUNDATION, Inc.**

72 Inventor/es: **Acuña Zornosa, Ricardo y
Rose, Jocelyn**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 364 097 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

Beta-mananasa de la broca del café, *hypothenemus hampei*, y usos de la misma

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con una proteína β -mananasa aislada y usos de la misma.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Mananastas son enzimas que hidrolizan mananos y polisacáridos hemicelulósicos relacionados, tales como el galactomanano y el glucogalactomanano (también conocido como galactoglucomanano). Estos polisacáridos son componentes característicos de las paredes celulares de plantas y por ende un importante uso comercial potencial de las mananastas está en la degradación de materiales hemicelulósicos a partir de biomasa vegetal, proporcionando así un medio de recuperación de azúcares solubles a partir de estos biopolímeros. Los polisacáridos de manano también se encuentran como polímeros de almacenamiento en las semillas de algunas especies vegetales tales como aquellas de plantas leguminosas, y árboles coníferos.

20 En el grano del café, los galactomananos se acumulan en extremadamente altas concentraciones y representan aproximadamente un 24% del peso en seco del grano (Bradbury et al., "Chemical Structures of Green Coffee Bean Polysaccharides", J. Agric. Food Chem. 38:389-392 (1990)). Estos polisacáridos consisten de una cadena lineal de residuos de manosilo enlazados entre sí por medio de enlaces beta 1,4 glicosilos a los cuales están fijados monómeros de residuos de alfa-galactosilo. Se conoce que las endo-beta-mananastas (EC 3.2.1.78) hidrolizan polímeros de manano durante la germinación de semillas, por lo tanto facilitando la salida de la raíz durante la germinación y así liberando pequeños oligosacáridos los cuales luego son usados como fuente de energía para el crecimiento de la joven planta. Por cierto, se ha demostrado en varias plantas que la actividad de la endo-beta-mananasa está principalmente detectada en el endoesperma de las semillas durante la germinación (Bewley, "Breaking Down the Walls – A Role for Endo-Beta-Mannanase In Release from Seed Dormancy?" Trends Plant Sci. 2:464-469 (1997)).

30 Las mananastas son producidas por microorganismos como los mohos, levaduras y hongos, como también el *Bacillus subtilis*, *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, y *Streptomyces*. Otras plantas más desarrolladas o inclusive animales pueden producir mananastas; sin embargo, no hay indicio en la literatura que describa una beta-mananasa a partir de insectos. Los microorganismos típicamente usados para la producción comercial de mananastas incluyen la *Trichoderma* o *Aspergillus* spp.

35 En procesos industriales, durante el tratamiento del café, los mananos y sus derivados constituyen una porción considerable de los sedimentos insolubles. Adicionalmente, en el primer paso de extracción durante la producción del café solamente un 50% aproximadamente de los mananos son solubles y estos polímeros por lo tanto son responsables de la mayoría de las precipitaciones secundarias que ocurren durante los pasos subsiguientes. La Patente Europea No. 0676145A demuestra que es posible hidrolizar galactomananos del café usando una mananasa inmovilizada extraída del *Aspergillus niger*.

La presente invención está relacionada con el intento de solucionar estas y otras limitaciones en el estado de la técnica.

45 RESUMEN DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención está relacionado con una proteína β -mananasa aislada la cual tiene una secuencia de aminoácidos que es 90% similar a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. La presente invención también se relaciona con un polinucleótido aislado que codifica la proteína β -mananasa, y un sistema de expresión aislado y una célula hospedadora que contiene el polinucleótido.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método de producir de manera recombinante una proteína β -mananasa. Este método implica proporcionar una célula hospedadora que contenga el polinucleótido de la presente invención y cultivar la célula hospedadora bajo condiciones que sean efectivas para que la célula hospedadora exprese la proteína β -mananasa. La proteína β -mananasa es recuperada.

Un aspecto adicional de la presente invención está relacionado con un método de degradación de mananos y polisacáridos en material vegetal. Este método comprende proporcionar material vegetal y contactar el material vegetal con la proteína β -mananasa de la presente invención bajo condiciones efectivas para degradar los mananos y polisacáridos en el material vegetal.

60

La presente invención se relaciona con una secuencia de polinucleótidos aislados la cual codifica una enzima de mananasa involucrada en la hidrólisis de polisacáridos de manano, incluyendo moléculas de manano ramificadas y no ramificadas enlazadas entre sí vía un enlace beta 1,4 glicosilo. El polinucleótido es aislado a partir de un genoma de insecto (broca del café, *Hypothenemus hampei*).

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una fotografía la cual muestra un análisis SDS-PAGE de la proteína β -mananasa recombinante según una realización de la presente invención expresada en un baculovirus recombinante. Línea 1: marcadores de masa molecular (kDa); Línea 2: proteína concentrada por Speed-vac; Línea 3: mananasa etiquetada con 6x-His purificada usando partículas paramagnéticas.

10

La Figura 2 es una gráfica que muestra la cronología de la hidrólisis de AZC-galactomanano con β -mananasa recombinante soluble a partir de *H. hampei*. La actividad enzimática fue determinada mediante el aumento de color azul de la absorbancia a través del tiempo. La actividad de la β -mananasa es un promedio \pm SE para tres reacciones.

15

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto del pH sobre la actividad de la β -mananasa recombinante del *H. hampei*, según la presente invención. El tampón era 200 mM acetato de sodio pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0.

20

La Figura 4 es una gráfica que muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de la β -mananasa recombinante del *H. hampei*. Se incubaron soluciones enzimáticas en tampón de 200 mM acetato de sodio por 120 minutos y las actividades fueron medidas según la descripción en los Ejemplos (*infra*).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25

Un aspecto de la presente invención se relaciona con una proteína β -mananasa aislada a partir de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, a saber:

Met Thr Ala Asp Thr Leu Thr Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Arg Ala Ala Ala Ala Val Pro Gly Phe Thr Val Ser Gly Thr Arg Ile
20 25 30

Leu Asp Ala Asn Gly Gln Glu Phe Met Ile Arg Gly Val Ser His Ala
35 40 45

His Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ile Asn Gly Ala Ile Thr Ser Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Gly Ala Asn Thr Val Arg Ile Val Leu Ser Asn Gly Gly Gln
65 70 75 80

Trp Thr Lys Asp Asn Leu Asp Ser Val Gln Asn Ile Leu Ser Leu Cys
85 90 95

Glu Ser His Lys Leu Ile Ala Met Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly
100 105 110

Asn Asp Ser Gln Glu Thr Leu Glu Asn Ala Val Asn Tyr Trp Lys Glu
115 120 125

Leu Arg Asp Leu Leu Ile Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile
130 135 140

Ala Asn Glu Trp Phe Gly Thr Trp Asp Thr Ala Gly Trp Ala Asp Gly
145 150 155 160

Tyr Lys Val Val Ile Pro Glu Leu Arg Asn Ala Gly Leu Glu His Leu
165 170 175

Leu Val Val Asp Thr Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Pro Gln Ala Ile Phe
180 185 190

Glu Lys Gly Lys Glu Val Phe Gln Thr Asp Leu Leu Ala Arg Thr Val
195 200 205

Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala Ala Thr Asp Val Thr Met Ile
210 215 220

Lys Gly Asn Ile Asp Ser Ala Leu Asn Thr Gly Ile Pro Val Ile Ile
225 230 235 240

Gly Glu Phe Gly Asp Arg Lys Pro Glu Ser Gln His Val Asp Ile Asp
 245 250 255

Thr Ile Met Ser Tyr Thr Arg Glu Lys Ser Val Gly Trp Leu Ala Trp
 260 265 270

Ser Trp Tyr Gly Asn Gly Asn Asp Glu Ser Ile Leu Asp Leu Thr Asn
 275 280 285

Gly Pro Ser Gly Asp Tyr Ser Leu Thr Asn Val Gly Ser Gln Ile Val
 290 295 300

Asp Ser Glu Asn Gly Ile Arg Lys Thr Ser Thr Ile Cys Ser Ile Phe
 305 310 315 320

Asn

5 La presente invención también está relacionada con proteínas β -mananasa aisladas que presentan una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% similar, al menos un 91% similar, al menos un 92% similar, al menos un 93% similar, al menos un 94% similar, al menos un 95% similar, al menos un 96% similar, al menos un 97% similar, al menos un 98% similar, y/o al menos un 99% similar a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

El polinucleótido que codifica la proteína β -mananasa de la SEQ ID NO: 1 tiene una secuencia de SEQ ID NO:2, a saber:

gctgatcggg tgtgtactca attctttaag gagtttaca tatgaccgct gatacattaa 60
 cgcgggcact gctgctgttg ctgttggtgc gcgctgctgc tgctgtaccc ggattcacgg 120
 tttccggtac tcgaatatta gatgctaacg gtcaggaatt tatgataaga ggggtcagtc 180
 acgcacatac ctggtataag gatgatatta atggggccat cacatccatc gctgctgctg 240
 gcgccaacac ggttcgcatt gtactttcta atggcggaca gtggacaaaa gacaacctgg 300
 attcagttca gaacattctg tccctctgtg agagccataa gcttattgcc atgctggaag 360
 ttcacgatgc caccggcaat gacagccaag aaactctgga aatgcccgtg aattactgga 420
 aagagcttcg ggacttgctc attggtaagg aagacagagt tattatcaat atagccaatg 480
 agtggttcgg tacctgggat actgctggct gggccgacgg ttataaagtt gtcattccgg 540
 aactacgtaa cgccggactg gaacacctgc tggttgtaga cacagcggga tacggacaat 600
 atcctcaagc tatttttgaa aaaggttaagg aggtttcca gacagacctt cttgcccgca 660
 cgggtgttttc cattcacatg tatgaatatg cagcgacgga tgtaacaatg ataaaaggaa 720

10

```

atattgactc ggccttgaat acaggcatcc cggtgattat tggagaattt ggtgaccgaa 780
aaccggagtc gcagcatggt gatatcgata ccatcatgag ctacactcgc gagaaatccg 840
taggctgggt ggcctgggtc tggtagcgtg acggtaacga tgaatcaatt cttgacctga 900
cgaacggacc tagcggagat tacagtctta ctaacgtggg gagtcaaatt gttgacagtg 960
agaacggcat tcgcaaaacc tccacaatct gttcaatatt caattaaanaaaa aaaagatggt 1020
tgtttgatgca tttttgttat aataaacggt tcatttgcatt att 1063

```

5 Los polinucleótidos aislados que tienen al menos un 90% de similitud, al menos un 91% de similitud, al menos un 92% de similitud, al menos un 93% de similitud, al menos un 94% de similitud, al menos un 95% de similitud, al menos un 96% de similitud, al menos un 97% de similitud, al menos un 98% de similitud, y/o al menos un 99% de similitud a la SEQ ID NO:2 también son contemplados por la presente invención.

10 La secuencia genómica a partir de la cual el polinucleótido aislado de SEQ ID NO:2 es derivado tiene una secuencia de SEQ ID NO:3, a saber:

```

atggttgagt tcaccaatca agaatatgca gacatgcatt tgatttatgg ccaagccaat 60
ggcaattcct acgaagcgcg cagactctac gcacgtagat atcctaatacg gagactacct 120
gatcaaaaaa catttccaaa tattcacatt cgactatgtg aaactggaac atataaacag 180
ttcagtggtt tcgaaggagt acatcaaatc gcgagaactc cagaaatcga agaagccggt 240
ctaaatagtg ttgaagccga tctgctacg agcacaagga aaattgcaat aacattgaac 300
atctcattta tgcttgctg aagaattctg actgataacc ttttgatcc ttaccacctt 360
acaagggtc aagctcttct cccacgagac tttccttag gcgtaaattt ttgcgagtag 420
ttcttcaaaa tgctggctca aaatccgctg tttgcatcgt ttgcgctggt ttgtttattt 480
tatttacgga tgaagcaaat tttcaagaa attccatccg aaattttcat aatgaacatt 540
tttggggaga agaaaatcca catttagtac gagaaaaca tttcaacat caattttctg 600
tcaacgtttg ggcaggaatt attggcgatt atttaatagg accatttttt ctgtcgaaga 660
ggttgaaatg tggctattat catcggtttt tcgaagagga acttcccgtta cttttagatg 720
aggtaccgct tcttttgaga aaccaaagt ggctaatacga cgatggtgcg ccagtccatt 780
ttagtcggga agtaaggag ttctaaatg aacattatca caaccgttg attgatcgag 840
ggggaactca gtcattggccc ccgaggtccc cggacctgaa tagtctggat tttttttct 900
agggacatct caaatccttg gtgtacaaa cccaattaa cacagtggag gaattgcgaa 960

```

acagaatagt cgattcatgt aacgtcattc gcaatactcc tggatatttt gaaagagtcc 1020
 gccggtctat gaggcacaga gcggaatctt gcatcttagc aagaggagga cattttcaac 1080
 agttcctata gtcttgtttt atttagatta aattactttt actgttacct tacgaattta 1140
 atacataaga ttcatgtgtac tcttttggtg tacgttttcc ttaatatgca tcggtaactg 1200
 tttatgcaaa tttttcgcaa atgataaaag atacgagaaa aatgcaagag atcaaaaagt 1260
 aagagaaata gacaaggaat ctaaagtgtg aatcaaaatt tatacatagt gttccaaaaa 1320
 aaagttagga agcaaaaaat agcacatgac ccaagaaaac ataagaccct gtatatggag 1380
 agcaacgatt ttgccatttt catatagagg ctcttaaaaa atatagatat accaaatttc 1440
 attaaattat ctttaggcat aagaaagaaa atagtagaaa atttaaaaaa aatcaaactt 1500
 tatcaccctg tatatcaaaa atggtgctgt tttcccata ggtgtattag catttttttc 1560
 ttattttgcc gaatactatc accccctgaa atatctccat gatgatctgt tacaccctgt 1620
 acacctaaaa agtaaaataa taaaacgttt aaattttatc ttttaacgta gataagattt 1680
 tgcgtccttt gtttccttct aagttttaat cgagatttcg cctcattttc gctcattcgc 1740
 cagaagacct cagtgaaagc gattcattaa gtctgaaatt taactttggt ccctaccgaa 1800
 tattcttttt ctgacgatag acgatagctg atcgggtgtg tactcaattc ttttaaggagt 1860
 ttacaatatg accgctgata cattaacgcg ggcactgctg ctggtgctgt tgttgccgcg 1920
 tgctgetgct gtaccgggat tcacggtttc cggtaactga attttagatg ctaacgggtca 1980
 ggaatttatg ataagagggg tcagtcacgc acatacctgg tataaggatg atattaatgg 2040
 ggccatcaca tccatcgctg ctgctggcgc caacacggtt cgcattgtac tttctaagtg 2100
 cggacagtgg acaaaagaca acctggattc agttcagaac attctgtccc tctgtgagag 2160
 ccataagctt attgccatgc tggaaagtca cgatgccacc ggcaatgaca gccaagaaac 2220
 actgaaaaat gccgtgaatt actggaaga gcttcgggac ttgctcattg gtaaggaaga 2280
 cagagttatt atcaatatag ccaatgagtg gttcggtagc tgggatactg ctggctgggc 2340
 cgacggttat aaagttgtca ttccggaact acgtaacgcc ggactggaac acctgctggt 2400
 tgtagacaca gcgggatacg gacaatatcc tcaagctatt tttgaaaaag gtaaggaggt 2460
 tttccagaca gaccttcttg cccgcacggt gttttcatt cacatgtatg aatatgcagc 2520
 gacggatgta acaatgataa aaggaaatat tgactcggcc ttgaatacag gcatcccggg 2580
 gattattgga gaatttgggt accgaaaacc ggagtcgcag catgttgata tcgataccat 2640
 catgagctac actcgcgaga aatccgtagg ctggttgccc tggctcctggt acggtaacgg 2700
 taacgatgaa tcaattcttg acctgacgaa cggacctagc ggagattaca gtcttactaa 2760

cgtggggagt caaattggtg acagtgagaa cggcattcgc aaaacctcca caatctgttc 2820
 aatattcaat taaaaaaaaa gatgtttgtt tgtgcatttt tgttataata aacgtttcat 2880
 ttgcatatta aatatactaa tccaatatat atttatagac aatagattat taaaaaagta 2940
 aattttaaaa taacttcttc aaaaaagaac atttacgctc aaagtgacct atagacgtca 3000
 ataattttaa atgtcactct tcgcacattg acaataacct gcatagacgt ctatgaacgt 3060
 cgttgtctat agacgtgttc ctttaattgt tttctaaagc tttgatcaat tggttcagaa 3120
 aaacggttca atagattcat ttaataattt acaggactat tgggggtaca ttaggetata 3180
 aaacggcctc tcaatatattg tcttcccatc aatatttaa aagtaatagt agatttgta 3240
 aaggactgta aatgtaatt ttttagtagt ttttccaaat taaagctaag agtaaaaaa 3300
 acggtttttc taaaaaagtc atggaagggt tttgtaggga atttaatcag gtttttaaaa 3360
 ctatccttga aattaaagtt tacttaagcg atcactgggt gctgagatat cgatgatcaa 3420
 agataaaagg atcctttttc tttcaaagtt agatgtctca gcaagggtt gacgtagatg 3480
 tatgaaaaaa aaaacaaaat gaagctgaat aaacaaggta accgaccact gtacgacaag 3540
 ggttcaaatg gaaaaaaatt tctgagacct atggagactt tagaagaaga agaaaatttt 3600
 gaaaaatggt tacctcgcgc catttcttgg gattgcgcgg taaccataac tccaaaggaa 3660
 attccgatgt aagatctgaa aactataaaa cattaagctt caaaatgctt ttttctcaa 3720
 ctcgatcga cggttttttc acaagatac tcaaagaaca ctaaaaaaaa taaaaaaagg 3780
 tttttacttt aattttttgg attagtatta ttaacattat ttaatctaaa ataatactga 3840
 tattggtatt aactttcacc aggtacactg gtttcaatag aaacgttacc aatttagtta 3900
 catagcatca aagaaaagaa tgacattatg atcatcaatt ataattgatt gttcgattat 3960
 aatataacta ttattgatta ttatattatt ataattctct taggtattaa gcccttaagt 4020
 caaaaatcgt agttttctac aaaacgagat taaaaatttt ataacgctat gcaacagaaa 4080
 aaaaaattca ctgggtttac agtacgtggt gatgatacct cactatttac tcaattaata 4140
 tttatatata aaatagtccc atcaattatt taaattttca aaaaaaaaaa ttattaaatt 4200
 gttcaacaaa gagttaacaa taatttcaca atagttaaga actaatttct taattttcaa 4260
 tatggccccc ttctgtaaa atacacttat ctattcgttt tctgatgtgt tgcacaactt 4320
 aaataataaa tgttgtaata tttcttgaaa atttaattaa ggttaccaga tgtcactttt 4380
 ttacaattat tetaacaaga gttgagtgat agtttagggt tcgatccctg ctacctccga 4440
 tatttttttt tttcgttttt tttttgtaa taacaatagt aataattgtc aaaataatta 4500
 aaaacgataa aaataattta tttgacgcat tttacagtta tttaaagctt gtaatgagag 4560

aatttatatg attcgcatat taaattaagg attttcaacta caaatttcat atttcaaaaa 4620
caattgggtcc tattttaata aaattatcta ccaggagggtt tttgatgatg ctctttcata 4680
atatgttaaa aaaatgcggt taaaattacc ctaatacatt tttctgtaa atctacccta 4740
atatttaact ataaaaacgt acgccaatga cgaagggaaa ccatttttagg caaatcacia 4800
tcggaattca aagatacaca actgatccaa atttgaagtg aatcgggctaa acagtttttg 4860
agatacaaaa gtggctccat gaatcgtgcg acatactata tgcgatcaaa ataagacttt 4920
tttttccat aaacatgtgc cctaaaatgc acccctcca aactacagcc attctaagtt 4980
gcgcgacaaa aatcaattat tttaaatgtt gactacagtt atggatcaaa tttttgaaaa 5040
attgcacatc cgtttttctt aaacactgta ttcatttctt gctttaaaaa taacgtaacc 5100
ctaattttag agaagatgga gagggatcca cttattgctt aaataaaatt taatgtttcc 5160
aacgagaaat cctaacttta accatcagca tctagtagac catggaaaaa tctaaaattt 5220
atctctagca ttttcttaat gcaactaatc gaatctttac aggacctgac ataaaaaaat 5280
taattgatga tacctctttt ttatcaagtc tcatttacct agaataacag gcatgattag 5340
catttgttga cgtcacaaaa aattttctcg gcaattacaa atcaacagat ttctgtgaaa 5400
aaattaattt aatggtgaat gcctatcaga aattagggtg caatatatca ctgaaaattc 5460
atctcttgca atatcactta agttttttcc gaaaaatag gattcagtta gtaatgaact 5520
aggatatatg gcggtaaatt tatggtgcaa aaaaatgtac gcagattacc tgaattataa 5580
caacaaagtt gtcgaaaaat gtcgaaacac ctccgaaaat tgaacatag caaaaattat 5640
ccgagtcatt tatgcacttg aattcgtgat ttcttttact catttcacia atttattaca 5700
tgattaaaat taaattattt attaaattac aagagaatga taaaaaaaat aattaaggct 5760
tttaaagtgt gtatatgaac tgtcacaccg taacagattt gtcaacatat taacaattga 5820
cagtaaaaaat ttcaaattta taattcggtc atccattaga aaattcataa ctactatt 5880
tatccataaa tttgatcca aagtaacttg ttcttttcat gaatgtgtca gctctacata 5940
aaacaattga aactggacct atctttgcca tttctatttt ttccagggcc atatgggaaa 6000
ctttgcaata aatcttgtgc aataaattat gacaattagg aatatttggg gcggtgtaca 6060
tattatatac aggttgaaga aaatacctcc ccataaaaag ggccttcaaa atagtcta 6120
acaattttgc ccttaaacga acaggaaga taatattaa ggatattgaa atttatatgg 6180
gttttccat tgtcgggtccg gaggggcaac atccaatata ctatatgaaa taaagttgtc 6240
tatagttagt acattgttaa taatttgatt ttcatatatt ctgtattcag tttctaccgt 6300
acaagtagcg gcggagatgt ggatgtcatg tattattaa cttgtatgga aaaaaggat 6360

aaaaaggac acctatatct ccaccattga tgaatggta aagctggtaa ttttttgaa 6420
tacacctacc gatatgctaa actcatatac gaaatttggg taaaaaatct taagccgttt 6480
tggaatttaa aaaataaaga aatgttcttt tttttaact ttaacaccct gtatctcgga 6540
aacggtgctg ttgcgggcc atgttcatat aaactttttt gcttattttt gtctgaagaa 6600
tcatcccttg aaatttatgc acgtacttaa ttaacaccct gtatttcacg taccatgtcc 6660
tactatacct aaactcaaca gttggcgaga aattttgttg tcgtacctgg tttttggcc 6720
atcctgtata catggattta tcatcacaaa aacctcaacc aaaaataaaa attgacgtgt 6780
atgagcggtt ttttttttg aaaaacaaat ttctgaattt taaatgaatg tattccttat 6840
tttatcataa acctgtatat aaatttaaaa aaaacgtgat gtgatacgtg aaaactaagt 6900
tgttatttgg attcagcagg acaaaattta tatgttttat ctáaaattat gcaaaaaata 6960
ttttcatcgc agaccogtgt tatcaatgta aaaattaatt aaacccctc gtaaaagcca 7020
gcgttttgac atttgaatgt ttccgcccc atgttgaagg gaaaaataaa aagttactag 7080
aatgtaacta gttaggctgc catatttggg gtaacatggt ccctctctct ctctaacaca 7140
cgtgaacata accttgccgt actgtataga tttagtgact gtacctacat agtcatacgt 7200
atggaaactt atacagtgt tcaatttaaa aactagcaat ggagaatata ttctaataga 7260
aaagtgctat caggacgatc tcaaaaacgt atcgggggat tcgaaaagga accaaaatga 7320
tatattaatc aatccgtttt cacttatccc ctgcgccca accaccocaa cgttcagaat 7380
ttcaaatggc accatctgtc atgtaatacc tcaaatggaa ggtatttcaa aactgcattt 7440
aggggtataa ttagatttta atttattgat tcgtttttga gaaaaagtgc ctcaaaaagg 7500
taaaattaaa aattttaata ttgtttctta caaaaacaat taggttttca atacatgttg 7560
ttaggaacag ggccggttt agggcagggc aggcggggct actgccccgg ggcctccaca 7620
aggaaggggc cccacaata gagaaaaata aatatcgaaa ttcgacggg tcagcaactt 7680
ttaattttt ttagttttt caatacttaa gtgtctttcg ggaccogtgg agcgaattgg 7740
ggtgctgggt ggggtaaaca actagctccg agtgtgctaa ttgcggcggt ctttaaaaaa 7800
aataatttat tttgtttct tttttcatt ttctggcggt tcctggatgc caaaaatatg 7860
tttttttct caaaactgta aatgtcgta aagcgttacg gaccccaagt ttccatttac 7920
tgtcaatttt ttattttatc aagcatctcg gtggcaatac tttttttta atgtgtaatt 7980
tgtaatttgt gctcatgagt taaaagaaa taaaataagt aaaaagaat tccaaggttt 8040
tataaaaagt atatatggta accgggtgac tattaaaatt tcttctcaag taggctttgg 8100
aattatttga caccgagtcc gtatgtctta gatttatata cagattcgta ttttaagtgag 8160

gttgggttta ttgtttata ttcgaaacta agtaaagaac atatcaaaga cttacggact 8220
 cgctgtcaaa taattccaca gcctacttga gaagaaattt taatagtcac ccgttataaa 8280
 tacgatttaa atcttacggt tggcaacact gtcgtggtta agaagtgtcc gagtgtagcg 8340
 tgctcgaagc ggggaatccc taaattttat tagaagctac ggacgtattg caacaaaagt 8400
 aaaatcttct gaatttatat ctacaaacac acgtaagtat tttcgtattt atcttgtgat 8460
 ctataagata taatgaattt tatatttcat tgtgcaatta cgaaaatttg ttttttttc 8520
 ttaaaggagc gatatgcttt aaagagcaaa aacgtaaaca gaggttatgg aggttttatt 8580
 ccacgactac attcttattt tcttaagatt tcttttaca tggtattatg agtgcgcgc 8640
 ataaaactcc tcgagtttcc gctagtggat cccaaaaaag gaaattgcaa acagaacgtg 8700
 aaaaaaaaa agtgaagaaa atttagctaa aatacccaaa ttgaccaact atttacatc 8760
 gacacccaaa caaaaacttc cgcaagatcc tgaaaaatca gcagaagatt cagcagtaga 8820
 tggagatggg gttgatagta atcaagataa tccagctggt acatcaggcg acaccatagg 8880
 atcttcaaaa acttgtagtc acaatcaaga ggaagtagat tttcgtggtt tcaaaaatga 8940
 cattggtctt tggcctgacg tcataacaga agaaatgatc aaatattggg cgaagaaggg 9000
 ttccacaaaa ctgcaaaact gtgatgaagt ttctctgcag aattcagttc tccaagacca 9060
 gtcgcaagat aataaaaact ttgttcggaa atgttcaaaag aatatgttta cacgtcgcaa 9120
 tcaaaaatcaa gagactgtta atcgattctg gctttgtttt tctccaacta agggaaaagt 9180
 atattgctat gcatgtaaat taatgtccac tcaaaaacga agctaagtgg ggaaggcttc 9240
 agtgactgga aacatgcatc tgagcggctg tacgagcatg agatttcaaa aactcatttg 9300
 gaatcagtga tgaatttagt gcaacgagga gaagtcacag gacgtatcga tcaagagtta 9360
 acgatacaag aggcaaca aattgaatat tggcgaaaaa ttcttacaat tgtcgtcagt 9420
 acgattaaat tcattgctga acgcggatta gcctttcgag gagacgatga aattattgga 9480
 tcatcgagaa atggcaattt tctgggtatt ttagaattgc tagccgagta cgaaccaatc 9540
 ttggcagctc atttaaaaca gcatgcaaac aaagggagag gtcacgtcaa ttatcttct 9600
 tctacgatct gcgaagaact gacaaattcc atgggtgatc aagtgttcaa tgaaatcgta 9660
 gcaaggatta aaaaatcaaa gtactattct gtttcagtgg actctactcc tgacgaatct 9720
 catatcgatc aacttactat agttattcgc tatattgaag gatcgatgcc aaaggaacga 9780
 tttcttattt tttaccaaat tgcggtcata ctggtgaagc cacagcaaaa gctttactac 9840
 aattttaag ttaccatcaa attgacatcc ttaattgccg aggtcaatcg tacgacaatg 9900
 ctgcaaatat gagtggtaaa tatcaaggga tgcaagctct tattttgcag aaaaatcatt 9960

```

tatctacggt tgtacatgt tgtggctact cactcaactt agttggaag gcagctgcta 10020
actcttgtgc atcggcagtt caattctttg atttcgttca gaatttatat acgtttttta 10080
cagcaagtac acaacgatac cgaattctgt ctgaaaaatt atcagagaaa aaaagcggac 10140
agtcatatgt tttaaaaaat cttagcgata ctgctggtc atgtagggtt gcagccacga 10200
aggccattgt tatgggatat tctgaaatcg aagaagctct aaccagcata tcttctgata 10260
aggaacagaa agat 10274

```

5 La determinación de la identidad porcentual, es decir la similitud de secuencia, entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de nucleótidos puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin et al., "Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2264-2268 (1990), , modificado como en Karlin et al., "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877 (1993). Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Myers et al., CABIOS (1989). Tal algoritmo puede incorporarse en el programa ALIGN (versión 2.0) parte del paquete de software de alineación de secuencias CGC. Se conocen en el estado de la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias e incluyen por ejemplo ADVANCE y ADAM tal como lo describe Torellis et al., "ADVANCE y ADAM: Two Algorithms for the Analysis of Global Similarity between Homologous Informational Sequences", *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5 (1994), y FASTA descrito en Pearson et al., "Improved Tools for Biological Sequence Comparison", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448 (1988).

20 La proteína β -mananasa aislada de la presente invención es preferiblemente producida en forma purificada mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, para aislar la proteína, un protocolo que involucre una célula hospedadora como la *Escherchia coli* puede utilizarse, en donde la célula hospedadora *E. coli* que lleva un plásmido recombinante es propagada, homogeneizada, y el homogeneizado es centrifugado para remover restos bacterianos. El sobrenadante es luego sometido a una precipitación secuencial con sulfato de amonio. La fracción que contiene la proteína β -mananasa puede someterse a filtración en gel en un dextrano de tamaño adecuado o columna de poliacrilamida para separar la proteína o polipéptido. Si es necesario, la fracción proteica puede purificarse adicionalmente usando HPLC. Las proteínas de β -mananasa aisladas de la presente invención pueden también ser producidas según un protocolo que involucra células hospedadoras de insectos, preferiblemente líneas celulares de insectos Sf9.

30 El presente invento también está dirigido a fragmentos de la proteína β -mananasa de la presente invención. Fragmentos de la proteína β -mananasa pueden producirse mediante la digestión de una proteína de longitud completa con enzimas proteolíticas como la quimotripsina o la Staphylococcus proteinasa A, o tripsina. Diferentes enzimas proteolíticas son capaces de cortar la proteína β -mananasa en diferentes sitios basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

35 En otro enfoque, basado en el conocimiento de la estructura primaria de la proteína, fragmentos de los genes que codifican la proteína pueden sintetizarse usando una técnica de PCR junto con juegos específicos de cebadores escogidos en representar porciones particulares de la proteína de interés. Estas luego serían clonadas en un vector adecuado para la expresión de un péptido o proteína truncada.

40 La síntesis química también puede usarse para fabricar fragmentos adecuados. Tal síntesis es llevada a cabo usando secuencias de aminoácidos conocidas para la proteína está siendo producida. Alternativamente, sometiendo la proteína β -mananasa de longitud completa de la presente invención a altas temperaturas y presiones se producirán fragmentos. Estos fragmentos pueden luego ser separados mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, cromatografía, SDS-PAGE).

45 Variantes también pueden hacerse (de manera alternativa), como por ejemplo, mediante la delección o adición de aminoácidos que tienen una mínima influencia sobre las propiedades, estructura secundaria y naturaleza hidropática de la proteína. Por ejemplo, una proteína puede ser conjugada con una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína la cual de manera co-traduccionál o pos-traduccionál dirige la transferencia de la proteína. La proteína también podrá conjugarse con un enlazador u otra secuencia para la facilidad de síntesis, purificación o identificación de la proteína.

La proteína de la presente invención es preferiblemente producida en forma purificada (preferiblemente por lo menos alrededor de un 80% de pureza, más preferiblemente un 90% de pureza) mediante técnicas convencionales. Típicamente, la proteína de la presente invención es secretada dentro del medio de crecimiento de células *Helicobacter* o células hospedadoras que expresen un sistema de secreción funcional tipo III capaz de secretar la proteína de la presente invención. Alternativamente, la proteína de la presente invención es producida pero no secretada dentro del medio de crecimiento de células hospedadoras recombinantes (por ejemplo *Escherichia coli*). En tales casos, para aislar la proteína, la célula hospedadora (por ejemplo *E. coli*) que lleva en ella un plásmido recombinante puede ser propagada, lisada por sonicación, calor, presión diferencial, o tratamiento químico, y el homogeneizado es luego centrifugado para remover restos bacterianos. Luego, el sobrenadante es sometido a una precipitación secuencial con sulfato de amonio. La fracción que contiene el polipéptido o proteína de la presente invención es sometido a una filtración en gel en un dextrano de tamaño adecuado o columna de poliacrilamida para separar las proteínas. Si es necesario, la fracción proteica puede purificarse adicionalmente usando HPLC.

El presente invento también se relaciona con un polinucleótido aislado que codifica una proteína β -mananasa, y un sistema de expresión aislado y una célula hospedadora que contiene el polinucleótido.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un método de producir de manera recombinante una proteína β -mananasa. Este método implica proporcionar una célula hospedadora que contenga el polinucleótido de la presente invención y cultivar la célula hospedadora bajo condiciones que sean efectivas para que la célula hospedadora exprese la proteína β -mananasa. La proteína β -mananasa es recuperada.

El polinucleótido de la presente invención puede insertarse dentro de cualquiera de los muchos vectores de expresión disponibles usando reactivos bien conocidos en el estado de la técnica. En la preparación de un vector de ADN para expresión, la secuencia de ADN puede normalmente ser insertada o sustituida en un plásmido bacteriano. Cualquier plásmido conveniente puede utilizarse, el cual será caracterizado por tener un sistema de replicación bacteriano, un marcador que permite la selección dentro de una bacteria, y generalmente uno o más sitios de restricción ubicados de manera conveniente. Numerosos plásmidos, conocidos como vectores de transformación, están disponibles para la transformación vegetal. La selección de un vector dependerá de la técnica de transformación preferida y la especie diana para la transformación. Una variedad de vectores están disponibles para una transformación estable usando el *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria propia del suelo que causa la agalla de corona. La agalla de corona es caracterizada por tumores o agallas que se desarrollan en el tallo inferior y raíces principales de la planta infectada. Estos tumores se deben a la transferencia e incorporación de parte del ADN del plásmido de la bacteria en el ADN cromosómico de la planta. Este ADN de transferencia (ADN-T) es expresado junto con los genes normales de la célula vegetal. El ADN del plásmido, pTi, ó ADN-Ti (plásmido inductor de tumores) contiene los genes *vir* necesarios para el movimiento del ADN-T dentro de la planta. El ADN-T lleva genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de factores regulatorios vegetales, y nutrientes bacterianos (opinas). El ADN-T está delimitado por dos secuencias de repetición directa imperfectas de 25 pares de bases llamadas "secuencias frontera". Al remover el oncogén y genes de opina, y reemplazándolos con el gen de interés, es posible transferir ADN foráneo a la planta sin la formación de tumores o la multiplicación de *Agrobacterium tumefaciens* (Fraley et al., "Expression of Bacterial Genes in Plant Cells", *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 80:4803-4807 (1983).

Mejoras adicionales de esta técnica conllevó al desarrollo del sistema binario de vectores (Bevan, "Binary *Agrobacterium* Vectors for Plant Transformation", *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721 (1984). En este sistema, todas las secuencias de ADN-T (incluyendo las fronteras) son removidas del pTi, y un segundo vector que contiene ADN-T es introducido en el *Agrobacterium tumefaciens*. Este segundo vector tiene la ventaja de ser replicable en *E. coli* como también *Agrobacterium tumefaciens*, y contiene un sitio multiclonal el cual facilita la clonación de un transgén. Un ejemplo de un vector comúnmente usado es el pBin19 (Frisch et al., "Complete Sequence of the Binary Vector bin19", *Plant Molec. Biol.* 27:405-409 (1995), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia). Cualquier vector apropiado conocido ahora o descrito más adelante para la transformación genética es adecuado para ser usado con la presente invención.

Los vectores adecuados para llevar a cabo la presente invención también podrán incluir, pero no están limitados a los siguientes vectores virales tales como el sistema vector lambda gt11, gtWES.tb, Charon 4, y vectores de plásmido tales como el pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pKC37, pKC101, SV40, pBluescript II SK +/- ó KS +/- (ver catálogo "Stratagene Cloning Systems" (1993), , pQE, pIH821, pGEX, pET series (Studier et al., "Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes", *Methods in Enzymology* 185:60-89 (1990) , y cualquier derivado de los mismos.

La Patente U.S. No. 4,237,224 otorgada a Cohen y Boyer, la cual está incorporada en su totalidad en la presente como referencia, describe la producción de los sistemas de expresión en forma de plásmidos recombinantes utilizando cortes

con enzimas de restricción y ligados con ADN ligasa. Estos plásmidos recombinantes luego son introducidos por medio de transformación y replicados en cultivos unicelulares incluyendo organismos procarióticos y células eucarióticas cultivadas en cultivo tisular.

5 Una gama de sistemas huésped-vector pueden utilizarse para expresar la(s) secuencia(s) codificadoras de proteínas de la presente invención. Principalmente, el sistema de vectores debe ser compatible con la célula hospedadora (huésped) usada. Los sistemas huésped-vector incluyen pero no se limitan a los siguientes: bacterias transformadas con ADN de bacteriófagos, ADN de plásmidos, o ADN de cósmidos; microorganismos tales como las levaduras que contienen vectores de levaduras; sistemas celulares mamíferos infectados con virus (por ejemplo vaccinia, adenovirus, etc.);
10 sistemas celulares de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); y células vegetales infectadas con bacterias. Los elementos de expresión de estos vectores varían en su resistencia y sus especificidades. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, cualquier elemento de transcripción o de traducción puede ser usado.

15 La proteína según la presente invención puede ser incorporada dentro de un vector adecuado en dirección de sentido, de tal manera que el marco de lectura abierta esté adecuadamente orientado para la expresión de la proteína codificada bajo control de un promotor de elección. Esto implica la inclusión de los elementos regulatorios adecuados dentro de la construcción de ADN-vector. Estos incluyen regiones no traducidas del vector, promotores útiles, y regiones no traducidas 5' y 3' las cuales interactúan con proteínas celulares hospedadoras para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Dependiendo del sistema vectorial y el
20 huésped utilizado, cualquier elemento adecuado de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, pueden ser usados.

Un promotor constitutivo es un promotor que orienta la expresión de un gen a través del desarrollo y vida de un organismo. Ejemplos de algunos promotores constitutivos ampliamente utilizados para inducir la expresión de transgenes incluyen el promotor del gen nopalina sintasa (NOS) del *Agrobacterium tumefaciens* (Patente U.S. No. 5,034,322 otorgada a Rogers et al.), los promotores 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Patente U.S. No. 5,352,605 otorgada a Fraley et al.,), aquellos derivados a partir de cualquiera de los distintos genes de actina, los cuales son reconocidos por expresarse en la mayoría de tipos celulares (Patente U.S. No. 6,002,068 otorgada a Privalle et al.), y el promotor de la ubiquitina, el cual es un producto génico conocido por acumularse en muchos tipos de células.
25

30 Un promotor inducible es un promotor el cual es capaz de activar de manera directa o indirecta la transcripción de una o más secuencias de ADN en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias de ADN o genes no serían transcritos. El inductor puede ser un agente químico, como por ejemplo un metabolito, un regulador del crecimiento, un herbicida, un compuesto fenólico, o un estrés fisiológico directamente impuesto sobre la planta tal como el frío, calor, sal, toxinas, o por medio de un patógeno o agente de enfermedad como por ejemplo un virus u hongo. Una célula vegetal que contiene un promotor inducible puede estar expuesta a un inductor al aplicar externamente el inductor a la célula o planta como por ejemplo mediante una atomización, riego, calentamiento, o mediante exposición al patógeno operativo. Un ejemplo de un promotor inducible adecuado para uso en la presente invenciones un promotor inducible con glucocorticoide (Schena et al., "A Steroid-Inducible Gene Expression System for Plant Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10421-5 (1991)). La expresión de la proteína codificada con transgenes es inducida en las plantas transformadas cuando las plantas transgénicas entran en contacto con concentraciones nanomolares de un glucocorticoide, o al entrar en contacto con dexametasona, un análogo glucocorticoide (Schena et al., "A Steroid-Inducible Gene Expression System for Plant Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-5 (1991); Aoyama et al., "A Glucocorticoid-Mediated Transcriptional Induction System in Transgenic Plants", *Plant J.* 11:605-612 (1997), y McNellis et al., "Glucocorticoid-Inducible Expression of a Bacterial Avirulence Gene in Transgenic Arabidopsis Induces Hypersensitive Cell Death", *Plant J.* 14(2):247-57 (1998)). Adicionalmente, los promotores inducibles incluyen promotores que funcionan de manera específica para tejidos para así regular el gen de interés entre tejidos seleccionados de una planta. Ejemplos de tales promotores específicos para tejidos o regulados en el desarrollo incluyen aquellos promotores específicos para semillas, flor, fruta o raíz bien conocidos en el estado de la técnica (Patente U.S. No. 5,750,385 otorgada a Shewmaker et al.). En la realización preferida de la presente invención, un promotor heterólogo es enlazado al ácido nucleico del constructo, en donde "promotor heterólogo" es definido como un promotor al cual el ácido nucleico del constructo no está unido en la naturaleza.
35
40
45
50

55 El sistema de expresión de la presente invención también puede incluir una región regulatoria 3' operable, seleccionada entre aquellas capaces de proveer una correcta terminación de la transcripción y poliadenilación del ARNm para la expresión en la célula hospedadora de elección, operablemente enlazada a la molécula de ADN que codifique una proteína de elección.

60 El vector de elección, el promotor y la adecuada región regulatoria 3' pueden ligarse entre si para producir la construcción de ADN de la presente invención usando técnicas de clonación molecular bastante conocidas según se

describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, NY (1989), y Ausubel, F.M. et al., *Protocolos Actuales en Biología Molecular*, New York, N.Y: John Wiley & Sons, (1989).

- 5 La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de los adecuados elementos mejoradores de la transcripción o traducción (por ejemplo, elementos divulgados en Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:516 (1987). Adicionalmente, la secuencia génica puede ser modificada para un óptimo uso de codones en el sistema de expresión adecuado o, de manera alternativa, el huésped de expresión puede modificarse para expresar moléculas de ARNt específicas para así facilitar la expresión del gen deseado.
- 10 Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede contener secuencias de nucleótidos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión recombinante puede codificar un gen marcador seleccionable para identificar células hospedadoras que hayan incorporado el vector. Además, para facilitar la secreción de la proteína a partir de una célula hospedadora, el vector de expresión recombinante puede codificar una secuencia de señal enlazada al extremo amino de la proteína, de tal manera que al expresarse, la proteína es sintetizada con la secuencia de señal fusionada sobre su extremo amino. Esta secuencia señal dirige la proteína hacia la vía secretora de la célula y luego normalmente es cortada, permitiendo así la liberación de la proteína sin la secuencia señal desde la célula hospedadora. El uso de una secuencia señal para facilitar la secreción de proteínas o péptidos a partir de células hospedadoras mamíferas es bien conocido en el estado de la técnica.
- 15
- 20 Una vez preparado un sistema de expresión que contiene un polinucleótido según la presente invención, está listo para incorporarse en una célula hospedadora. Básicamente, este método puede llevarse a cabo mediante la transformación de una célula hospedadora con el sistema de expresión de la presente invención bajo condiciones efectivas para darse la transcripción de la molécula de ADN en la célula hospedadora. Las moléculas recombinantes pueden introducirse dentro de las células por medio de transformación, particularmente transducción, conjugación, movilización, o electroporación. Las secuencias de ADN son clonadas dentro de la célula hospedadora usando procedimientos de clonación estándares conocidos en el estado de la técnica, según se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, NY (1989), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia. Células hospedadoras adecuadas incluyen, pero no están limitadas a bacterias, virus, levaduras, células mamíferas, insectos, plantas, y similares. Los métodos de transformación pueden resultar en una expresión transitoria o estable del ácido nucleico bajo el control del promotor. En una realización, una construcción de ácido nucleico de la presente invención es insertada de manera estable dentro del genoma de la célula vegetal recombinante como resultado de la transformación, aunque una expresión transitoria puede ser importante, particularmente cuando la planta siendo investigada es de crecimiento lento.
- 25
- 30
- 35 Los tejidos vegetales adecuados para una transformación incluyen los tejidos de follaje, tejidos de raíces, meristemas, embriones cigóticos y somáticos, callos, protoplastos, borlas, polen, embriones, anteras y similares. El medio de transformación escogido es aquel que es más adecuado para el tejido que va sufrir la transformación.
- 40 La expresión transitoria en tejido vegetal usualmente se logra mediante bombardeo con partículas (Klein et al., "High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids Into Living Cells", *Nature* 327:70-73 (1987)). En este método, micropartículas de tungsteno y oro (entre 1 y 2 μm de diámetro) son revestidas con el ADN de interés y luego bombardeadas sobre el tejido usando gas altamente presurizado. De esta manera, es posible distribuir ADN foráneo dentro del núcleo y obtener una expresión temporal del gen bajo las condiciones actuales del tejido. También pueden propulsarse dentro de células vegetales partículas biológicamente activas (como por ejemplo, células bacterianas secas que contienen el vector y el ADN heterólogo). Otras variaciones del bombardeo de partículas conocidas actualmente o desarrolladas posteriormente pueden también ser utilizadas.
- 45
- 50 Un método adecuado para introducir de manera estable la construcción de ácido nucleico dentro de células vegetales es el de infectar una célula vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* previamente transformados con la construcción de ácido nucleico. Como se describió anteriormente, el plásmido Ti (ó RI) del *Agrobacterium* permite la transferencia altamente exitosa de una molécula de ácido nucleico foráneo hacia células vegetales. Otro enfoque con respecto al de transformar células vegetales con un gen el cual otorga resistencia a patógenos es el bombardeo de partículas (también conocido como transformación biolística) de la célula hospedadora, según se divulga en las Patentes U.S. Nos. 4,945,050, 5,036,006 y 5,100,792, todas otorgadas a Sanford et al., y en Emershad et al., "Somatic Embryogenesis and Plant Development from Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinifera*)", *Plant Cell Reports* 14:6-12 (1995), los cuales están incorporados en la presente en su totalidad como referencia. Aún otro método de introducción es la fusión de protoplastos con otros elementos, bien sea minicélulas, células, lisosomas, u otros cuerpos fusionables de superficie lipídica (Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79:1859-63 (1982). La molécula de ácido nucleico también ser introducida en células vegetales mediante la electroporación (Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:5824 (1985)). En esta técnica, los protoplastos vegetales son electroporados en presencia de plásmidos que contienen el casete de expresión. Impulsos eléctricos de alta intensidad del campo permeabilizan de manera
- 55
- 60

reversible las biomembranas permitiendo así la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales electroporados reforman la pared celular, se dividen y se regeneran. El método preciso de transformación no es crítico para la práctica de la presente invención. Cualquier método que resulte en una transformación eficiente de la célula hospedadora de elección es adecuado para la práctica de la presente invención.

5

Después de la transformación, las células vegetales transformadas deben regenerarse. La regeneración vegetal a partir de protoplastos cultivados está descrito en Evans et al., Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. I: (MacMillan Publishing Co., New York, 1983); Vasil I.R. (ed.), Cell Culture and Somatic cell Genetics of Plants, Acad. Press, Orlando, Vol. I, 1984, y Vol. III (1986), y Fitch et al., "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryos of Papaya (*Carica papaya* L.)", Plant Cell Rep. 9:320 (1990).

10

Los medios de regeneración varían de especie a especie de plantas, pero de manera general se proporciona primero una suspensión de protoplastos transformados o un plato petri que contenga explantes. Tejido de callos es formado y pueden inducirse brotes a partir del callo y luego enraizarse. De manera alternativa, la formación de embriones puede inducirse en el tejido del callo. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. Los medios de cultivo generalmente contendrán varios aminoácidos y hormonas, tales como la auxina y citoquinas. Una regeneración eficiente dependerá del medio, del genotipo, y de la historia del cultivo. Si estas tres variables son controladas, entonces la regeneración es normalmente reproducible y repetible.

15

Preferiblemente, las células transformadas son primero identificadas usando un marcador de selección introducido de manera simultánea dentro de las células hospedadoras junto con el constructo de ácido nucleico de la presente invención. Los marcadores de selección adecuados incluyen, sin limitación, marcadores que codifican para resistencia antibiótica, como por ejemplo el gen nptII el cual confiere resistencia a la kanamicina (Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:4803-4807 (1983)), y los genes que confieren resistencia a la gentamicina, G418, higromicina, estreptomycin, espectinomycin, tetraciclina, cloramfenicol, y similares. Las células y tejidos son cultivados sobre un medio de selección que contiene el antibiótico apropiado, en donde por lo general solamente aquellos transformantes que expresen el marcador de resistencia antibiótica continúen creciendo. Otros tipos de marcadores también son adecuados para su inclusión en el casete de expresión de la presente invención. Por ejemplo, un gen que codifique una tolerancia a los herbicidas, como por ejemplo una tolerancia a la sulfonilurea es útil, o el gen dhfr, el cual confiere resistencia a la metotrexato (Bourouis et al., EMBO J. 2:1099-1104 (1983)). De manera similar, los "genes reporteros" que codifican para enzimas que dan para la producción de un compuesto identificable son adecuados. El gen reportero más ampliamente usado para experimentos de fusión génica ha sido el uidA, un gen de la *Escherichia coli* que codifica la proteína β -glucuronidasa, también conocida como GUS (Jefferson et al., "GUS Fusions: β Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants", EMBO J. 6:3901-3907 (1987)). De manera similar, aquellas enzimas que dan para la producción de un compuesto identificable por luminiscencia, como por ejemplo la luciferasa, son útiles. El marcador de selección empleado dependerá de la especie diana; para ciertas especies diana, se prefieren diferentes antibióticos, herbicidas o marcadores de selección de biosíntesis.

20

25

30

35

Las células y tejidos vegetales seleccionados por medio de un agente inhibitorio u otro marcador de selección son luego evaluadas para identificar la adquisición del gen viral mediante análisis de hibridización con Southern blot, utilizando una sonda específica para los genes virales contenidos en el casete usado para la transformación (Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)).

40

Luego de que el gen de fusión que contiene un constructo de ácido nucleico de la presente invención quede incorporado de manera estable en plantas transgénicas, se puede transferir el transgén a otras plantas por medio de cruces sexuales. Se puede utilizar cualquier técnica de mejoramiento genético estándar dependiendo de la especie que se va cruzar. Una vez producidas plantas transgénicas de este tipo, las plantas en sí pueden cultivarse según procedimientos convencionales para que el constructo de ácido nucleico esté presente en las plantas resultantes. De manera alterna, las semillas transgénicas son recuperadas a partir de las plantas transgénicas. Estas semillas pueden luego ser sembradas en el suelo y cultivadas usando procedimientos convencionales para producir plantas transgénicas.

45

50

La presente invención puede utilizarse en conjunto con una amplia variedad de plantas o sus semillas. Las plantas adecuadas incluyen dicotiledóneas y monocotiledóneas. Plantas de cultivo útiles pueden incluir: alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, papa, camote, frijol, arveja, endivia, lechuga, repollo, coliflor, remolacha, chirivía, nabo, brócoli, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimentón, apio, zanahoria, calabacín, calabaza, zucchini, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, papaya, caña de azúcar y café.

55

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a un método de degradar mananos y polisacáridos en material vegetal. Este método involucra proporcionar material vegetal y ponerlo en contacto con la proteína β -mananasa de la presente invención bajo condiciones efectivas para degradar mananos y polisacáridos en el material vegetal.

60

En una realización preferida, el material vegetal el cual estuvo en contacto con la proteína β -mananasa de la presente invención son granos de café, aunque otros materiales vegetales pueden entrar en contacto en donde la degradación de mananos y polisacáridos es también deseada.

5

También puede ser deseable, según el método de la presente invención, recuperar azúcares solubles a partir del material vegetal degradado, particularmente aquellos que resulten del paso de contactar el material vegetal con la proteína β -mananasa.

10 Estos aspectos de la presente invención están adicionalmente ilustrados por los ejemplos a continuación.

EJEMPLOS

15 Los siguientes ejemplos son suministrados para ilustrar las realizaciones de la presente invención, pero de ninguna manera tienen la intención de limitar su alcance.

Ejemplo 1 Clonación de β -mananasa a partir del ciego gástrico de la Broca (*Hypothenemus hampei*)

Preparación de muestra

20

Las semillas fueron infectadas con insectos adultos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) según se describe en Rubio et al., "Morfología del Sistema Digestivo de *Hypothenemus hampei* (Ferrari)", Cenicafe (Colombia) 58:66-74 (2007). De manera breve, los granos de café infectados fueron disecados utilizando un estereomicroscopio y las larvas fueron recolectadas en un plato Petri. Cada larva fue almacenada a 4°C por al menos 10 minutos para disminuir actividad física y luego colocada en una lámina de vidrio con una gota de agua destilada estéril y disecada bajo un estereomicroscopio Zeiss Estemi 2000 usando pequeños fórceps y agujas *teasing* de 0,15 mm. Para aislar el tejido del ciego gástrico, cada larva fue disecada con una incisión a nivel del protórax y el mesotórax, luego una gran incisión a lo largo de la larva para exponer todo el canal alimenticio. Finalmente, después de la remoción del tejido graso, la región del ciego gástrico fue disecado e inmediatamente depositado en un tubo de microcentrífuga pre-enfriado con 100 μ l de agua destilada estéril que contenía el reactivo ARN Later™ al 0,1%. Todos los tejidos del ciego gástrico disecados fueron almacenados a -80°C hasta lograr la extracción de ARN y proteica.

25

30

Construcción de la Biblioteca YSST de la Broca

35 El ARN fue extraído de los tejidos del ciego gástrico y almacenado a -80°C. El ARN poliadenilado fue aislado a partir del ARN total usando el Oligotex ARNm MidiKit (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. La primera hebra de ADNc fue sintetizada a partir de ARNm usando un cebador N6-*NotI*:

40

5'-GAGAGAGAGAGAGAGAACCGCGCGGCCGCCNNNNNN-3' (SEQ ID NO: 4)

con un Kit de Síntesis de ADNc (Stratagene). Luego de la síntesis de segunda hebra, los ADNc fueron preparados para clonación unidireccional mediante ligación con adaptadores *EcoRI* según las instrucciones del fabricante, seguido por digestión con *NotI*. Los ADNc's fueron luego fraccionados sobre un gel de agarosa al 1% usando electroforesis y aquellos con un tamaño estimado oscilando entre 300 y 1.000 pares de bases escindidos del gel y purificados usando un kit de extracción de gel QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). Los fragmentos fueron ligados a una mezcla de partes iguales de los tres vectores, PYSST0, Pysst1, y pYSST2, digeridos con *EcoRI* y *NotI*. Células electrocompetentes TOP10F' de *Escherichia coli* (Invitro, Carsbad, CA) fueron transformadas con 1 μ g aproximadamente de la biblioteca YSST resultante mediante electroporación (Micropulser Electroporator, Bio-Rad, Hercules, CA) y extendidas sobre 10 a 15 placas LB grandes. El ADN del plásmido fue aislado a partir de una muestra agrupada de los transformantes resultantes utilizando el Perfectprep Plasmid Midi kit (Eppendorf). Cincuenta microgramos de la biblioteca YSST fue transformada en la cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) DBY α 2445 (MAT α , *suc2 Δ -9*, *lys2-801*, *ura3-52*, *ade2-101*) usando el YEASTMAKER Yeast Transformation System 2 (BD Biosciences, San José, CA). Los transformantes fueron extendidos sobre placas de sucrosa YP (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, sucrosa al 2%, agar 2%, pH 6,5), incubados a 30°C por 4 a 9 días, y las colonias visibles fueron trazadas nuevamente sobre la placa de sucrosa seguido de una incubación a 30°C por 2 a 3 días. Los plásmidos fueron aislados a partir de las colonias visibles tal cual se describe en Hoffman y Winston, "A Ten-Minute DNA Preparation from Yeast Efficiently Releases Autonomous Plasmids for Transformation of *Escherichia coli*," Gene 57:267-272 (1987), transformados en *E. coli* electrocompetente XL1-azul y purificados usando un Quiaprep kit (Qiagen). Los insertos de plásmidos fueron secuenciados usando un cebador correspondiente al promotor ADH1 de PYSST0, Pysst1, pYSST2 (5'-TCCTCGTCATTGTTCTCGTTCC-3') (SEQ ID NO:5) en el Bio Resource Center, Cornell University, Ithaca, NY (<http://www.brc.cornell.edu>).

45

50

55

60

Amplificación RACE

5 Un cebador oligonucleótido derivado de la secuencia de ADN correspondiente a las secuencias de señal predichas del clon YSST mananasa aislado fue usado en 3'RACE con el cebador como cebador adaptador. Para obtener la secuencia de ADNc de longitud completa, se realizó un PCR 'touchdown' usando un programa con 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 2,5 minutos con la temperatura de recocido disminuyendo en 1°C cada segundo ciclo hasta 60°C, seguido por una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos PCR fueron subclonados dentro del vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). Las secuencias de ADN fueron determinadas tal cual se describe anteriormente. La β -mananasa del *H. hampei* es una endoglicanasa (endo- β -1,4-D-glucanasa, EC 3.2.1.4). Es una cadena polipeptídica sencilla de 320 aminoácidos, con una masa molecular pronosticada de 35,62 kDa y el pl teórico es de 4,72, calculado a partir de la composición aminoácida.

Ejemplo 2 – Expresión heteróloga de la β -mananasa en células de *Spodoptera frugiperla* (Sf9)

Construcción del plásmido de expresión proteica de fusión

15 Para la construcción del plásmido de expresión etiquetado con mananasa-HIS C-terminal, los ADNc's fueron reamplificados por medio de PCR usando un ADNc de la mananasa en un vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) como plantilla con los siguientes cebadores:

5'-CACCATGGAACCTTTTGTGGTC-3' (SEQ ID NO: 6) y
5'-GACAGGGATGAAGCAGATCTGG-3' (SEQ ID NO: 7).

25 La porción subrayada de la SEQ ID NO: 6 fue introducida para una TOPO clonación direccional. El último cebador inverso carece de codón *stop* en el ADNc nativo de la β -mananasa. El ADNc resultante fue clonado dentro de un vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y designado como pENTR/ β -Mann.

Recombinación y Transfección de ADN de Baculovirus

30 Se realizó una construcción de baculovirus y expresión proteica en células Sf9 según el protocolo del BaculoDirect Baculovirus Expression System de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las células de *Spodoptera frugiperla* (Sf9) fueron transfectadas con ADN bacmid recombinante para la producción de las partículas del baculovirus. Las células fueron cultivadas a 27°C en medio SF900-II (Life Technologies) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Para la transfección, 9×10^5 células fueron transferidas a matraces de cultivo de tejidos de 35 mm e incubadas por una hora en 2 ml de medio SF900-II SFM (Life Technologies) sin antibióticos para permitir así la adhesión de las células a la placa. El medio fue luego cambiado a 1 ml de Sf900-II libre de suero sin antibióticos, que contenía ADN bacmid recombinante (5 μ l de una mini-preparación estándar de ADN del plásmido) que había sido pre-incubado por 30 minutos a temperatura ambiente con CellFectin (6 μ l) (Life Technologies). Las células fueron incubadas con el complejo liposoma-ADN a 27°C por 5 horas. El medio de transfección fue removido y se añadió 2 ml del medio SF900-II que contenía antibióticos. El plásmido pENTTM/Man fue transfectado en células Sf9 y se utilizaron como controles negativo y positivo, respectivamente, ADN bacmid (Bd) recombinante y pENTTM/CAT. Las células transfectadas fueron incubadas a 27°C por 72 horas permitiendo la producción del baculovirus y su liberación en el medio de cultivo. El medio de cultivo de cada transfección fue recolectado, clarificado (500 g por 5 minutos) y almacenado a 4°C como un solución concentrada master viral. Para analizar la eficiencia de la transfección, la producción de baculovirus recombinante (Bv-Man) y baculovirus no recombinante (Bv) fue monitoreada mediante una visualización del efecto citopático demostrado por las células transfectadas dentro de las 48 horas seguidas al proceso de subcultivo bajo un microscopio de contraste de fase y evaluando la presencia del ADN de baculovirus a través de análisis por PCR. Para este efecto, el baculovirus presente en 50 μ l de sobrenadante del cultivo infectado fue sedimentado a 12.000 g por diez minutos en un tubo de microcentrífuga, y un volumen (25 μ l) de buffer de proteinasa K (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; 0,5% SDS) que contenía 50 μ g/ml de proteinasa K (Sambrook et al., 1989) fue añadido al pellet para digerir las proteínas virales por una hora a 56°C. Un calentamiento adicional a 95°C por 20 minutos fue incluido con el fin de inactivar la enzima antes de seguir con el paso de PCR. La amplificación del ADN viral fue llevada a cabo usando 2 μ l de esta preparación de ADN como plantilla en las mismas condiciones y con los mismos cebadores descritos anteriormente. Las células fueron seleccionadas con ganciclovir por 120 horas, y la solución concentrada viral resultante fue amplificada dos veces al infectar las células Sf9.

Amplificación de reservas de Baculovirus

60 Para la amplificación de las soluciones concentradas master de baculovirus, se sembraron 1×10^6 células Sf9 en una matraz de 25 cm² e incubadas por una hora con 10 μ l de la solución concentrada master en 1 ml de medio SF900-II que

5 contenía antibióticos (correspondiente a un MOI de 0.01-0.1). Luego de este periodo, el medio fue completado hasta 4,5 ml y las células infectadas fueron incubadas por 48 horas a 27°C. El medio de cultivo fue recolectado, clarificado (500 g por 5 minutos) y almacenado a 4°C como soluciones concentradas virales para la producción de proteínas recombinantes.

5 Escalado de producción de la β -mananasa recombinante

10 Las células de *S. frugiperla* fueron sembradas en una placa de 225 cm² con 50 ml de medio de cultivo e incubado según la descripción anterior. Las células fueron transfectadas en fase logarítmica usando 500 μ L de una solución concentrada P3 viral (titulación 3,44 x 10⁶ pfu/ml). Luego de 96 horas, el medio de cultivo fue recolectado, clarificado (500 g por 5 minutos) y la β -mananasa recombinante fue purificada usando el MagneHis System[®] (Promega, Madison, WI). Esto resultó en la producción de 2,4 mg de β -mananasa purificada por cada 100 ml de cultivo.

15 Ejemplo 3 – Purificación de β -mananasa recombinante

20 Ensayos *pull-down* con MagneHis Ni-Particles[®] fueron realizados según el protocolo del fabricante. Brevemente, 10 ml de medio de cultivo después de remover células fueron mezclados con 300 μ L de MagneHis Ni-Particles[®] e incubados a temperatura ambiente por dos minutos con una leve agitación. Luego de la incubación, el tubo fue colocado en un atril magnético por 30 segundos para permitir que las MagneHis Ni-Particles[®] sean capturadas por el magneto, y el sobrenadante fue removido. Las MagneHis Ni-Particles[®] fueron lavadas tres veces con el tampón de unión/lavado. La proteína β -mananasa pura etiquetada con 6xHis fue sometida a SDS/PAGE (Figura 1) y un ensayo funcional (Figura 2).

25 Ejemplo 4 – Determinación de la actividad enzimática usando β -Galactomananos provenientes de semillas de algarrobo

30 El galactomanano entrecruzado con azurina fue preparado al tinturar y entrecruzar un polisacárido de galactomanano extraído de harina de semilla de algarrobo (AZCL-galactomannan[®]; Megazyme International Ireland Ltd.). El algarrobo, *Ceratonia siliqua*, es un árbol de hoja perenne, nativo de la región Mediterránea, cultivado por sus vainas de semilla comestibles. Este sustrato es insoluble en soluciones amortiguadas, pero se hidrata rápidamente para formar partículas de gel las cuales son fáciles y rápidamente hidrolizadas por endo-hidrolasas específicas las cuales liberan fragmentos solubles rotulados por tintes según Marraccini et al., "Molecular and Biochemical Characterization of ENDO- β -MANNANASEs from Germinating Coffee (*Coffea arabica*) Grains", *Planta* 213:296-308 (2001). Una alícuota de 20 μ L de la proteína β -mananasa etiquetada con 6x-His mezclada en una solución de sustrato [1% (w/v) AZCL-galactomannan[®] en 0.2M buffer de acetato (pH 5,0)] fue incubada a 37°C con una leve agitación. Alícuotas de 200 μ L fueron removidas cada 30 minutos y calentadas a 100°C por cinco minutos para detener la reacción. Cada alícuota fue centrifugada a 13k rpm por 5 minutos y la absorbancia fue medida a λ_{595} nm (Figura 2).

40 Ejemplo 5 – Determinación de la actividad enzimática usando β -Galactomananos provenientes de granos de café

40 Purificación del β -Galactomanano del café

45 Un procedimiento de fraccionamiento secuencial con base en un tratamiento de deslignificación, un lavado ácido, y subsiguiente extracción alcalina (como en Bradbury et al., "Chemical Structures of Green coffee Bean Polysaccharides", *J. Agric. Food Chem.* 38:389-392 (1990)) fue usado para aislar β -manano puro a partir de granos de café verdes. Granos de café *Coffea arabica* verdes molidos fueron extraídos mediante Soxhlet con cloroformo/metanol (2:1) y éter de petróleo (5 horas) para remover lípidos y con etanol acuoso (95% de un día a otro) para remover carbohidratos de bajo peso molecular. Los granos desprovistos de grasa fueron extraídos usando agua caliente y luego deslignificados con solución de cloruro de sodio débilmente ácida, según el método de Wolfrom y Patin, "Carbohydrates of the coffee Bean. IV. An Arabinogalactan", *J. Org. Chem.* 30:4060-4063 (1965). La mayor parte del polímero de arabinogalactano fue solubilizado, de manera parcialmente hidrolizado, mediante el lavado con ácido hidroc্লórico diluido (1%, 80°C). El manano luego fue aislado en fracciones discretas mediante extracción (durante toda la noche, 4°C) con soluciones de hidróxido de sodio al 2,5% y 10%. Adición de etanol a los extractos de NaOH al 2,5% condujo a un precipitado, que contenía arabinogalactano y manano. Neutralización de los extractos de NaOH al 10% condujo a la rápida formación de un precipitado blanco, el cual fue removido mediante filtración tras permitir a la mezcla reposar durante toda la noche a 4°C. Se obtuvo una fracción adicional mediante la adición de etanol al filtrado. Los precipitados fueron todos lavados con etanol y éter dietílico antes del secado. El sustrato de manano utilizado en este trabajo fue la fracción precipitada mediante neutralización de los extractos de NaOH al 10%, los cuales contenían manano en un 94% por peso.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la β -Mananasa recombinante del *H. hampei*

5 Con el fin de evaluar la actividad enzimática contra los galactomananos del café, la actividad de la β -Mananasa fue determinada mediante el ensayo del ácido dinitrosalicílico de Bernfeld, P. In: Colowick S.P. y Kaplan N.O. (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, Nueva York, páginas 149-158 (1955). El pH óptimo de la actividad enzimática en contra del galactomanano del café fue determinado a diferentes valores de pH en un rango entre 4,0 y 11,0. El buffer era 200 mM de acetato de sodio y 100 mM cloruro de sodio a 37°C. La actividad enzimática más alta fue observada a un pH de 6,0 (Figura 3). El efecto de la temperatura sobre la actividad de la β -Mananasa recombinante en contra del galactomanano del café fue examinado en un rango de temperatura entre 15°C a 70°C usando el mismo buffer a un pH de 6,0 (Figura 4). La enzima mostró una máxima actividad alrededor de los 50°C. La actividad de la enzima disminuyó fuertemente con aumentos adicionales de temperatura.

10

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una proteína β -mananasa aislada que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 90% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. La proteína β -mananasa aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína presenta una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 10
3. La proteína β -mananasa aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína presenta una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
4. La proteína β -mananasa aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína presenta una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 15
5. Un polinucleótido aislado que codifica la proteína β -mananasa de la reivindicación 1.
6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en donde el polinucleótido codifica una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 20
7. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en donde el polinucleótido presenta una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.
8. Un sistema de expresión aislado que contiene el polinucleótido de la reivindicación 5.
- 25
9. Una célula hospedadora aislada que contiene el polinucleótido de la reivindicación 5.
10. La célula hospedadora de la reivindicación 9, en donde la célula hospedadora es seleccionada a partir del grupo que consiste en células vegetales, células de insectos, células bacterianas, y otras células eucarióticas.
- 30
11. Un método de producir de manera recombinante una proteína β -mananasa, comprendiendo dicho método:
proporcionar la célula hospedadora de la reivindicación 9;
cultivar la célula hospedadora bajo condiciones efectivas para que la célula hospedadora exprese la proteína β -mananasa; y
recuperar la proteína β -mananasa.
- 35
12. Un método de degradar mananos y polisacáridos en material vegetal, comprendiendo dicho método:
proporcionar material vegetal; y
contactar el material vegetal con la proteína β -mananasa de la reivindicación 1 bajo condiciones efectivas para degradar mananos y polisacáridos en el material vegetal.
- 40
13. El método de la reivindicación 12, en donde el material vegetal son granos de café.
- 45
14. El método de la reivindicación 12, que además comprende:
recuperar azúcares solubles a partir del material vegetal degradado, como resultado de contactar la materia vegetal y la proteína β -mananasa.

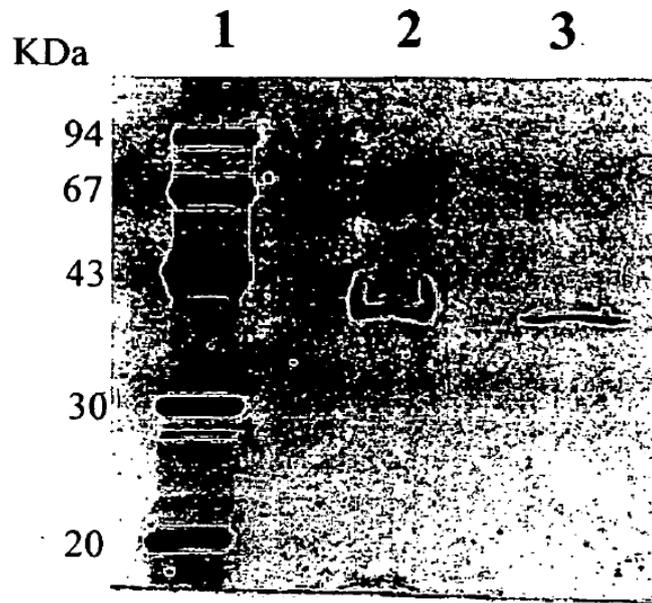


FIGURA 1

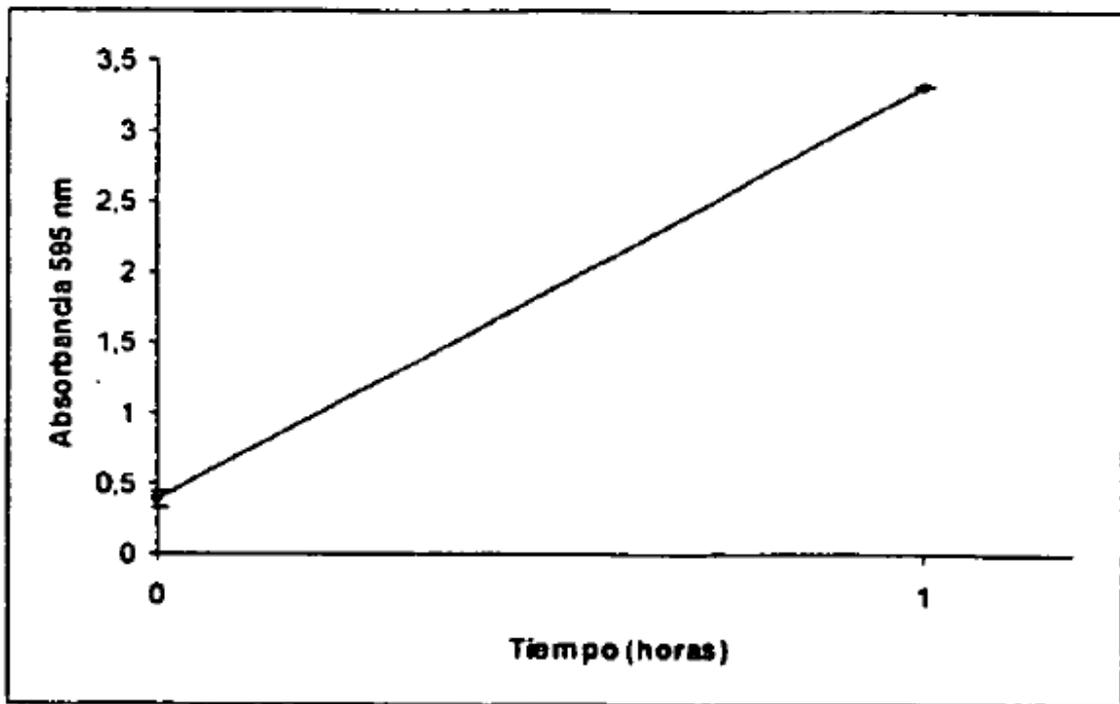


FIGURA 2

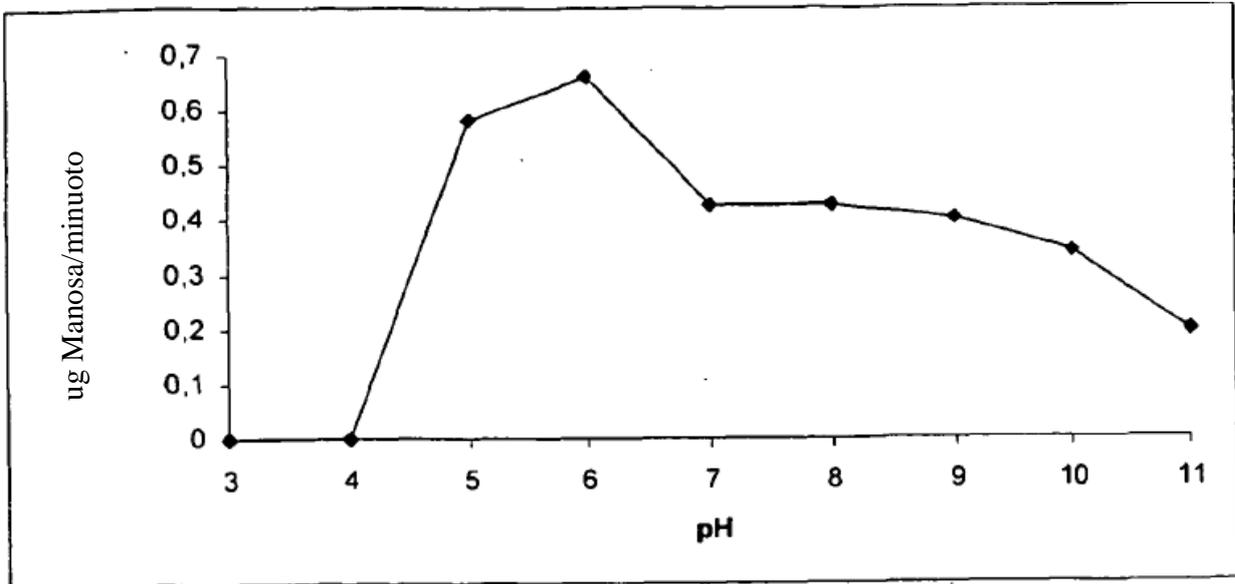


FIGURA 3

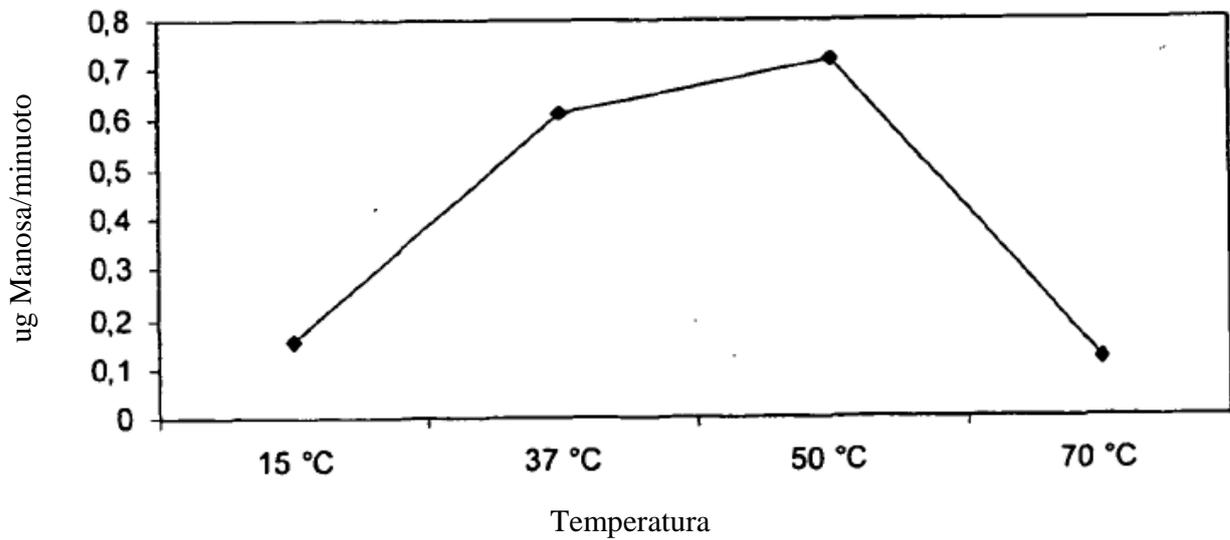


FIGURA 4