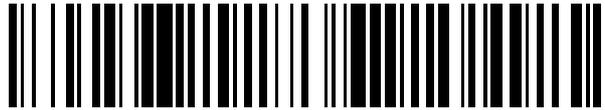


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 788**

51 Int. Cl.:

**C11D 3/386** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2007 E 07787629 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2052078**

54 Título: **Mananasas**

30 Prioridad:

**18.07.2006 EP 06117441**

**18.07.2006 US 831629 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.07.2013**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**LEUTHNER, BIRGITTA;**  
**KENSCH, OLIVER;**  
**KOCH, NADINE;**  
**SOLLOCH, UTE;**  
**COCO, WAYNE;**  
**SCHEIDIG, ANDREAS;**  
**RARBACH, MARKUS;**  
**KETTLING, ULRICH y**  
**HAUPTS, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 410 788 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

## Mananasas

La presente invención proporciona una muteína de mutación de inserción, supresión y/o sustitución de  $\beta$ -mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre que tiene mejor estabilidad térmica, estabilidad proteolítica, actividad específica y/o estabilidad a pH bajo, una molécula de ácido nucleico que codifica dicha muteína mananasa, una composición que comprende dicha muteína mananasa; un método para su preparación, y su uso para el procesamiento de alimentos y piensos, para extracción de café y el procesamiento de los residuos de café, como un suplemento para alimentos y piensos, para blanqueamiento ayudado por enzimas de pulpas de papel, como agente de blanqueamiento y/o de desencolado en la industria textil, para estimulación de un pozo de petróleo de gas por fracturamiento hidráulico, como detergente, para la remoción de biopelículas y en sistemas de suministro, o para el procesamiento de recursos renovables destinados a la producción de combustibles biológicos.

## Antecedentes de la invención

*Hemicelulosa y hemicelulasas*: Las hemicelulosas tienen una estructura química compleja y se conocen a menudo como mananos, xilanos y galactanos sobre la base del tipo de azúcar predominante en la cadena principal. Una gama de polisacáridos tipo manano es sintetizada por medio de una amplia variedad de plantas y se encuentra en diferentes tipos de tejidos de la planta.

El papel principal de las hemicelulosas y los galactomananos es el de actuar como polisacáridos estructurales y / o como energía de reserva. Además de amilosa y amilopectina, que son los polisacáridos de almacenamiento más extendidos en las plantas, existe un grupo diverso de polisacáridos basados en manano que se encuentran en las semillas, raíces, bulbos y tubérculos de diferentes plantas. Estos incluyen mananos, galactomananos y glucomananos. Los mananos están compuestos de cadenas lineales de  $\beta$ -L-4-manano y se encuentran en el endospermo de las semillas de las plantas de ciertas especies de plantas. El manano ha sido aislado de tagua, dátiles o el grano de café verde. En la mayoría de los casos, los mananos son muy insolubles en agua y muy densos. En consecuencia, se ha sugerido que el manano es la base molecular para la dureza que es característica de palmiste, tales como la tagua. Los galactomananos son polisacáridos de reserva en el endospermo de las semillas de plantas de leguminosas. En contraste con los mananos no sustituidos, los galactomananos son solubles en agua y pueden almacenar agua en la semilla. Los polisacáridos pueden estar organizados en estructuras que van desde amorfas irregulares hasta estructuras cristalinas altamente organizadas. El  $\beta$ -(1-4)-D-manano de estructura lineal ha sido encontrado por ejemplo en las paredes celulares de la tagua en dos morfologías, manano-I y manano-II, respectivamente. El primero es de morfología granular, mientras que el segundo es fibrilar.

Debido a la compleja composición estructural de la pared celular de las plantas, los microorganismos que prosperan en el material vegetal en descomposición deben poseer una cantidad de enzimas diferentes que son capaces de hidrolizar estos materiales altamente poliméricos y en su mayoría insolubles. Estos sistemas enzimáticos a menudo comprenden una combinación de enzimas que actúan en forma endo y exo. Las dos principales enzimas que actúan en forma endo involucradas en la degradación de hemicelulosas son  $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -xilanasas. Además, las enzimas  $\beta$ -manosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa que actúan en forma exo son necesarias para la degradación completa de galactoglucomanano. A menudo estas enzimas tienen una estructura modular en la que un dominio catalítico está conectado a través de una región de enlace a un dominio de enlazamiento de carbohidratos (CBD) (Warren (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol, 50: 183 - 212). Sin embargo, se han encontrado otros dominios, tales como módulos de termoestabilización en algunas xilanasas.

*Mananasas*: La endo- $\beta$ -1,4-D-mananasa ( $\beta$ -mananasa, EC 3.2.1.78) cataliza la hidrólisis aleatoria de enlaces manoglicosídicos en polisacáridos a base de manano. La mayoría de las  $\beta$ -mananasas degradan oligosacáridos hasta DP4 (Biely y Tenkanen (1998) Enzymology of hemicellulose degradation, páginas 25 - 47. En Harman y Kubicek (ed) Trichoderma y Gliocladium, vol.2, Taylor y Francis Ltd. Londres), sin embargo, se ha demostrado actividad residual en manotriosa, indicando al menos cuatro subsitios de enlazamiento de manosa en la proteína. Los productos finales principales de la hidrólisis son a menudo manobiosa y manotriosa, aunque también se producen cantidades significativas de manosa. Algunas  $\beta$ -mananasas son capaces de degradar manano cristalino. Además de hidrólisis, en varias  $\beta$ -mananasas incluyendo  $\beta$ -mananasa de *Trichoderma reesei*, se ha demostrado que se forman productos de transglicosilación, ya sea con manosa o con manobiosa como aceptoras del enlace glicosídico.

Las  $\beta$ -mananasas han sido aisladas a partir de una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales. Aunque la mayor parte son extracelulares, algunas  $\beta$ -mananasas parecen estar asociadas a la célula. Su expresión a menudo se induce por medio del crecimiento sobre manano o galactomanano, sin embargo,  $\beta$ -mananasa a partir de *T. reesei* también puede ser inducida por celulosa, mientras que su expresión es reprimida por la glucosa y otros monosacáridos. Frecuentemente múltiples mananasas con diferentes puntos isoeléctricos se encuentran en el mismo organismo, que representa productos de diferentes genes o de diferentes productos del mismo gen, respectivamente.

*Trichoderma reesei* produce un potente sistema de enzimas para la degradación de hemicelulosa (Biely y Tenkanen (1998) *Enzymology of hemicellulose degradation*, páginas 25 - 47. En Harman y Kubicek (ed.) *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2, Taylor y Francis Ltd. Londres), incluyendo la  $\beta$ -mananasa Man5A, que se transcribe a partir del gen man1 (Stalbrand et al. (1995) Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mananasa gene containing a cellulose binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1090 - 1097). Las isoformas con diferentes puntos isoeléctricos se cree que representan diferentes modificaciones posteriores a la traducción tales como glicosilación. La mananasa se compone de un dominio catalítico en el terminal N y un dominio de enlazamiento de celulosa en el terminal C que se conectan a través de un enlazador O-glicosilado rico en Thr / Pro. La estructura del dominio catalítico ha sido resuelto y revela un dominio globular, que pertenece a la clase estructural de barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> (Sabini et al. (2000) The three-dimensional structure of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 56: 3 - 13). Se podrían identificar una ranura que enlaza un sustrato superficial, y dos laminas  $\beta$  adicionales que no se han conservado en otras proteínas de tipo barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>.

En general, las  $\beta$ -mananasas tienen una temperatura óptima moderada entre 40° C y 70° C, excepto algunas  $\beta$ -mananasas de termófilos (Politz et al. (2000) A highly thermostable endo-1,4- $\beta$ -mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 715 - 721). El pH óptimo está en la región neutra o ácida, por ejemplo un pH 5,0 para  $\beta$ -mannanase de *T. reesei* (Arisan-Atac et al. (1993) Purification and characterisation of a  $\beta$ -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 58 - 62). Los pesos moleculares de las enzimas están en el rango entre 30 kD y 80 kD.

El documento WO 03/012110 divulga, entre otros, una secuencia de aminoácidos de mananasa del organismo del hongo *Hypocrea jecorina*, que es un sinónimo de *Trichoderma reesei*.

Estabilidad de la enzima: La estabilidad (incluida termoestabilidad, estabilidad frente al pH y estabilidad frente a la digestión proteolítica) y la actividad bajo condiciones de aplicación es un parámetro crítico para muchas enzimas aplicadas industrialmente, ya que estas enzimas a menudo tienden a ser insuficientemente estables o insuficientemente activas bajo condiciones de aplicación. Por ejemplo, una alta termoestabilidad permite una dosificación más baja de la enzima debido a una actividad más prolongada bajo condiciones de proceso de alta temperatura y por lo tanto proporciona una ventaja comercial. Muchos organismos mesófilos y termófilos expresan variantes de la enzima que se adaptan a las respectivas condiciones de temperatura en las cuales los organismos se desarrollan. Mientras que las especies mesófilas tienden a tener menos enzimas termoestables, los organismos termófilos deben poseer enzimas muy estables. Una comparación de enzimas homólogas de organismos termófilos y mesófilos revela dos mecanismos básicos para el aumento de la estabilidad. Uno de ellos está "basado en la estructura", donde las enzimas hipertermófilas son significativamente más compactas que sus contrapartes mesófilas. La estabilidad se ve reforzada por el gran número de interacciones. En contraste, el así llamado mecanismo "basado en la secuencia" utiliza un pequeño número de interacciones aparentemente fuertes que son responsables de la alta estabilidad térmica (Berezovsky y Shakhnovich (2005) *Physics and evolution of thermophilic adaptation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102: 12742 - 12747). Se han descrito  $\beta$ -mananasas de mesófilos (Braithwaite et al. (1995) A non-modular endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. *Biochem. J.* 305: 1005 - 1010; Tamaru et al. (1995) Purification and characterisation of an extracellular  $\beta$ -1,4-mannanase from a marine bacterium *Vibrio* sp. strain MA-138, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4454 - 4458) y bacterias termófilas (Duffaud et al. (1997) Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4428 - 4432; Gibbs et al. (1996) Sequencing, cloning and expression of a beta-1,4-mannanase gene, manA, from the extremely thermophilic anaerobic bacterium *Caldicellulosiruptor Rt8B.4* *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 37 - 43; Bicho et al. (1991) The characterization of a thermostable endo- $\beta$ -mannanase cloned from *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 337 - 343).

Las enzimas que se utilizan en grandes cantidades en los procesos técnicos deben ser producidas a costos relativamente bajos para permitir un proceso comercialmente viable. Esto implica la disponibilidad de un huésped para la producción eficiente que produzca e idealmente secrete la enzima objetivo a razón de varios gramos por litro de cultivo. La expresión heteróloga de mananasas termoestables ha sido descrita en *E. coli* (Parker et al. (2001) Galactomannanases Man2 y Man5 from *Thermotoga* Species: Growth, physiology on galactomannans, gen sequence analysis and biochemical properties of recombinant enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 322 - 333) y *S. cerevisiae* (Stalbrand y col. (1995) Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1090 - 1097) con muy bajo rendimiento. Sin embargo, la mananasa de *T. reesei* ha sido expresada en *Pichia pastoris* con un rendimiento de 10 g/l (Hägglund (2002) Thesis, Lund University, Sweden). Por otra parte, *Trichoderma reesei* es un huésped bien conocido para la producción de una variedad de enzimas industriales y sobreexpresión homóloga de variantes de mananasa o de mananasa termoestable, puede resultar en un alto rendimiento de una enzima procesada naturalmente.

Aplicaciones de las enzimas mananasa: El uso de enzimas mananasa se ha generalizado en aplicaciones de

- alimentos y piensos, la industria de detergentes y de pulpa y papel. El uso de enzimas mananasa como aditivos para piensos ha demostrado que proporciona diferentes efectos benéficos. Estos beneficios se observan en combinación con piensos tales como guar, copra, palmiste, y de soja que contienen cantidades significativas de mananos. Para los animales monogástricos tales como aves de corral y cerdos, los mananos son componentes de los piensos en gran parte no digeribles que actúan como factores antinutricionales. Los efectos negativos de los mananos reportados son reducciones en el crecimiento de los animales, eficiencia de los piensos y valor nutricional de los piensos (Lee et al. (2005) Effects of guar meal byproduct with and without beta-mannanase Hemicell on broiler performance. Poult.Sci. 84: 1261 - 1267).
- 5
- Por el contrario, cuando se añade mananasa por ejemplo, a las dietas de maíz y soja para gallinas ponedoras aumenta la producción de huevos y el peso de los huevos (Jackson et al. (1999) Effects of beta-mannanase in corn-soybean meal diets on laying hen performance. Poult. Sci. 78: 1737 - 1741).
- 10
- Las enzimas mananasa también se utilizan en combinación con otras carbohidrasas en dietas de animales que se ha demostrado que mejoran el rendimiento del crecimiento y digestibilidad de los nutrientes (Kim et al. (2003) Use of carbohidrasas in corn-soybean meal-based nursery diets. J. Anim. Sci. 81: 2496 - 2504).
- 15
- Las enzimas mananasas añadidas a dietas de maíz - soja para cerdos mejoran la eficiencia de los piensos de los cerdos destetados mayores. Por otra parte, la ganancia diaria y la eficiencia de los piensos se mejoró en cerdos en su última etapa de crecimiento. Además, la enzima mananasa aumentó la ganancia de carne magra de los cerdos de engorde (Pettey et al. (2002) Effects of beta-mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weanling and growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 80: 1012 - 1019).
- 20
- En la industria de los alimentos las enzimas mananasa se describen para uso en la producción de café instantáneo en donde la enzima reduce la viscosidad de la extractos de café, debido a la hidrólisis del manano del café. Esto conduce a la reducción de costos de energía en el proceso de secado involucrado en la producción de café instantáneo.
- 25
- Las mananasas se utilizan para producir oligómeros de manano específicos que son de interés como ingredientes funcionales para alimentos. En particular, los oligómeros de manano con una funcionalidad prebiótica son de interés en esta aplicación. En tales aplicaciones, se someten polímeros de manano derivados de plantas a hidrólisis por medio de mananasas.
- 30
- Además, las enzimas mananasa se utilizan en composiciones detergentes debido a su actividad hidrolítica del manano. Aquí las mananasas facilitan la remoción de manchas / suciedad derivados de alimentos y cosméticos que a menudo comprenden aditivos que contienen manano como estabilizantes, emulsionantes y espesantes. Estos aditivos forman una parte importante de las manchas / suciedad pertinentes al consumo.
- 35
- Para tales aplicaciones detergentes, también se utilizan mananasas en combinación con otras enzimas que se encuentran en formulaciones de detergentes tales como amilasas, celulasas, lipasas, proteasas, pectinasas y endoglucanasas. En aplicaciones más específicas de limpieza, se aplican mananasas para remover los biopelículas de superficies o de tuberías que deben estar libres de microbios, tales como equipos farmacéuticos. En esta aplicación, a menudo se utilizan mananasas en combinación con detergentes y otras enzimas tales como carbohidrasas y proteasas.
- 40
- Otra aplicación para las enzimas mananasa es el blanqueamiento asistido por enzimas de pulpa de papel. Aquí las mananasas pueden complementar la acción de las xilanasas que se utilizan tradicionalmente en el blanqueamiento asistido por enzimas de la pulpa. Debido a su diferente actividad, la mananasa hidroliza por ejemplo, las partes de glucomanano de las fibras de la pulpa que no son hidrolizadas por las xilanasas.
- 45
- El efecto del tratamiento enzimático sobre la capacidad para blanquear la pulpa depende por una parte de la especie de la madera y por otro lado del tipo de cocción (por ejemplo, la pulpa kraft (cocción con sulfato) o método del sulfito). En este sentido, se encontró que el tratamiento con mananasa era especialmente efectivo en el mejoramiento de la capacidad de blanqueamiento de pulpas producidas por medio de métodos de pulpeo modificados o continuos que generalmente exhiben un bajo contenido de lignina (Suurnakki et al. (1997) Hemicellulase in the bleaching of chemical pulps. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 57: 261 - 287).
- 50
- Además, las enzimas mananasa se aplican en el proceso de estimulación de pozos de petróleo y de gas por fracturación hidráulica. Aquí las enzimas mananasa reducen la viscosidad de un proceso relevante de solución de guar que, mezclado con arena, se aplica en los requerimientos y necesidades que se licuan en una cierta etapa de la aplicación. Como el proceso de fracturación hidráulica implica típicamente altas temperaturas, se desean mananasas termoestables (McCutchen y col. (1996) Characterization of Extremely Thermostable Enzymatic Breakers (Alpha-1,6-Galactosidase and Beta-1,4-Mannanase)) from the hipertermophilic bacterium Thermotoga-

Neapolitana-5068 for hydrolysis of guar gum. *Biotechnology and Bioengineering* 52: 332 - 339).

Otra aplicación para las mananases es la liberación controlada de fármacos o de otros materiales a partir de matrices que se componen de galactomananos con enlaces cruzados. Se demostró, por ejemplo, que un hidrogel de galactomanano con enlaces cruzados puede servir como un sistema de administración de un fármaco específico para el colon de una forma tal que libera bacterias que segregan mananases. La mayoría de los procesos técnicos detallados anteriormente se llevan a cabo a temperaturas elevadas, por lo tanto se prefieren las enzimas con una alta estabilidad térmica. Aunque se han descrito mananases termoestables, ellas sufren potencialmente de una pobre productividad técnica. La *Trichoderma reesei* está bien establecida para la producción con alto rendimiento de proteínas, en particular de proteínas homólogas, produciendo decenas de gramos por litro de cultivo. También se requiere termoestabilidad para los aditivos para piensos que se incorporan en las mezclas de piensos antes de un procedimiento de granulación que incluye altas temperaturas. Adicionalmente, las mananases que pueden ser aplicadas como aditivos para piensos deben ser estables a bajo pH y a la pepsina y tienen que ser activas a pH bajo con el fin de ser capaces de trabajar de forma eficiente en el estómago por ejemplo, de animales monogástricos.

En el documento USRE38.047 se divulga un suplemento de hemicelulasa que sirve para mejorar la eficiencia energética del pienso para animales que contiene hemicelulosa. Sin embargo, a pesar de ser de origen bacteriano (Bacilos), dicha hemicelulasa es una hemicelulasa de tipo silvestre que carece de propiedades mejoradas introducidas en la enzima por diseño. Sobre todo, dicha hemicelulasa tiene únicamente termoestabilidad limitada. Cuando se trata con una temperatura por encima de 60° C, la actividad de la enzima se reduce significativamente. Esta es una grave desventaja cuando se trata del pretratamiento de piensos animales. Aquí el peletizado del pienso es un proceso importante que mejora el suministro de pienso, así como la calidad en términos de digestibilidad y de la carga microbiana. La carga microbiana se reduce significativamente a temperatura de peletización elevada, por ejemplo, 70° C. Debido al hecho de que dicha mananasa ofrece únicamente una estabilidad térmica limitada, la mananasa tiene que ser añadida al pienso después de la peletización. Esto se logra generalmente mediante rociando dicha mananasa sobre los gránulos, lo que sin embargo ofrece grandes dificultades en términos de dosificación en forma precisa y reproducible de la enzima. Además, esta es una etapa extra del proceso que no es económicamente favorable.

#### Resumen de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar mananases termoestables, estables al pH y estables a la pepsina, activas a valores de pH bajos como el presente en el estómago y la parte superior del intestino de los animales y el buche, el estómago y la parte superior del intestino de las aves de corral. Además, es un objetivo de la invención el proporcionar mananases con una alta homología de secuencia con la mananasa de *Trichoderma reesei*, lo que permite una producción de alto rendimiento en ese organismo. Por lo tanto, la presente invención también está dirigida a un método para la producción de mananases en *Trichoderma reesei*, activas a valores de pH bajos como el presente en el estómago y en la parte superior del intestino de los animales y el buche, el estómago y la parte superior del intestino de las aves de corral. Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar una mananasa que pueda ser añadida al pienso para animales antes de la peletización, con el fin de permitir una dosificación precisa y reproducible de la enzima, y evitar una etapa de rocío adicional en la preparación del pienso.

Se encontró que los objetivos anteriores pueden ser resueltos por medio de ciertas modificaciones de la secuencia primaria de la proteína mananasa. La invención proporciona por lo tanto

(1) una  $\beta$ -mananasa modificada que se deriva de la mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre que se muestra en la SEQ ID NO: 1 mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la posición 274 con relación a la numeración de dicha mananasa de tipo silvestre por leucina (L) o metionina (M) u homólogos de los mismos que comprenden al menos una de dichas sustituciones de aminoácidos de leucina (L) o metionina (M) en dicha posición 274 con respecto a la numeración de dicha mananasa de tipo silvestre, en donde dicha mananasa modificada, o dichos homólogos, tienen una mayor termoestabilidad con relación a la mananasa de tipo silvestre y en donde en los homólogos tienen una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1.

(2) una molécula de ácido nucleico que codifica la mananasa modificada tal como se define en (1) más arriba, o el complemento de la misma;

(3) un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en (2) más arriba;

(4) una célula huésped que es transformada con el vector como se define en (3) más arriba y/o que comprende el ADN como se define en (2) más arriba;

(5) un método para la preparación de la mananasa modificada tal como se define en (1) más arriba, que comprende el cultivo de la célula huésped tal como se define en (4) más arriba y el aislamiento de la mananasa modificada a partir del cultivo;

(6) una composición que comprende la mananasa modificada tal como se define en (1) más arriba; y

(7) el uso de la mananasa modificada como se define en (1) más arriba para el procesamiento de alimentos y piensos, para la extracción de café y el procesamiento de los residuos de café, como un suplemento para alimentos y piensos, para el blanqueamiento asistido por enzimas de pulpas de papel, como agente de blanqueamiento y/o de desencolado en la industria textil, para la estimulación de un pozo de petróleo y de gas por fractura hidráulica, como detergente, para la remoción de biopelículas y en sistemas de suministro, o para el procesamiento de recursos renovables destinados a la producción de combustibles biológicos.

Otras realizaciones, que no hacen parte de la presente invención, están dirigidas a

(1) una  $\beta$ -mananasa modificada que se deriva de la mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre mostrada en la SEQ ID NO: 1 mediante inserción, supresión y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácido de dicha mananasa de tipo silvestre y tiene uno o más de los siguientes fenotipos mejorados con respecto a la mananasa de tipo silvestre: aumento de la termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica, aumento de la actividad específica y la mejora de la estabilidad a pH bajo, o variantes, formas modificadas, homólogos, proteínas de fusión, equivalentes funcionales o fragmentos de los mismos;

(2) una molécula de ácido nucleico que codifica la mananasa modificada tal como se define en (1) más arriba, o el complemento de la misma;

(3) un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en (2) más arriba;

(4) una célula huésped que es transformada con el vector como se define en (3) más arriba y/o que comprende el ADN como se define en (2) más arriba;

(5) un método para la preparación de la mananasa modificada tal como se define en (1) más arriba, que comprende el cultivo de la célula huésped tal como se define en (4) más arriba y el aislamiento de la mananasa modificada a partir del cultivo;

(6) una composición que comprende la mananasa modificada tal como se define en (1) más arriba; y

(7) el uso de la mananasa modificada como se define en (1) más arriba para el procesamiento de alimentos y piensos, para la extracción de café y el procesamiento de los residuos de café, como un suplemento para alimentos y piensos, para el blanqueamiento asistido por enzimas de pulpas de papel, como agente de blanqueamiento y/o de desencolado en la industria textil, para la estimulación de un pozo de petróleo y de gas por fractura hidráulica, como detergente, para la remoción de biopelículas y en sistemas de suministro, o para el procesamiento de recursos renovables destinados a la producción de combustibles biológicos.

Debe entenderse que la terminología usada en este documento es para los propósitos de describir realizaciones particulares únicamente, y no se pretende que sea limitante. Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias tanto a la forma singular y/o plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Debe entenderse además que, en el caso de presentarse intervalos de parámetros que estén delimitados por valores numéricos, se considera que estos intervalos incluyen estos valores de limitación.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Comparación de la mananasa de *Trichoderma reesei* y la variante S3R con respecto a la estabilidad y la actividad térmica.

Figura 2: Termoestabilidad de mananasas de tipo silvestre y variantes en amortiguador expresada como actividad residual normalizada a la actividad a 25° C.

Figura 3: Rendimiento de manosa después de la incubación de diferentes variantes de mananasa con sustrato de galactomanano durante 16 horas a diferentes temperaturas, normalizadas a 63° C.

Figura 4: Termoestabilidad de mananasa de tipo silvestre y variantes expresada como actividad residual después de la incubación con sustrato de una torta de presión de palmiste (PKE) a diferentes temperaturas durante 71 h.

Figura 5: Rendimiento de manosa después de la incubación de mananasa de tipo silvestre y las diferentes variantes con sustrato PKE a diferentes temperaturas y tiempos.

Figure 6: Rendimiento de manosa después de la incubación de mananasa de tipo silvestre y diferentes concentraciones de la variante B con sustrato PKE a dos temperaturas.

Figura 7: Estabilidad de diferentes variantes de mananasa contra incubación a pH 2,3 y pepsina a pH 2,3.

Figura 8: Actividad de diferentes variantes de mananasa en el sustrato PKE a valores de pH por debajo de pH 5,5.

- 5 Figura 9: Comparación de la liberación de manosa a partir de goma guar, goma de semilla de algarroba y glucomanano de konjac, todas tratadas con una mananasa de acuerdo con la invención.

#### Definiciones

- 10 El término "mananasa" se refiere a cualquier enzima capaz de hidrolizar cadenas de poliosa que se componen de unidades de manosa (manopolímeros o polimanasas). La "mananasa" por lo tanto, comprende tanto endomanasas como exomanasas que escinden manopolímeros internamente o a partir de los extremos terminales del polímero, respectivamente.

El término "equivalente funcional de una mananasa" o "equivalente funcional de la misma" significa que la enzima tiene que tener aproximadamente las mismas características funcionales que aquellas de la mananasa de *Trichoderma reesei*.

- 15 El término "forma modificada" o "variante" significa que la enzima ha sido modificada a partir de su forma original (tipo silvestre), pero retiene las mismas características funcionales enzimáticas que aquellas de la mananasa de *Trichoderma reesei*.

- 20 El término "proteínas de fusión" comprende todas las proteínas derivadas de la mananasa original o de cualquier variante de la misma fusionando en forma covalente secuencias adicionales de aminoácidos en el terminal C y/o N. La fuente y la composición de la secuencia adicional de aminoácidos es o bien natural a partir de cualquier organismo viviente o de virus, o no natural.

El término "fragmento funcional" o "fragmento efectivo" significa un fragmento o porción de la mananasa de *Trichoderma reesei* o derivado de la misma que retiene aproximadamente la misma función o efecto enzimático.

- 25 El término "mananasa homóloga" de acuerdo con la presente invención comprende cualquier enzima con una identidad de secuencia de al menos 70% o preferiblemente al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% con respecto a la mananasa original.

El término "polinucleótido" corresponde a cualquier material genético de cualquier longitud y cualquier secuencia, que comprende moléculas de ADN y ARN monocatenarias y bicatenarias, incluyendo elementos reguladores, genes estructurales, grupos de genes, plásmidos, genomas completos y fragmentos de los mismos.

- 30 El término "posición" en un polinucleótido o polipéptido se refiere a bases o aminoácidos individuales específicos en la secuencia del polinucleótido o el polipéptido, respectivamente.

- 35 El término "polipéptido" comprende proteínas tales como enzimas, anticuerpos y similares, polipéptidos de longitud media tales como inhibidores de péptidos, citoquinas y similares, así como péptidos cortos hasta llegar a una secuencia de aminoácidos con una longitud por debajo de diez, tales como ligandos receptores peptídicos, hormonas peptídicas y similares.

- 40 El término "variantes de mananasa" significa cualquier molécula de mananasa obtenida por medio de mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, inserción, supresión, recombinación y/o cualquier otro método de ingeniería genética de proteínas, que conduce a que las manasas difieran en su secuencia de aminoácidos de la mananasa original. Los términos "mananasa de tipo silvestre", "enzima de tipo silvestre", o "de tipo silvestre", de acuerdo con la invención describe una enzima mananasa con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

La "mananasa original" puede ser o bien una mananasa de tipo silvestre aislado, o una o más variantes de mananasa seleccionadas de una biblioteca de manasas.

- 45 El término "biblioteca de manasas" describe al menos una variante de mananasa o una mezcla de manasas en la cual cada mananasa individual, respectivamente cada variante de mananasa, es codificada por una secuencia de polinucleótido diferente. El término "biblioteca de genes" indica una biblioteca de polinucleótidos que codifica la biblioteca de manasas.

El término "aislada" describe cualquier molécula separada de su fuente natural.

5 El término "mutación" se refiere a la sustitución o el reemplazo de tripletas de nucleótidos individuales o múltiples, inserciones o supresiones de uno o más codones, recombinación homóloga o heteróloga entre diferentes genes, fusión de secuencias de codificación adicionales en cualquier extremo de la secuencia de codificación, o inserción de secuencias de codificación adicionales o cualquier combinación de estos métodos, que resulta en una secuencia de ácido polinucleico que codifica la proteína deseada. Por lo tanto, el término "mutaciones" también se refiere a todos los cambios en la secuencia del polipéptido codificados por la secuencia de ácido polinucleico modificada por uno o más de los cambios descritos anteriormente. Los residuos de aminoácidos se abrevian de acuerdo con la siguiente Tabla 1, ya sea con un código de una o de tres letras.

10 El término "molécula de ácido nucleico" está destinado a indicar cualquier molécula de ácido nucleico monocatenaria o bicatenaria de ADNc, ADN genómico, ADN o ARN sintético, origen de PNAS o LNA.

15 El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su subsecuencia objetivo, pero no a otras secuencias. Condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridarán específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5° C menores que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica con una fuerza iónica y pH definidos. La Tm es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual 50% de las sondas complementarias con la secuencia objetivo hibridan con la secuencia objetivo en equilibrio. (Como las secuencias objetivo están generalmente presentes en exceso, a la Tm, 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio).  
 20 Típicamente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es aproximadamente menor a 1,0 M de ion Na, típicamente aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH de 7,0 hasta 8,3 y la temperatura es aproximadamente al menos de 30° C, para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60° C, para sondas más largas. También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida y similares.

25 El término "fragmento de la molécula de ácido nucleico" está destinado a indicar un ácido nucleico que comprende un subconjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas.

Lo mismo es aplicable al término "fracción de la molécula de ácido nucleico".

30 El término "variante de la molécula de ácido nucleico" se refiere aquí a una molécula de ácido nucleico que es sustancialmente similar en estructura y actividad biológica a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas.

El término "homólogo de la molécula de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico cuya secuencia tiene uno o más nucleótidos añadidos, suprimidos, sustituidos o bien químicamente modificados en comparación con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas, siempre y cuando que el homólogo retenga sustancialmente las mismas propiedades de enlazamiento que este último.

35 El término "derivado", como se utiliza aquí, se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene características de enlazamiento similares a una secuencia de ácido nucleico objetivo como una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas.

Tabla 1: abreviaturas de aminoácidos

Abreviaturas		Aminoácidos
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina

(continuación)

Abreviaturas		Aminoácidos
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

5 Las mutaciones se describen por medio del uso de la siguiente nomenclatura: residuo de amino ácido en el andamiaje de la proteína; posición; residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s). De acuerdo con esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un residuo de alanina por un residuo de glicina en la posición 20 se indica como Ala20Gly o A20G. La supresión de alanina en la misma posición se muestra como Ala20 \* o A20 \*. La inserción de un residuo adicional de aminoácido (por ejemplo, una glicina) se indica como Ala20AlaGly o A20AG. La supresión de un tramo consecutivo de residuos de aminoácidos (por ejemplo, entre alanina en la posición 20 y glicina en la posición 21) se indica como  $\Delta$  (Ala20-Gly21) o  $\Delta$  (A20-G21). Cuando una secuencia contiene una supresión en comparación con la presente proteína utilizada para la numeración, una inserción en tal posición (por ejemplo, una alanina en la posición suprimida 20) se indica como \* 20Ala o \* 20A. Las mutaciones múltiples se separan por medio de un signo más o una barra. Por ejemplo, dos mutaciones en las posiciones 20 y 21 sustituyendo alanina y ácido glutámico por glicina y serina, respectivamente, se indican como A20G + E21S o A20G/E21S. Cuando un residuo de aminoácido en una posición dada se sustituye con dos o más residuos alternativos de aminoácidos, estos residuos están separados por medio de una coma o una barra. Por ejemplo, la sustitución de alanina en la posición 30 ya sea con glicina o ácido glutámico se indica como A20G, E o A20G / E, o A20G, A20E. Cuando se identifica allí una posición adecuada para la modificación sin sugerir ninguna modificación específica, se entiende que cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido presente en la posición. Por lo tanto, por ejemplo, cuando una modificación de una alanina en la posición 20, se menciona pero no se especifica, se entiende que la alanina puede ser suprimida o sustituida por cualquier otro residuo de aminoácido (es decir, cualquiera de R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V).

15 Los términos "mutación conservadora", o "sustitución conservadora", respectivamente, se refieren a una mutación de aminoácido que una persona capacitada en la técnica consideraría una mutación conservadora con una primera mutación. "Conservadora" en este contexto significa un aminoácido similar en términos de las características del aminoácido. Si, por ejemplo, una mutación conduce en una posición específica a una sustitución de un residuo de aminoácido no alifático (por ejemplo, Ser) con un residuo de aminoácido alifático (por ejemplo, Leu) entonces, una

5 sustitución en la misma posición con un aminoácido alifático diferente (por ejemplo, Ile o Val) se conoce como una mutación conservadora. Otras características de aminoácidos incluyen tamaño del residuo, hidrofobicidad, polaridad, carga, valor de pK, y otras características del aminoácido conocidas en la técnica. Por lo tanto, una mutación conservador puede incluir una sustitución tal como básica por básica, ácida por ácida, polar por polar, etc. Los conjuntos de aminoácidos así obtenidos son probablemente conservados por razones estructurales. Estos conjuntos pueden ser descritos en la forma de un diagrama de Venn (Livingstone C. D. y Barton G. J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the herarchical analysis of residue conservation" *Comput. Appl. Biosci.* 9: 745 - 756; Taylor W. R. (1986) "The classification of amino acid conservation" *J. Theor. Biol.* 119: 205 - 218). Las sustituciones conservadoras pueden hacerse, por ejemplo, de acuerdo con la tabla a continuación que describe un diagrama de Venn generalmente aceptado que agrupa los aminoácidos.

Tabla 2: diagrama de Venn que agrupa los aminoácidos

Conjunto		Subconjunto	
Hidrófobo	FWYHKMILVAGC	Aromático	FWYH
		Alifático	ILV
Polar	WYHKREDCSTNQ	Cargado	HKRED
		Cargado positivamente	HKR
		Cargado negativamente	ED
Pequeño	VCAGSPTND	Minúsculo	AGS

15 El término "actividad catalítica" o "actividad" describe cuantitativamente la conversión de un sustrato dado bajo condiciones de reacción definidas. El término "actividad residual" se define como la relación de la actividad catalítica de la enzima bajo un cierto conjunto de condiciones respecto a la actividad catalítica bajo un conjunto diferente de condiciones. Por lo tanto la actividad residual  $a_i$  está dada por  $a_i = v_i/v_0$  en donde  $v$  denota cualquier medición de actividad catalítica y  $a_i \cdot 100$  es la actividad relativa en porcentaje. El término "actividad específica" describe cuantitativamente la actividad catalítica por cantidad de enzima bajo condiciones de reacción definidas.

20 El término "termoestabilidad" describe la propiedad de una proteína para resistir una exposición limitada al calor sin perder su actividad a temperaturas más bajas, por ejemplo, a la temperatura donde su actividad se puede ser medida. El término "estabilidad al pH" describe la propiedad de una proteína para resistir una exposición limitada a valores de pH que se desvían significativamente del pH donde su estabilidad es óptima, por ejemplo, más de una unidad de pH por encima o por debajo del pH óptimo, sin perder su actividad bajo condiciones en donde su actividad puede ser medida.

25 El término "estabilidad proteolítica" describe la propiedad de una proteína para resistir una exposición limitada a proteasas bajo condiciones en donde las proteasas son activas, sin perder actividad bajo condiciones en donde su actividad puede ser medir.

30 El término "plásmido", "sistema de vector" o "vector de expresión" significa una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*. En el contexto de la presente invención estas construcciones se pueden utilizar para introducir genes que codifican enzimas en células huésped.

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprenda ya sea la molécula de ácido nucleico o un vector de expresión como se describió anteriormente y que se usa en la producción recombinante de una enzima que tiene las propiedades específicas como se definen aquí o en los métodos de la presente invención.

35 La "temperatura de inactivación" se define como la temperatura a la cual la actividad residual de una enzima mananasa después de incubación durante un cierto período y posterior enfriamiento a temperatura ambiente es 50% de la actividad residual de la misma enzima mananasa incubada durante el mismo período bajo las mismas condiciones a temperatura ambiente.

El término "recursos renovables" se refiere a sustratos de biomasa que crecen y se cosechan, como cultivos, paja,

madera y productos de madera. El término "combustibles biológicos" se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso que consiste de, o se deriva de biomasa, tal como biodiesel, biogás, aceite vegetal, bioetanol, biohidrógeno, bio-dimetil éter, biometanol, BTL ("biomasa a líquido") - combustible, GTL ("gas a líquido"), combustible, y similares.

5 Descripción detallada de la invención

La invención provee una  $\beta$ -mananasa modificada que se deriva de la mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre mostrada en la SEQ ID NO: 1 por medio de la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la posición 274 con relación a la numeración de dicha mananasa de tipo silvestre por leucina (L) o metionina (M) u homólogos de los mismos, que comprenden al menos una de dichas sustituciones de aminoácidos de leucina (L) o metionina (M) en la posición 274 con respecto a la numeración de dicha mananasa de tipo silvestre, en donde dicha mananasa modificada, o dichos homólogos de la misma, tienen una mayor termoestabilidad con relación a la mananasa de tipo silvestre y en donde los homólogos tienen una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1.

10 En una realización de la mananasa modificada, el residuo en la posición 274 es sustituido por leucina (L) y la mananasa modificada comprende además una sustitución en una o más de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de

- L207F,

- T201 S, Q280R,

- A215T; N282D,

20 - Y220F,

- V187M,

- V181A,

- V148I,

- N173H; N331S,

25 - N13D,

- Q317H,

- F4Y; I70V,

- Q101R; Q281H,

- T201 G; L207F,

30 - T201 S; L207F,

- V181T; L207W; A215T,

- K74M; A313T; V325I,

- N173H; V181H; L207W,

- T201S; L207Y; Q280R,

35 - T201S; L207W; Q280R,

- T201S; L207R; Q280R,

- N173H; L207W,

- 215T; Q280R,

- V181H; L207W,

- A215T; N282D,

- N173H; V181T; T201S; L207W,

5 - N173H; V181H; L207W; A215T,

- V181H; L207W,

- A215T; Q280R; N282D,

- N173H; V181T; L207W; A215T; Q280R; N282D.

10 En una realización adicional, (i) la sustitución se localiza en la segunda mitad de la molécula y los cambios se presentan en una posición de 200 o superior, de acuerdo con la numeración de la mananasa de tipo silvestre dada en la SEQ ID NO: 1; y/o (ii) el número de sustituciones es de 2 a 30, de 2 a 10, y/o de 2 a 5.

15 La presente divulgación proporciona enzimas con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 u homólogos de la misma, o que comprende una o más inserciones, supresiones o mutaciones o cualquier combinación de los mismos y en donde una mananasa homóloga comprende cualquier enzima con una identidad de secuencia de al menos 90% o preferiblemente al menos 95%, 97% o 99%, preferiblemente con la SEQ ID NO: 1.

20 El término "equivalente funcional del mismo" significa que la enzima tiene que tener aproximadamente las mismas características funcionales que aquellas de la mananasa de *Trichoderma reesei*. El término "forma modificada" o "variante" significa que la enzima ha sido modificada a partir de su forma original, pero conserva las mismas características enzimáticas funcionales que aquellas de la mananasa de *Trichoderma reesei*. En particular, los términos "variante" o "forma modificada" abarcan enzimas mananasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la mananasa original / de tipo silvestre y que tiene una o más sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos o cualquier combinación de los mismos, que en conjunto se conocen como mutaciones. Las "proteínas de fusión" comprenden todas las proteínas derivadas de la mananasa original o cualquier variante de la misma mediante la fusión covalentemente de una secuencia adicional de aminoácidos al terminal C y/o al terminal N de la mananasa original.

30 Las formas modificadas o variantes pueden mostrar características de enzima alterada en comparación con la enzima original. Preferiblemente, las formas modificadas o variantes tienen uno o más de los siguientes fenotipos mejorados: mayor termoestabilidad; y/o mayor estabilidad proteolítica (por ejemplo, contra la pepsina); y/o una mayor actividad específica y/o mayor estabilidad a pH bajo. El término fragmento de "funcional" o "efectivo" se refiere a un fragmento o porción de la mananasa de *Trichoderma reesei* que conserva aproximadamente la misma función o efecto enzimático.

35 La presente divulgación proporciona moléculas que se derivan de la mananasa original y todas las variantes de la misma que se describen en esta solicitud, por medio de procesamiento posterior a la traducción en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada genéticamente. Estas modificaciones posteriores a la traducción comprenden, pero no se limitan a, escisión proteolítica de secuencias de terminales N, tales como secuencias líder y/o prosequencias, remoción proteolítica de las extensiones del terminal C, N y/u O-glicosilación, lipidación, acilación, desamidación, formación de piroglutamato, fosforilación y/o otros, o cualquier combinación de los mismos, a medida que ocurren durante la producción / expresión por el huésped nativo o cualquier huésped de expresión adecuado. Estas modificaciones posteriores a la traducción pueden o no tener una influencia sobre las propiedades físicas o enzimáticas de las enzimas como se analiza en este documento.

Preferiblemente, dichos cambios conducen a propiedades mejoradas de la enzima tales como

1. mayor termoestabilidad y/o

2. mayor actividad específica y/o

45 3. mayor estabilidad a pH bajo y/o

4. mayor resistencia contra la escisión proteolítica por proteasas tales como la pepsina; y/o
5. elevada actividad residual a pH bajo.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la mananasa modificada tiene una sustitución en al menos un residuo de aminoácido en la posición 274 por leucina o metionina y sustituciones adicionales en una o más de las posiciones 4, 7, 11, 13, 31, 41, 66, 70, 74, 97, 101, 113, 132, 146, 148, 170, 173, 181, 182, 185, 186, 187, 189, 201, 207, 215, 216, 220, 252, 255, 259, 274, 280, 281, 282, 313, 316, 317, 325, 331, 341, 345, 351, 352, en relación a la numeración de la mananasa de tipo silvestre dada en la SEQ ID NO: 1. Estas posiciones se caracterizan en que la mutagénesis de la enzima en estas posiciones conduce a una mejora en las características deseadas de la enzima.

Específicamente, las sustituciones siguientes representan realizaciones preferidas de la invención:

10 En una forma de realización preferida de la invención, el aminoácido N173 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En una realización más preferida N173 se sustituye por A, C, D, G, H, S, P, Q, T o V, y en una realización aún más preferida N173 se sustituye por A, C, H, S, T o V, y en la realización más preferida N173 se sustituye por H.

15 En una forma de realización preferida de la invención, el aminoácido V181 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y. En una realización más preferida V181 se sustituye por A, C, F, G, H, I, L, M, W o Y y en una realización aún más preferida V181 se sustituye por A, I, L o M, y en la realización más preferida V181 se sustituye por A.

20 En una forma de realización preferida de la invención, el aminoácido V148 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y. En una realización más preferida V148 se sustituye por A, C, F, G, H, I, L, M, W o Y y en una realización aún más preferida por A, I o L, y en la realización más preferida V148 se sustituye por I.

En una realización preferida de la invención, el aminoácido V187 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y. En una realización más preferida V187 se sustituye por A, C, F, G, H, I, L, M, W o Y, y en una realización aún más preferida V187 se sustituye por A, I, L o M, y en la realización más preferida V187 se sustituye por M.

25 En una forma de realización preferida de la invención, el aminoácido T201 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y. En una forma de realización más preferida T201 se sustituye por A, C, H, N, P, Q, S, V o Y, y en una realización aún más preferida T201 se sustituye por A, C, N, Q, S o V, y en la realización más preferida T201 se sustituye por S.

30 En una realización preferida de la invención, el aminoácido L207 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En una realización más preferida L207 se sustituye por A, C, F, G, H, I, M, V, W o Y, y en una realización aún más preferida L207 se sustituye por A, F, G, H, I o V, y en la realización más preferida L207 se sustituye por F.

35 En una realización preferida de la invención, el aminoácido A215 se sustituye por C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En una realización más preferida A215 se sustituye por C, F, G, H, I, L, M, T, V, W o Y, y en una realización aún más preferida A215 se sustituye por C, F, G, H, I, L o T, y en la realización más preferida A215 se sustituye por T.

40 En una realización preferida de la invención, el aminoácido Y220 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W. En una forma de realización más preferida Y220 se sustituye por A, F, H, I, L, M, N, P, V o W y en una realización aún más preferida Y220 se sustituye por F, H, W o Y, y en la realización más preferida Y220 se sustituye por F.

En la invención el aminoácido F274 se sustituye por L o M y en una realización preferida F274 se sustituye por L.

45 En una realización preferida de la invención, el aminoácido Q280 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y. En una realización más preferida Q280 se sustituye por C, D, E, H, K, N, R, S, T o Y, y en una realización aún más preferida Q280 se sustituye por C, H, N, S o T, y en la realización más preferida Q280 se sustituye por R.

En una realización preferida de la invención, el aminoácido N282 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En una realización más preferida N282 se sustituye por C, D, E, H, K, Q, R, S, T o Y, y en una realización incluso más preferida N282 se sustituye por C, D, H, Q, S o T, y en la realización más preferida N282 se sustituye por D.

En una realización preferida de la invención, el aminoácido N331 se sustituye por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En una realización más preferida N331 se sustituye por C, D, E, H, K, Q, R, S, T o Y, y en una realización aún más preferida N331 se sustituye por C, H, Q, S o T, y en la realización más preferida N331 se sustituye por S.

5 En una forma de realización preferida de la invención las variantes de mananasa se derivan de la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 1 mediante la introducción de dos o más de las siguientes sustituciones individuales en cualquier combinación: N173H; V181A; V148I; V187M; T201S, L207F; A215T; Y220F; F274L; Q280R; N282D; N331S, en donde una sustitución es F274L.

10 En una realización particular preferida de la invención, las mananasas se derivan de la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 1 y comprenden una o más de las siguientes combinaciones de sustituciones:

1. La sustitución de F274L se combina con A215T
2. La sustitución de F274L se combina con N282D
3. La sustitución de F274L se combina con A215T y N282D
4. La sustitución de F274L se combina con Y220F

15 5. La sustitución de F274L se combina con V187M

6. La sustitución de F274L se combina con V181A

7. La sustitución de F274L se combina con V148I

8. La sustitución de F274L se combina con N173H

9. La sustitución de F274L se combina con N331S

20 10. La sustitución de F274L se combina con N173H y N331S

11. La sustitución de F274L se combina con L207F

12. La sustitución de F274L se combina con T201S

13. La sustitución de F274L se combina con Q280R

14. La sustitución de F274L se combina con T201S y Q280R

25 15. La sustitución de F274L se combina con T201S y L207F

En una realización preferida adicional de la invención cualquiera de las combinaciones de 1 a 15 enumeradas anteriormente se puede combinar para producir una variante de mananasa.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada o una molécula de ácido nucleico que codifica para la enzima que se reivindica.

30 Sin embargo, básicamente, varias sustituciones de aminoácidos con respecto a la mananasa de tipo silvestre han resultado beneficiosas en términos de termoestabilidad, tanto por sí mismas y / o en combinación con otras. Estas sustituciones se muestran en la Tabla 3A y 3B. Además, varias sustituciones de aminoácidos han resultado ser también muy beneficiosas en términos de estabilidad al pH y estabilidad contra las proteasas (particularmente pepsina). Estas sustituciones se muestran en la Tabla 5.

35 También se divulga una molécula de ácido nucleico y el uso de una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica una mananasa modificada de acuerdo con la descripción anterior,

(b) una molécula de ácido nucleico que codifica para un derivado de la mananasa modificada de acuerdo con la

descripción anterior, en la que derivados de uno o más residuos de aminoácidos son sustituidos de forma conservadora;

(c) una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de a) - b) y que codifica para una mananasa,

5 (d) una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de a) - b) y que codifica para una mananasa, y / o

(e) una fracción o un complemento de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de a) - b).

10 Un nucleótido se considera que hibrida con uno de los nucleótidos anteriores si es capaz de hibridar bajo condiciones de rigurosidad media, más preferiblemente de rigurosidad alta, incluso más preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad muy alta.

Para preparar una transferencia de hibridación, se pueden utilizar protocolos estándar de biología molecular para transferencia (por ejemplo, transferencia tipo Southern para hibridaciones de ADN). La cantidad de ADN objetivo depende de la abundancia relativa de la secuencia objetivo. Si se utiliza una secuencia objetivo pura, se prefieren entre 1 y 5 picogramos de ADN por kilobase de polinucleótidos. Típicamente, el límite de detección es de aproximadamente 0,5 pg de ADN para una sonda radioactiva con actividad específica de  $10^9$  dpm / mg, que es equivalente a una sola copia del gene de 500 pb de longitud en 3,3 mg de ADN genómico de un genoma complejo (por ejemplo, humano). En la práctica se utilizan aproximadamente 10 mg de ADN genómico - por ejemplo para la detección de organismos, tales como microorganismos, que contienen un polinucleótido que codifica mananasa de la invención. Si el ADN objetivo es bacteriano o un plásmido se tiene que diluir el ADN en forma apropiada para evitar la sobreexposición. El ADN objetivo se transfiere, por ejemplo, por medio de transferencia de puntos (*dot blotting*), o mediante transferencias de un gel de electroforesis. Las condiciones preferidas se describen en 'Membrane Transfer and Detection Methods', Amersham International plc, Reino Unido. -PI/162/85/1). Se usan preferiblemente membranas de nilón cargadas positivamente Hybond N+ (Amersham Life Science). La sonda se prepara preferiblemente de acuerdo con el kit de marcación Pharmacia's Ready to Go DNA™ para preparar una sonda de  $> 1 \times 10^9$  dpm / microgramo. La sonda se utiliza en amortiguador de hibridación en una concentración de  $1 \times 10^6$  dpm por mililitro de amortiguador de hibridación dpm por mililitro. Las transferencias preferiblemente se hibridan previamente en amortiguador de hibridación (6 x SSC, 5 x solución de Reinhardt, y 0,5% de SDS y ADN de esperma de salmón desnaturalizado hasta 100 mg / ml de amortiguador) durante una hora a 65° C, seguido de hibridación en amortiguador de hibridación que contiene la sonda desnaturalizada marcada con agitación durante 12 horas a 65° C. La(s) transferencia(s) se lava(n) a continuación con un volumen adecuado de amortiguador de lavado (normalmente 50 ml) en 2 x SSC, 0,1% de SDS durante 30 minutos a 65° C, seguido de un segundo lavado en un volumen adecuado de amortiguador de lavado (normalmente 50 ml) ya sea en el mismo amortiguador de lavado (2 x SSC, 0,1% de SDS) para un lavado de rigurosidad media, o 0,1% x SSC, 0,1% de SDS durante 10 minutos a 65° C (rigurosidad alta), el segundo lavado se puede repetir a 70° C para el lavado de rigurosidad muy alta.

35 En particular, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como la reivindicada. También se divulgan aquí un sistema de plásmido o de vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el aminoácido de la SEQ ID NO: 1 con la Mutación F274L o F274M o una secuencia que es al menos 90% homóloga a ésta o un fragmento efectivo de la misma, o cualquiera de los derivados de la SEQ ID NO: 1 con la Mutación F274L o F274M descrita aquí. Vectores de expresión adecuados se describen en este documento. Además, la divulgación proporciona un sistema de plásmido o de vector para la expresión de cualquiera de las enzimas modificadas o variantes o fragmentos funcionales descritos en este documento. Vectores de expresión adecuados se describen en este documento. Las mejoras en las características de la mananasa de acuerdo con la presente invención están dirigidas al uso en una variedad de procesos técnicos tales como, pero sin limitarse a, el uso como aditivo para productos alimentos y piensos, para el procesamiento de alimentación y piensos, la producción de pulpa y de papel, así como para la estimulación de pozos de petróleo / gas por medio de fraccionamiento hidráulico, la generación de formulaciones de liberación lenta de fármacos o en detergentes, en particular en la eliminación de biopelículas bacterianas. En particular, las mejoras se dirigen a la estabilidad de la enzima bajo condiciones de estas o de otras aplicaciones y / o para la estabilidad durante el tránsito en el estómago en el caso de un aditivo para alimentos o piensos y / o para la actividad o estabilidad en el estómago de humanos o de animal y / o en el tracto intestinal bajo las condiciones ácidas del tracto gastrointestinal superior. Tales mejoras comprenden, entre otros parámetros, el aumento de la estabilidad a temperaturas elevadas, preferentemente a temperaturas superiores a 60° C y / o el aumento de la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferentemente frente a las proteasas del tracto digestivo y / o el aumento de la estabilidad a pH bajo y / o la actividad a bajos valores de pH y / o la eficiencia general de la liberación de manosa y / o de oligomanosas de grandes carbohidratos que contienen polimánosa.

El aumento de la estabilidad a temperaturas elevadas se cuantifica por medio de la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se define como la temperatura a la que la actividad residual de una enzima

mananasa después de la incubación durante un tiempo determinado y posterior enfriamiento a temperatura ambiente es el 50% de la actividad residual de la misma enzima mananasa incubada durante el mismo tiempo en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Las diferencias de termoestabilidad son las diferencias en °C entre las temperaturas de inactivación de dos enzimas.

- 5 En una forma de realización preferida de la invención, las variantes de mananasa se aplican en procesos a temperaturas elevadas, haciendo variantes de mananasa con una temperatura deseable mayor de inactivación.

Cuando se compara con la mananasa de tipo silvestre, las mananastas de la invención se caracterizan por una mayor actividad residual después de una incubación térmica a temperaturas por encima de la temperatura de inactivación de la mananasa de tipo silvestre, proporcionando una estabilidad de proceso superior.

- 10 Clonación de mananasa de *T. reesei*: Además de la mananasa de *Trichoderma reesei* como se muestra en la SEQ ID NO: 1 se ha clonado una mananasa adicional de *Trichoderma reesei* que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 con una sustitución de serina por arginina en la posición 3 (mutación S3R). Esta variante de mananasa se comparó con la mananasa de *Trichoderma reesei* de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 con respecto a la estabilidad térmica y la actividad catalítica en la liberación de manosa a partir de un sustrato que contiene polimánosa. Los resultados presentados en la Figura 1 demuestran que la sustitución S3R no tiene efecto sobre las propiedades relevantes para la invención y es por lo tanto una mutación neutra. En consecuencia, en el contexto de esta invención, el término "ts" o "mananasa de ts", "mananasa de tipo silvestre" o "mananasa de *Trichoderma reesei*" se entiende que comprende las mananastas de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y la mananasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, que tienen además la mutación neutra S3R.

- 20 La variante denominada "Man Com", que es una abreviatura de "mananasa común", está sin embargo relacionada con la mananasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, es decir, carente de dicha mutación S3R.

- 25 Termoestabilidad en amortiguador: En una forma de realización preferida de la invención, las variantes de mananasa tienen un aumento de la actividad residual y/o la temperatura de inactivación cuando se incuban a temperaturas > 60° C durante > 30 min. En una realización más preferida se obtiene el aumento de la actividad residual y/o de la temperatura de inactivación después de incubación en un amortiguador de acetato durante 45 min (figura 2). Preferiblemente, la temperatura de inactivación de la variante de mananasa es > 68° C, más preferiblemente > 70° C o > 72° C o > 74° C, o más preferiblemente > 76° C. Las temperaturas específicas de inactivación se dan en la tabla 3 junto con sus respectivas mutaciones.

- 30 Tabla 3A: Temperaturas de inactivación (TI 50) para la incubación en amortiguador de diferentes variantes de mananasa con sus respectivas sustituciones de aminoácidos en comparación con la mananasa de tipo silvestre.

variante	mutación/sustitución	TI50 [°C]
Man Com	-	66,7
TS	-	67,6
variante A	F274L	70,3
variante B	L207F; F274L	72,9
variante C	T201S; Q280R; F274L	75,7
variante F	A215T; F274L; N282D	72,8
variante G	Y220F; F274L	68,8
variante H	V187M; F274L	69,8
variante K	V181A; F274L	72,6
variante L	V148I; F274L	72,0

# ES 2 410 788 T3

(continuación)

variante	mutación/sustitución	Ti50 [°C]
variante M	N173H; F274L; N331S;	74,1
variante 21	N13D; F274L	71,2
variante 22	F274L ;Q280L	71,9
variante 23	F274L; Q317H	71,9
variante 25	L207F; F274M	73,1
variante 28	F4Y ; I70V ; F274L	71,1
variante 29	Q101R ; F274L ; Q281H	72,3
variante 30	T201 G ; L207F ; F274L	74,3
variante 31	T201S; L207F ; F274L	76,3
variante 32	V181T ; L207W ; A215T; F274L	70,7
variante 34	K74M; F274L; A313T; V325I	72
variante 35	N173H ; V181H ; L207W ; F274L	73,7
variante 36	T201 S ; L207Y ; F274L ;Q280R	74,2
variante 37	T201 S ; L207W ; F274L ;Q280R	76,5
variante 38	T201 S ; L207R ; F274L ;Q280R	76,8
variante 39	V181T ; L207W ; F274M ; N331S ; P352L	70,4
variante 40	N173H ; L207W ; A215T ; F274L ; Q280R	71,7
variante 41	V181H ; L207W ; A215T ; F274L ; N282D	72,2
variante 42	N173H ; V181T ;T201S ; L207W ; F274L	73,7
variante 43	N173H ; V181H ; L207W ; A215T ; F274L	74,7
variante 44	V181H ; L207W ; A215T ; F274L ;Q280R ; N282D	72
variante 45	S66P; N173H ; V181H; A215T; F274L; Q280S ; N282D	75
variante 46	N173H ; V181T ; L207W ; A215T ; F274L ;Q280R ; N282D	75,2

5 Para aumentar la termoestabilidad la posición T201 parece ser bastante importante. Otras posiciones importantes son F274, T290 y L207. Esto significa que todas las variantes que portan una sustitución en cualquiera de estos residuos representan formas de realización preferidas de la presente invención.

En contraste con ello, las enzimas descritas en USRE38.047 sufren de una pérdida significativa de actividad cuando son tratadas con temperaturas superiores a 60° C (véase la Fig. 1 de USRE38.047), que las hace inadecuadas para procesos de producción industrial de alimentos en los que se tratan pellas con dichas temperaturas.

ES 2 410 788 T3

Básicamente, diferentes sustituciones de aminoácidos con respecto a la mananasa de tipo silvestre han resultado beneficiosas en términos de termoestabilidad, tanto solas y/o en combinación con otras. Estas sustituciones se muestran en la Tabla 3B.

5 Tabla 3B: Sustituciones de aminoácidos con respecto a la mananasa de tipo silvestre que han resultado beneficiosas en términos de termoestabilidad, tanto por sí mismas y/o en combinación con otras.

Residuo de tipo silvestre	Sustituido por	La más preferida
F4	A, C, D, E, G, H, I, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	Y
I7	A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	V
Q11	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	R, H
N13	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y	D
F31	A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	Y
T41	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y	I
S66	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y	P
I70	A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	V
K74	A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	M
Q97	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	R
Q101	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	R
N113	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y	Y
T132	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y	S
K146	A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	Q
V148	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y	I
P170	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y	L
N173	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y	H, T
V181	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y	A, H, T
Q182	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	R
T185	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y	K
S186	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y	N
V187	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y	L, M
Q189	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	H

(continuación)

Residuo de tipo silvestre	Sustituido por	La más preferida
T201	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y	A, S, G
L207	A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	W, R, F, Y, S
A215	C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	T
Y216	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o	H
Y220	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W	F
T252	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W o Y	I
N255	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y	I
Q259	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	R
Q280	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	R, S, L
Q281	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	H
N282	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y	D
A313	C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	T
A316	C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	T
Q317	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y	H
V325	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y	I
N331	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y	S
D341	A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	E
G345	A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y	C
P351	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y	L
P352	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y	L

- 5 En una forma de realización preferida de la invención las variantes de mananasa se aplican a un procesamiento enzimático de una planta que contiene polimanosa o material microbiano, tal como, pero sin limitarse a, hemicelulosa de madera blanda y dura que contiene glucomanano, O-acetil-galactoglucomanano, arabino-4-O-metilglucuronoxilano, arabinogalactano y otros; polisacáridos que contienen polimanano de algas, semillas de plantas, tales como tagua, grano de café verde y dátil; galactomananos de leguminosas tales como goma guar de *Cyanopsis tetragonolobus* o goma de granos de algarroba de *Ceratonia siliqua*; o glucomananos que se encuentran en bulbos, raíces, tubérculos u otros tejidos vegetales de diferentes especies de plantas.
- 10

Un producto preferible de procesamiento enzimático de plantas que contienen polimanano o material microbiano está libre de manosa. Preferiblemente, estos procesos se llevan a cabo a temperaturas elevadas, por ejemplo, para aumentar las velocidades de reacción y/o evitar el deterioro por el crecimiento microbiano, proporcionando una mananasa estable con la temperatura con una ventaja.

Actividad sobre sustrato galactomanano: En una forma de realización preferible de la invención, cuando se compara con mananasa de tipo silvestre, las variantes de mananasa se caracterizan por una temperatura de inactivación más alto en proceso enzimático de una planta que contiene polimanosa o material microbiano a temperaturas superiores a la temperatura de inactivación de la mananasa de tipo silvestre en ese proceso. En una forma de realización más preferida, la planta que contiene polimanosa o material microbiano es galactomanano de algarrobo, el tiempo de incubación es de 16 h y se varió la temperatura entre 62° C y 82° C. Específicamente, la figura 3 presenta los datos para la liberación de manosa mediante el tratamiento de galactomanano de algarrobo con diferentes variantes de mananasa a diferentes temperaturas después de 16 horas de tratamiento. En comparación con los rendimientos de manosa a temperaturas inferiores a 65° C, las variantes de mananasa de la invención producen las mismas cantidades de manosa a temperaturas superiores a 65° C, mientras que la mananasa de tipo silvestre (incluyendo la variante de mananasa S3R) tiene una producción reducida de manosa a temperaturas superiores a 65° C. Esta dependencia de la temperatura se expresa mejor por medio de la temperatura de inactivación, es decir, la temperatura a la cual el rendimiento normalizado es 50% del punto de referencia a 62° C. Preferiblemente, la temperatura de inactivación de la variante de mananasa es > 69° C, más preferiblemente > 70° C o > 72° C o > 74° C, o lo más preferible > 76° C. Las temperaturas específicas de inactivación se dan en la tabla 4 junto con sus respectivas mutaciones.

Tabla 4: Temperaturas de inactivación para la producción de manosa a partir de galactomanano (algarrobo) de diferentes variantes de mananasa con sus respectivas sustituciones de aminoácidos en comparación con la mananasa de tipo silvestre.

variante	mutación/sustitución	T150 [°C]
TS	-	69
variante A	F274L	72
variante B	L207F; F274L	74
variante C	T201S; Q280R; F274L	76,1
variante F	A215T; F274L; N282D	74,2
variante G	Y220F; F274L	72,1
variante H	V187M; F274L	72
variante K	V181A; F274L	72,8
variante L	V148I; F274L	72,2
variante M	N173H; F274L; N331S;	74,1

Actividad residual después de la incubación con PKE: En una realización más preferible de la invención, cuando se compara con la mananasa de tipo silvestre, las variantes de mananasa se caracterizan por una mayor actividad residual en un procesamiento enzimático de una planta que contiene polimanano o material microbiano a temperaturas superiores a la temperatura de inactivación de la mananasa de tipo silvestre en ese proceso. En una realización más preferida de la invención, las variantes de mananasa se aplican a un proceso enzimático de sustrato de una torta de presión de palmiste (PKE) a temperaturas > 60° C durante > 24 horas. Específicamente, en la figura 4 se presentan las actividades residuales de variantes de mananasa de la invención después de un tiempo de proceso de 71 horas para temperaturas de proceso de 63° C, 67° C y 70° C, respectivamente. Las manansas de la invención preferiblemente tienen una actividad residual de al menos 20%, más preferiblemente de al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 65% o al menos 70%. En particular,

- una variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 mediante la introducción de la mutación F274L se caracteriza por una actividad residual de al menos 25%,

- una variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 mediante la introducción de las mutaciones L207F y F274L se caracteriza por una actividad residual de al menos 50%,

- una variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 mediante la introducción de las mutaciones T201S, Q280R y F274L se caracteriza por una actividad residual de al menos 65%.

5 Mayor generación de manosa a partir de PKE: En la mayoría de aplicaciones técnicas la cantidad de enzima se determina por la rotación requerida bajo las condiciones de proceso particulares, y por razones comerciales es preferible reducir la cantidad de enzima tanto como sea posible. Cuando se compara con la mananasa de tipo silvestre, variantes mejoradas de la enzima pueden proporcionar una ventaja con respecto a cualquiera de las cantidades reducidas de enzimas necesarias para el mismo rendimiento de producto o un mayor rendimiento de producto cuando se aplica la misma cantidad de enzima. Una forma de realización preferida de la invención está relacionada con la provisión de variantes de la enzima que producen una mayor cantidad de manosa y/o oligomanosas de la planta que contienen polimánosa o material microbiano tales como PKE cuando se compara con la misma concentración de mananasa de tipo silvestre y/o la producción de la misma cantidad de manosa y/o oligomanosas cuando se aplica a concentraciones más bajas que la enzima de tipo silvestre. En una forma de realización particularmente preferida, el proceso se corre a  $> 60^{\circ}\text{C}$ , por ejemplo,  $63^{\circ}\text{C}$ ,  $67^{\circ}\text{C}$  o  $70^{\circ}\text{C}$ , y los rendimientos de manosa determinados después de 43 horas y 71 horas. Preferiblemente, las variantes de mananasa de la invención se caracterizan por un rendimiento mayor de manosa en comparación con la mananasa de tipo silvestre por un factor de al menos 1,1 o incluso más preferible por un factor de al menos 1,3, 1,5, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 cuando el proceso se realiza a  $63^{\circ}\text{C}$ . A una temperatura de proceso de  $70^{\circ}\text{C}$  las manansas se caracterizan por un rendimiento mejorado por al menos un factor de 2, o más preferiblemente por un factor de  $> 3$ ,  $> 4$ ,  $> 5$ ,  $> 6$ ,  $> 7$ ,  $> 8$  o  $> 9$ . Específicamente, la variante B (comparar las Tablas 3, 4) proporciona un mayor rendimiento de manosa por un factor de 10 a  $70^{\circ}\text{C}$  y 71 horas de tiempo de proceso (figura 5).

25 Producción de manosa con una concentración de enzima inferior: En un aspecto adicional de esta realización de la invención, las variantes de la enzima producen al menos la misma cantidad de manosa y/o de oligomanosa que la de tipo silvestre cuando se aplica a concentraciones más bajas que la enzima de tipo silvestre. En una realización preferida particular, la planta que contiene polimánosa o material microbiano es PKE. Específicamente, se obtiene la misma cantidad de manosa de PKE cuando la cantidad de la variante de enzima es preferiblemente menor al 80%, o más preferiblemente menor al 60%, 40%, 30% o 20% de la variante de tipo silvestre (figura 6).

30 Mejora de la estabilidad al pH/pepsina. Una realización adicional de la invención se refiere al uso de la enzima mananasa como un suplemento para alimentos o piensos que contienen componentes de polimánosa. En esta aplicación se expone la mananasa a las duras condiciones de un pH bajo y de proteólisis en el tracto gastrointestinal de humanos o animales. Un aspecto preferido de la invención revela variantes de mananasa con mejor estabilidad a pH bajo y mejor resistencia contra inactivación proteolítica (figura 6). Preferiblemente, se incuba la mananasa a  $\text{pH} < 5$ , más preferiblemente a  $\text{pH} < 4$ , e incluso más preferiblemente a  $\text{pH} < 3$ , por ejemplo,  $\text{pH} 2,3$ . Después de incubación durante diferentes periodos de tiempo y de reajustar a un pH más alto para determinación de la actividad, comparado con la mananasa de tipo silvestre, las variantes de mananasa de la invención producen una mayor actividad residual como se determina mediante la normalización con la enzima no incubada a  $\text{pH} 2,3$ . Preferiblemente, después de 160 minutos de incubación las variantes de mananasa producen al menos 20% de actividad residual, o más preferiblemente al menos  $> 40\%$ ,  $> 50\%$ ,  $> 60\%$ ,  $> 70\%$ ,  $> 80\%$ ,  $> 90\%$ ,  $> 95\%$  o  $> 99\%$  de la actividad de referencia. Específicamente,

40 - La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L produce al menos 40% de actividad residual

- La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L y L207F produce al menos 70% de actividad residual y

- La variante de mananasa derivada de SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L, T201S y Q280R produce al menos 95% de actividad residual.

45 Sometiendo las variantes de mananasa simultáneamente a condiciones de pH bajo y digestión proteolítica por medio de una proteasa del tracto gastrointestinal conduce a una inactivación más fuerte que por medio solamente de un bajo pH (figura 6). Preferiblemente, la proteasa es la pepsina y el pH se ajusta a  $\text{pH} < 5$ , más preferiblemente a  $\text{pH} < 4$ , e incluso más preferiblemente a  $\text{pH} < 3$ , por ejemplo,  $\text{pH} 2,3$ . Después de incubación durante diferentes periodos de tiempo y el reajuste a un pH más alto para la determinación de la actividad, comparado con la mananasa de tipo silvestre, las variantes de mananasa de la invención producen una actividad residual mayor como se determina mediante la normalización con la enzima no expuesta a pH bajo y pepsina. Preferiblemente, después de 80 min de incubación, las variantes de mananasa producen una actividad residual de al menos  $> 20\%$ ,  $> 40\%$ ,  $> 50\%$ ,  $> 60\%$ ,  $> 70\%$ ,  $> 75\%$  o  $> 80\%$ . Específicamente,

55 - La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio la introducción de la sustitución F274L produce al menos 8% de actividad residual,

- La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L y L207F (variante B) produce al menos 30% actividad residual,

- La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L, T201S y Q280R (variante C) produce al menos 80% de actividad residual, y

- 5 - La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución T201S, L207F y F274L (variante 31) produce al menos 80% de actividad residual.

Actividad mejorada a pH bajo:

- 10 Una realización adicional de la invención se refiere al uso de enzima mananasa como un suplemento para alimentos o piensos que contienen componentes de polimánosa (mananos, galactomananos, etc.). En esta aplicación se expone la mananasa a las duras condiciones de un pH bajo y de proteólisis en el tracto gastrointestinal de animal. Un aspecto preferido de la invención revela variantes de mananasa con alta actividad a bajo pH (figura 8).

Preferiblemente, se pone en contacto la mananasa con un sustrato que contiene polimánosa durante diferentes períodos de tiempo a un pH por debajo de 5, más preferiblemente a un pH por debajo de 4 e incluso más preferiblemente a un pH por debajo de 3, por ejemplo, pH 2,3.

- 15 Después de completarse la reacción, se determina la actividad en comparación con una muestra puesta en contacto con el sustrato que contiene polimánosa en condiciones óptimas. Preferiblemente, después de 240 minutos de incubación, las variantes de mananasa producen al menos 20% de actividad residual, más preferiblemente al menos > 30%, > 40%, > 50%, > 60%, > 70%, > 80%, > 90%, > 95% o > 99% de la actividad de referencia. Específicamente,

- 20 - La variante de mananasa (variante B) derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L y L207F produce al menos 35% de actividad relativa después de la incubación a un pH entre pH 2 y pH 3, y

- La variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 por medio de la introducción de la sustitución F274L, T201S y Q280R (variante C) produce al menos 35% de actividad relativa después de incubación a un pH entre pH 2 y pH 3.

- 25 Generación de mananastas: En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la preparación de la mananasa modificada como la reivindicada, que comprende el cultivo de una célula huésped y el aislamiento de la mananasa modificada del cultivo.

También se divulgan aquí métodos para preparar variante(s) de la enzima mananasa.

En una divulgación, el método para la preparación de una variante de la enzima mananasa comprende las siguientes etapas secuenciales:

- 30 a) Selección de al menos una enzima mananasa original, en donde al menos una enzima mananasa original se selecciona a partir de i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a la mananasa de *Trichoderma reesei*, o una forma modificada, un polipéptido homólogo, una variante, un equivalente funcional o un fragmento efectivo de la misma, como se describe en este documento o ii) al menos una variante de la enzima mananasa como se describe aquí;

- 35 b) Generación de al menos una variante de mananasa por medio de la introducción de al menos una alteración de dicha enzima mananasa original que es una inserción, una supresión o una sustitución o combinación de los mismos de uno o más residuos de aminoácidos en dicha enzima mananasa original para obtener al menos una variante de la enzima mananasa,

- 40 c) Detección de al menos una variante de la enzima mananasa para identificar una variante mejorada de la enzima mananasa, que comparada con la enzima mananasa original tiene propiedad/propiedades mejoradas seleccionadas de:

i. mayor estabilidad térmica y/o

ii. actividad específica y/o

iii. estabilidad proteolítica y/o

iv. estabilidad en valores de pH bajos y/o

v. actividad específica alta con valores de pH bajos.

d) Preparación de dicha variante mejorada de la enzima mananasa, preferiblemente para producir una variante de la enzima mananasa aislada y/o purificada.

5 En una divulgación preferida, durante la etapa b) una población de variantes de la enzima mananasa y en la etapa c) se selecciona al menos una proporción de dicha población de las variantes de la enzima mananasa. Preferiblemente la etapa a) comprende someter una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima mananasa original a mutagénesis, y la etapa b) comprende la expresión de las secuencias de nucleótidos mutados obtenidos en la etapa a) en una célula huésped, y la etapa c) comprende la selección de las células huésped, o extracto(s), de las mismas, por una variante mejorada de la enzima mananasa con dichas propiedad/propiedades mejoradas.

10 En una posibilidad adicional después de la etapa c), y opcionalmente d), el método comprende además al menos una ronda posterior de repeticiones de las etapas a) hasta c), y opcionalmente d) en donde, preferentemente, en dicha(s) ronda(s) posteriores, al menos una enzima mananasa original de la etapa a) se selecciona a partir de al menos dicha variante de la enzima mananasa y/o una variante mejorada de la mananasa preparada de acuerdo con el método.

15 En una divulgación preferible adicional, la etapa c) comprende la selección de las células huésped que expresan una variante mejorada de la enzima mananasa que comparada ya sea con i) dicha enzima mananasa original y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o un derivado o fragmento funcional del mismo, tiene una diferencia de estabilidad térmica de al menos 2° C.

20 En una divulgación adicional, la etapa c) comprende la selección de las células huésped que expresan una variante mejorada de la enzima mananasa que comparada ya sea con i) dicha enzima mananasa original y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o un derivado o fragmento funcional del mismo, tiene una estabilidad a la pepsina de al menos 20%.

25 En una divulgación adicional, la etapa c) comprende la selección de las células huésped que expresan una variante mejorada de la enzima mananasa que comparada ya sea con i) dicha enzima mananasa original y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o un derivado o fragmento funcional del mismo, tiene una relación de actividad específica cuando se compara con la mananasa codificada por la SEQ ID NO: 1 de al menos 110%.

30 En una divulgación adicional, la etapa c) comprende la selección de las células huésped que expresan una variante mejorada de la enzima mananasa que comparada ya sea con i) dicha enzima mananasa original y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o un derivado o fragmento funcional del mismo, tiene una actividad residual después de incubación a pH bajo de cuando se compara con la mananasa codificada por la SEQ ID NO: 1 de al menos 20%.

También se divulga un método para la preparación de una variante de la enzima mananasa, cuyo método comprende:

a) Selección de una enzima mananasa original, en donde la enzima mananasa original se selecciona de

35 i. una enzima mananasa original con al menos 75% de homología con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional de la misma;

ii. una enzima mananasa original derivada de *Trichoderma reesei*;

iii. al menos una variante de la enzima mananasa;

40 b) Elaboración de al menos una alteración que es una inserción, una supresión o una sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la enzima mananasa original para obtener una variante de la enzima mananasa,

c) Selección de una variante de la enzima mananasa que comparada con la enzima mananasa original características mejoradas, como se describe aquí, preferiblemente seleccionadas de una o más de:

i. mayor estabilidad térmica y/o

ii. actividad específica y/o

45 iii. estabilidad proteolítica y/o

- iv. estabilidad en valores de pH bajos y/o
- v. actividad específica alta con valores de pH bajos

d) Preparación de la variante de la enzima mananasa.

- 5 Opcionalmente, al menos las etapas a) hasta c) pueden ser repetidas en una o más rondas posteriores (iterativas). Por lo tanto, se prevé que la enzima mananasa original es una variante de la enzima mananasa preparada por medio de rondas previas del método anterior a) hasta c).

También se divulga un método para la preparación de una variante de mananasa, que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una enzima mananasa original, seleccionada de

- 10 (i) una enzima mananasa con al menos 75% de homología con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional de la misma;

(ii) una enzima mananasa derivada de *Trichoderma reesei*;

(iii) al menos una variante de la enzima mananasa;

- 15 b) generación de una población de variantes de mananasa por medio de la mananasa original, preferiblemente, dicha(s) alteración(es) se obtiene(n) a través de una inserción, una supresión o una sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la enzima mananasa original o cualquier combinación de los mismos,

c) selección de la población para una variante de la mananasa que comparada con la enzima mananasa original tiene características mejoradas, como se describe aquí, preferiblemente seleccionadas de una o más de:

i. mayor estabilidad térmica y/o

- 20 ii. actividad específica y/o

iii. estabilidad proteolítica y/o

iv. estabilidad en valores de pH bajos y/o

v. actividad específica alta con valores de pH bajos;

(d) selección de una o más variantes de mananasa a partir de la población de mananasas;

- 25 (e) opcionalmente repetir las etapas (a) hasta (c) en forma cíclica, y preferiblemente en donde las variantes de mananasa seleccionadas en un ciclo se usan como primeras mananasas en el siguiente ciclo.

También se divulga aquí un método para la preparación de una variante de la enzima mananasa, cuyo método comprende:

(a) proporcionar una enzima mananasa original, seleccionada entre

- 30 (i) una enzima mananasa con al menos 75% de homología con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional de la misma,

(ii) una enzima mananasa derivada de *Trichoderma reesei*;

(iii) al menos una variante de la enzima mananasa;

(b) expresar la molécula de ácido nucleico mutado obtenida en la etapa (a) en una célula huésped;

- 35 (c) seleccionar la población para una variante de mananasa que en comparación con la enzima mananasa original tenga características mejoradas, como se describe aquí, preferiblemente seleccionadas de uno o más de:

i. mayor estabilidad térmica y/o

ii. actividad específica y/o

iii. estabilidad proteolítica y/o

iv. estabilidad a bajos valores de pH, y/o

5 v. actividad específica alta con valores de pH bajos,

(d) Preparar la variante de la enzima mananasa expresada por la célula huésped.

Opcionalmente, las etapas a) hasta c), opcionalmente que incluyen d) se pueden repetir en una o más rondas posteriores (iterativas). También se divulga aquí un método para la preparación de una variante de mananasa, que comprende las siguientes etapas:

10 (a) someter una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima mananasa original a mutagénesis para generar una población de variantes de nucleótidos alterados, en donde preferiblemente dicha(s) alteración(es) se obtiene(n) a través de una inserción, supresión o sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la mananasa original, o cualquier combinación de los mismos, y en donde la enzima mananasa original se selecciona de

15 (i) una enzima mananasa con al menos 75% de homología con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional de la misma;

(ii) una enzima mananasa derivada de *Trichoderma reesei*;

(iii) al menos una variante de la enzima mananasa;

(b) expresar la población de variantes de nucleótidos obtenida en la etapa (a) en una población de células huésped correspondientes;

20 (c) selección de la población para una variante de mananasa que comparada con la enzima mananasa original tiene características mejoradas, como se describe aquí, preferiblemente seleccionadas de uno o más de:

i. mayor estabilidad térmica y/o

ii. actividad específica y/o

iii. estabilidad proteolítica y/o

25 iv. estabilidad en valores de pH bajos, y/o

v. actividad específica alta con valores de pH bajos;

(d) selección de una o más variantes de mananasa a partir de la población de mananasas;

(e) opcionalmente repetir las etapas (a) hasta (c) en forma cíclica, y en donde preferiblemente las variantes de mananasa seleccionadas en un ciclo se usan como primeras mananasas en el siguiente ciclo.

30 Cuando sea apropiado, en los métodos anteriores para la preparación de una variante de la enzima mananasa, dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente una secuencia de ADN.

La molécula de ácido nucleico es preferiblemente una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada o una molécula de ácido nucleico que codifica para la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a la mananasa de *Trichoderma reesei*, o un homólogo de la misma como se describe aquí.

35 La mananasa original se selecciona preferiblemente de la SEQ ID NO: 1 o un derivado o fragmento funcional de la misma, o un homólogo de la mananasa de *Trichoderma reesei* como se divulga en la SEQ ID NO: 1 como se describe aquí.

En las divulgaciones anteriores, que se refieren a métodos de preparación de la variante de la enzima mananasa, la

enzima/nucleótido de la mananasa original que codifica la enzima mananasa original es preferiblemente un nucleótido que codifica una mananasa de tipo silvestre/mananasa ts.

5 Sin embargo, la enzima original puede ser una variante preparada por medio de rondas previas de mutagénesis, es decir, los métodos de preparación de las variantes de la enzima mananasa son iterativos, en donde las etapas a) hasta c) (opcionalmente incluyendo la etapa d)) como se describió anteriormente se repiten al menos más de una vez. En tal caso, el método de mutagénesis utilizado en la primera ronda de mutagénesis es preferiblemente PCR propensa a error, más preferiblemente PCR de umbral de errores. Las rondas posteriores también se pueden llevar a cabo por medio de PCR propensa a error, más preferiblemente PCR de umbral de error, pero alternativamente puede ser realizada por medio de mutagénesis basada en la recombinación, en los grupos de al menos dos  
10 variantes mejoradas independientes se identifican en una primera ronda de mutagénesis y son, durante una segunda o una ronda posterior de mutagénesis, recombinadas para producir al menos una variante recombinante, por ejemplo, utilizando métodos de transposición de familia o reacción en cadena de la polimerasa.

Será evidente para aquella persona capacitada que también puede utilizarse métodos alternativos de mutagénesis, incluyendo diseño racional, mutagénesis de barrido en el sitio, o mutagénesis inducida químicamente/por radiación.

15 En las divulgaciones anteriores, que se relacionan con métodos para la preparación de una variante de la enzima mananasa, la variante de la enzima mananasa es preferiblemente seleccionada por una mayor estabilidad térmica.

20 En las divulgaciones anteriores, que se relacionan con métodos para la preparación de una variante de la enzima mananasa, la variante de la enzima mananasa se selecciona preferiblemente al menos por un parámetro único, preferiblemente seleccionado entre mayor estabilidad térmica, mayor estabilidad proteolítica, mayor estabilidad a pH bajo y mayor actividad específica, más preferiblemente mayor estabilidad térmica.

25 Preferiblemente, la selección de dicho primer parámetro se lleva a cabo en al menos una primera ronda de mutagénesis que comprende al menos las etapas a) hasta c), en donde c) comprende al menos la selección de dicho primer parámetro. Esta primera ronda de mutagénesis puede ser seguida luego por rondas adicionales (iterativas) de mutagénesis y selección que comprende las etapas a) hasta c) (opcionalmente incluyendo d)) en donde la selección en dichas rondas adicionales puede ser para el mismo parámetro de selección que se utiliza en la etapa c) de dicha primera ronda, o alternativamente, para un parámetro diferente.

30 Durante las rondas iterativas de los métodos anteriores para la preparación de una variante de la enzima mananasa, preferiblemente dicho primer parámetro se selecciona entre mayor estabilidad térmica, mayor estabilidad proteolítica, mayor estabilidad a pH bajo y mayor actividad específica, lo más preferible mayor estabilidad térmica. Preferiblemente, cuando se ha realizado una primera ronda de mutagénesis para seleccionar variantes con una mayor estabilidad térmica, durante una(s) ronda(s) posterior(es) (iterativas) de mutagénesis comprende las etapas a) hasta c), dicho parámetro se selecciona entre mayor estabilidad térmica, mayor estabilidad proteolítica, mayor estabilidad a pH bajo y mayor actividad específica, lo más preferible mayor estabilidad proteolítica y mayor actividad específica.

35 En las divulgaciones anteriores, que se relacionan con métodos para la preparación de una variante de la enzima mananasa, la variante de la enzima mananasa se selecciona preferiblemente para mayor estabilidad térmica y mayor estabilidad proteolítica y mayor actividad específica en al menos una ronda de mutagénesis (etapas a hasta c), preferiblemente más de una ronda, es decir, rondas de selección iterativas.

La enzima mananasa original se deriva preferiblemente de *Trichoderma reesei* RUT-C30.

40 En los métodos de preparación de una variante de la enzima mananasa, cuyos métodos comprenden someter una secuencia de ADN que codifica una enzima mananasa original a mutagénesis, la secuencia de ADN que codifica una enzima mananasa matriz se somete preferiblemente a mutagénesis aleatoria, más preferiblemente a PCR propensa a errores, incluso más preferiblemente a PCR de umbral de error.

45 El método preferido para la mutagénesis de una secuencia de ADN que codifica una enzima mananasa original es PCR propensa a errores, más preferiblemente PCR de umbral de errores. Otros métodos de mutagénesis se pueden utilizar ya sea en lugar de PCR propensa a errores / PCR de umbral o junto con PCR propensa a errores / PCR de umbral. Estos métodos son bien conocidos por cualquier persona capacitada en la técnica.

50 El término "expresión en una célula huésped" cuando se utiliza en el contexto de las realizaciones que se refieren a 'un método para la preparación de una variante de la enzima mananasa' es preferiblemente definida como la producción de la variante de la enzima mananasa en un organismo vivo, órgano o célula como se define aquí. Anfitriones preferidos son *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, se considera que para el propósito de la selección de las variantes de la enzima mananasa como se describe aquí,

tales métodos pueden emplear métodos *in vitro* de la expresión de variantes de la enzima mananasa, preferiblemente para uso en la etapa (c) de dichos métodos, que utilizan la maquinaria de transcripción y traducción aislada de una o más células aisladas de uno o más organismos vivos o virus. Tal producción *in vitro* de mananasas variantes de la invención también se puede utilizar para la selección de mananasas variantes preferidas. La expresión *in vitro* puede ser convenientemente realizada usando técnicas estándar. Para referencia véase 'In vitro Expression Guide' disponible de Promega Inc. (Parte # BR053).

Proteínas de fusión: También se entiende que la secuencia de aminoácidos revelada en la SEQ ID NO: 1 y derivados de la misma descritos en este documento para uso de acuerdo con la presente invención puede ser producida como una proteína de fusión del terminal C y/o N, por ejemplo para ayudar en la extracción, detección y/o purificación y/o para añadir propiedades funcionales a la molécula de mananasa. El compañero de la proteína de fusión puede ser cualquier proteína o péptido que incluya cualquier secuencia de polipéptido derivada del huésped nativo, cualquier otra secuencia de aminoácidos de origen natural así como secuencias sintéticas. Los ejemplos de compañeros de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, glutationa-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (enlazamiento a ADN y/o dominios de activación de la transcripción), FLAG, etiquetas de MYC u otras etiquetas bien conocidas por cualquier persona capacitada en la técnica. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítico entre el compañero de la proteína de fusión y la secuencia de la proteína de interés para permitir la remoción de secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia de la proteína de interés.

Preferiblemente las variantes de mananasa se fusionan con dominios funcionales que incluyen péptidos líder, propéptidos, dominios de enlazamiento o dominios catalíticos. Ejemplos de secuencias líder preferidas que proporcionan la proteína de fusión con propiedades mejoradas, tales como una mayor expresión y / o secreción se detallan en otro lugar en esta solicitud.

Los dominios de enlazamiento pueden incluir, pero no se limitan a, dominios de enlazamiento de carbohidratos de diferentes especies, proporcionando mayor afinidad para los componentes de carbohidratos presentes durante la aplicación de la mananasa. También se prevé que el dominio del compañero de fusión pueda comprender dominios enzimáticamente activos, tales como las actividades de apoyo de la acción de la mananasa en la producción del producto deseado, proporcionando actividad sobre uno o más componentes del sustrato y/o cualquier producto de la reacción catalítica de la mananasa. Los ejemplos no limitantes de los dominios catalíticos incluyen: celulasas, hemicelulasas, tales como xilanasa, exomananasas, glucanasas, arabinasas, galactosidasas, pectinasas, y/o otras actividades, tales como proteasas, lipasas, fosfatasas ácidas y/o otras o fragmentos funcionales de las mismas.

Enlazadores: Las proteínas de fusión pueden estar opcionalmente enlazadas con la mananasa a través de una secuencia enlazadora compuesta preferiblemente de menos de 100 aminoácidos, más preferiblemente menos de 50 aminoácidos, menos de 30 aminoácidos o menos de 20 aminoácidos. El enlazador puede simplemente unir la mananasa y el dominio de fusión sin afectar significativamente a las propiedades del cualquiera de los dos componentes, o puede opcionalmente tener importancia funcional para la aplicación pretendida, debido a su composición de aminoácidos, estructura y/o modificación posterior a la traducción que se presenta durante la expresión en el huésped nativo o cualquier huésped heterólogo adecuado. La fuente de la secuencia enlazadora puede ser de una secuencia de aminoácidos de cualquier organismo o cualquier secuencia sintética de péptidos.

Proteínas adicionales: Las mananasas descritas aquí también pueden ser utilizadas junto con una o más proteínas adicionales de interés (las POI) o secuencias de nucleótidos de interés (las NOI). Ejemplos no limitativos de las POI incluyen: hemicelulasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lactasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,4-glucanasas, celulasas, xilosidasas, xilanasas, xiloglucanasas, esterases de acetilxilano, galactanasas, exomananasas, pectinasas, pectina liasas, pectinesterasas, poligalacturonasas, arabinasas, ramnogalacturonasas, lacasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, proteasas, amilasas, fosfatasas, enzimas lipolíticas, cutinasas y/o otras. Estas enzimas incluyen, por ejemplo, aquellas que modulan la viscosidad de la solución/suspensión del sustrato o incrementan la accesibilidad y/o solubilidad del sustrato de polimánosa. La NOI puede incluso ser una secuencia antisentido para cualquiera de esas secuencias. Como se describió anteriormente, la POI puede incluso ser una proteína de fusión. La POI puede incluso estar fusionada a una secuencia de secreción.

Otras secuencias también pueden facilitar la secreción o incrementar el rendimiento de POI secretada. Tales secuencias podrían codificar para proteínas chaperonas como por ejemplo el producto del gen *cyp B* de *Aspergillus niger* descritas en la solicitud de patente del Reino Unido 9821198.0.

La NOI que codifica para POI puede ser modificada por ingeniería genética con el propósito de alterar su actividad por una cantidad de razones, incluyendo pero sin limitarse a, alteraciones que modifican el procesamiento y/o expresión del producto de expresión de la misma. A modo de ejemplo adicional, la NOI también puede ser modificada para optimizar la expresión en una célula huésped particular. Otros cambios de la secuencia pueden ser deseables con el propósito de introducir sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción.

La NOI que codifica para la POI puede incluir dentro de ella, nucleótidos sintéticos o modificados - tales como las cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato.

La NOI que codifica para la POI puede ser modificada para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias de flanqueo de los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en vez de enlaces fosfodiéster dentro de la cadena principal de la molécula.

Expresión de genes para mananasa: Con el propósito de producir una enzima mananasa, el ADN que codifica la enzima puede ser químicamente sintetizado a partir de secuencias publicadas o obtenido directamente a partir de células huésped que albergan el gen (por ejemplo, por medio de selección de una biblioteca de ADNc o amplificación por PCR). El gen para la mananasa puede ser incluido en un casete de expresión y/o clonado dentro de un vector de expresión adecuado por medio de técnicas estándar de clonación molecular. Tales casetes de expresión o vectores a menudo contienen secuencias que ayudan a la iniciación y terminación de la transcripción (por ejemplo, promotores y terminadores), y pueden contener marcadores seleccionables. Los casetes también pueden contener también una cadena más o menos de ARNm, y su expresión puede o no incluir una etapa de amplificación antes de la traducción del ARNm. El gen para la mananasa que va a ser expresado puede contener o no ciertos dominios de la proteína, tales como dominios de enlazamiento del polímero (por ejemplo, dominios de enlazamiento de carbohidrato) de diferentes especificidades. El casete de expresión o el vector pueden ser introducidos en una célula huésped adecuada de expresión, que expresará luego al correspondiente gen para la mananasa. Los huéspedes particularmente adecuados de expresión son géneros de huéspedes de expresión bacteriana incluyendo *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. fluorescens* o *P. stutzeri*), *Proteus* (por ejemplo, *Proteus mirabilis*), *Ralstonia* (por ejemplo, *Ralstonia eutropha*), *Streptomyces*, *Staphylococcus* (por ejemplo, *S. carnosus*), *Lactococcus* (por ejemplo, *L. lactis*), bacterias de ácido láctico o *Bacillus* (*subtilis*, *megaterium*, *licheniformis*, etc.). También son particularmente adecuados huéspedes de expresión de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansen ULA polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* o *Pichia pastoris*. Especialmente adecuados son los huéspedes de expresión de hongos tales como *Aspergillus niger*, *Chrysosporium lucknowense*, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, etc.) o de *Trichoderma reesei*. También son adecuados los huéspedes de expresión de mamíferos tales como líneas de células de ratón (por ejemplo, NSO), de ovario de hámster chino (CHO) o de riñón de hámster neonato (BHK), sistemas de mamíferos transgénicos tales como conejo, cabra o ganado, otros huéspedes eucariotas tales como células de insecto o sistemas de expresión viral tales como bacteriófagos tipo M 13, fago T7 o lambda, o virus tales como sistemas de expresión de baculovirus. Las secuencias promotoras y/o de señal asociadas con cualquiera de las proteínas secretadas en cualquier huésped particular son candidatas para ser usadas en la producción y secreción heteróloga de genes para mananasa en ese huésped o en otros huéspedes. Como ejemplo, en sistemas de hongos filamentosos, los promotores que dirigen los genes para celobiohidrolasa I (cbhl), glucoamilasa A (glaA), TAKA-amilasa (amyA), xilanasa (exIA), el promotor de gdp CBH1, cbhl, genes para endoglucanasa EGI-EGV, Cel61B, Cel74A, EG1-egl5, promotor de gpd, Pgkl, pkil, EF-lalpha, TEF1, "ADNc1" y hexl son particularmente adecuados y pueden derivarse de una cantidad de organismos diferentes, por ejemplo *A. niger*, *T. reesei*, *A. oryzae*, *A. awamori* y *A. nidulans*. Esos promotores y las secuencias de señal pueden ser mejoradas por medio de optimización de la secuencia que se conoce en el arte y tales secuencias mejoradas de señal son especialmente adecuadas (véase más abajo). El gen para la mananasa se asoció también en forma recombinante con la secuencia adecuada de señal homóloga o heteróloga que condujo a la secreción de la enzima mananasa en el espacio extracelular (o periplásmico), permitiendo por lo tanto la detección directa de la actividad de la enzima en el sobrenadante celular (o espacio periplásmico o lisado). Las secuencias de señal particularmente adecuadas para *Escherichia coli*, otras bacterias Gram negativas y otros organismos conocidos en el arte incluyen aquellos que dirigen la expresión de los genes G3 de los fagos HIYA, DsbA, Pbp, PhoA, PelB, OmpA, OmpT o M 13. Para *Bacillus subtilis*, los organismos Gram positivos y otros organismos conocidos en el arte, particularmente secuencias adecuadas de señal adicionales incluyen aquellas que dirigen la expresión de las levaduras AprE, NPRB, MPR, amyA, AmyE, Blac, SacB, y para *S. cerevisiae* u otras levaduras, incluida la secuencia de señal de la toxina asesina, BarI, Suc2, el factor de acoplamiento alfa, inu1a o Ggplp. Las secuencias de señal pueden ser escindidas por una cantidad de peptidasas de señal, removiéndolas por lo tanto del resto de la proteína expresada. El resto de la proteína expresada puede ser expresada sola o como una fusión con otros péptidos, etiquetas o proteínas localizadas en el terminal N o C de la proteína (por ejemplo, etiquetas 6xhis, HA o FLAG). Las fusiones pueden incluir etiquetas, péptidos o proteínas que facilitan la purificación o detección por afinidad (por ejemplo, etiquetas 6xhis, HA, proteína de enlazamiento de quitina, tiorredoxina o FLAG), así como aquellas que facilitan la expresión, secreción o procesamiento de la mananasa objetivo. Los sitios de procesamiento pueden incluir enteroquinasa, STE13, Kex2 u otros sitios de enlazamiento de proteasa escisión *in vivo* o *in vitro*. Las fusiones que aumentan la expresión pueden incluir todo o parte de una proteína bien expresada y/o bien secretada (por ejemplo, proteínas de celobiohidrolasa de hongos, glucoamilasa, amilasa o de xilanasa) o péptidos artificiales que aumentan la producción / secreción de proteína.

Los genes para mananasa se introducen en células huésped de expresión por medio de una cantidad de métodos de transformación que incluyen, pero no se limitan a, electroporación, transformación o transfección asistida por lípidos ("lipofección"), transfección mediada químicamente (por ejemplo, CaCl y/o CaP), transformación mediada por

acetato de litio (por ejemplo, de protoplastos de células huésped), transformación biolística por "pistola de genes", transformación mediada por PEG (por ejemplo, de protoplastos de células huésped), fusión de protoplastos (por ejemplo, utilizando protoplastos de eucariotas o de bacterias), transformación mediada por liposomas, *Agrobacterium tumefaciens*, adenovirus u otra transformación o transducción viral o por fagos.

5 Alternativamente, las variantes de la enzima se expresan en forma intracelular. Opcionalmente, después de expresión intracelular de las variantes de la enzima, o secreción dentro del espacio periplásmico usando secuencias de señal tales como aquellas mencionadas anteriormente, se puede utilizar una etapa de permeabilización o de lisis para liberar la enzima mananasa dentro del sobrenadante. La interrupción de la barrera de membrana puede efectuarse por medio del uso de medios mecánicos tales como ondas de ultrasonido, tratamiento por presión (prensa francesa), cavitación o el uso de enzimas que digieren la membrana tales como lisozima o mezclas de enzimas. Como una alternativa adicional, los genes que codifican la enzima mananasa se expresan libres de células por medio del uso de un sistema de expresión adecuado libre de células. Por ejemplo, el extracto S30 de células de *Escherichia coli* fue utilizado para este propósito o sistemas disponibles comercialmente (por ejemplo, tecnología CECF de Roche Applied Science, Inc.). En sistemas libres de células, el gen de interés se transcribió típicamente con la ayuda de un promotor, pero la ligación para formar un vector de expresión circular es opcional. El ARN también puede ser añadido en forma exógena o generado sin transcripción y traducido en sistemas libres de células. Las configuraciones de los constructos de expresión para expresión *in vitro* y ejecución de todos los sistemas de expresión anteriores son bien conocidos por aquellos capacitados en el arte.

20 Los métodos anteriores de clonación y expresión del gen para la mananasa de *Trichoderma reesei* son adecuados tanto para expresión a escala industrial como para uso en tamizajes de alto rendimiento para la evaluación de variantes mutadas.

25 Generación de variantes mutadas del gen para la mananasa de *Trichoderma reesei* o la secuencia de señal del factor de acoplamiento alfa: las variantes mutadas de genes pueden ser creadas fácilmente utilizando una cantidad de métodos que son comunes en el arte. Estos incluyen, entre otros, mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mutagénica. El gen para la mananasa de *Trichoderma reesei* se mutó utilizando tales métodos y la biblioteca mutagénica se expresó en *S. cerevisiae* para tamizaje. Con el propósito de distinguir mejor variantes mejoradas las no mejoradas en un tamizaje de alto rendimiento, se encontró conveniente aumentar adicionalmente la secreción en el medio de cultivo de la mananasa de *Trichoderma reesei* de este huésped de levadura. Esto se logró por medio de ingeniería genética del péptido señal de secreción de levadura del factor de acoplamiento alfa (SEQ ID NO: 5) por medio de mutagénesis aleatoria y tamizaje para aumento de la actividad de la mananasa secretada. Por medio de este método, se encontró una secuencia de señal que mejoraba la secreción de *S. cerevisiae* y por lo tanto mejoraba la habilidad para tamizar variantes de las bibliotecas de mananasa (véase el ejemplo 2).

35 Purificación: Como se describió anteriormente, las proteínas de mananasa pueden ser expresadas en una variedad de sistemas de expresión y por lo tanto se deben seleccionar los procesamiento de purificación y de procedimiento secuencia abajo. La proteína de interés puede ser secretada en el espacio extracelular o periplásmico o expresada en forma intracelular. En una realización preferida de la invención, la variante de mananasa se expresa en un huésped microbiano y la proteína es secretada en el espacio periplásmico o extracelular. Las células que expresan las variantes de mananasa se preservan por medio de métodos bien conocidos por aquella persona capacitada en el arte, tal como pero sin limitarse a, existencias congelados. Los cultivos del organismo que se expresa se preparan en un volumen apropiado con métodos estándar de fermentación. En una realización preferida, los cultivos para expresión de la proteína se inoculan a partir de una existencia congelada y el volumen del cultivo se incrementa sucesivamente en los contenedores apropiados. Preferiblemente las células se cultivan en un fermentador y opcionalmente se controlan las condiciones de crecimiento tales como pH, temperatura, oxígeno y/o suministro de nutrientes. Una primera etapa de purificación comprende la separación de las células del sobrenadante utilizando una o más técnicas diferentes, tales como sedimentación, microfiltración, centrifugación, floculación u otras. En una realización preferida, el método aplicado es microfiltración. En caso de expresión intracelular, las células se someten a tratamientos que resultan en la liberación de la proteína del espacio intracelular. Estos tratamientos pueden incluir, por ejemplo tratamiento por presión, enzimático, choque osmótico, congelación, ultrasónico u otro tratamiento para producir un extracto celular que pueda o no ser sometido a purificación adicional.

55 En una forma de realización preferida de la invención, la proteína se secreta dentro el sobrenadante y una etapa opcional de purificación comprende la concentración del sobrenadante por medio de ultrafiltración. Además, la purificación de proteína a partir del sobrenadante o del sobrenadante concentrado se puede realizar con uno o más de diferentes métodos que comprenden métodos de extracción o de fraccionamiento tales como precipitación con sulfato de amonio o etanol o ácido, o métodos cromatográficos, que incluyen, pero no se limitan a, intercambio iónico, interacción hidrófoba, hidroxilapatita, fraccionamiento por tamaño por medio de filtración en gel, cromatografía de fosfolipos o lectina y cromatografía de afinidad o cualquier combinación de los mismos. En un método más preferido las proteínas etiquetadas por afinidad se purifican por medio de cromatografía de afinidad con quelato metálico para obtener una proteína altamente pura. El método de purificación preferido produce una pureza

de la proteína de > 30%, en un método más preferido, la pureza es > 50%, > 60%, > 70% o > 80%. En un método incluso más preferido, la pureza es > 90%, en un método aún más preferido, la pureza es > 95% y en el método más preferido, la pureza es > 98%.

5 En otra forma de realización preferida de la invención, el sobrenadante o el sobrenadante parcialmente purificado por medio de ultrafiltración o el sobrenadante concentrado y/o diafiltrado se seca por medio de cualquiera de los diferentes métodos técnicos, tales como, pero sin limitarse a, secado por atomización, liofilización, evaporación por corriente descendente, evaporación en capa fina, evaporación por centrifugación, secado en correa transportadora o cualquier combinación de los mismos.

10 En una forma de realización preferida adicional de la invención, la suspensión de células fermentadas que incluye las variantes expresadas de mananasa se seca completamente utilizando procesos tales como, pero sin limitarse a, secado en lecho fluido, secado en correa transportadora, secado por atomización o secado en tambor o cualquier combinación de los mismos.

15 Formulaciones: En general, las composiciones de la mananasa o cualquier derivado descrito aquí pueden ser o bien líquidas o secas. Las composiciones líquidas pueden comprender la mananasa sola o en combinación con otras proteínas o enzimas, y pueden contener aditivos que soporten la estabilidad y/o actividad de la mananasa u otras proteínas o enzimas en la composición. Estas incluyen, pero no se limitan a, glicerol, sorbitol, propilén glicol, sales, azúcares, conservantes, amortiguadores de pH y carbohidratos. Típicamente, la composición líquida es una dispersión, suspensión o solución en base acuosa o en base oleosa.

20 Las composiciones secas pueden ser generadas a partir de cualquier composición líquida que incluya al sobrenadante de la fermentación o suspensión de células o extracto celular, por medio de secado por atomización, liofilización, evaporación en corriente descendente, evaporación en capa fina, evaporación centrífuga, secado en correa transportadora o cualquier combinación de los mismos. Las composiciones de secado pueden ser granulados de un tamaño adecuado para que sean compatibles con las aplicaciones adicionales secuencia abajo, tales como procesamiento de alimentos o piensos o para calificar un componente para alimentos o piensos para animales.

25 Antes del secado se puede añadir una agente a granel a la composición líquida que, después del secado, mejora efectivamente las propiedades de la composición seca tales como proporcionar una estabilidad térmica mayor debido a la protección de la enzima de los factores ambientales por medio del reactivo a granel, mejores propiedades técnicas de manipulación y otras.

30 Una vez que se obtiene una preparación seca, se pueden preparar granulados aglomerados utilizando técnicas de aglomeración, por ejemplo en un mezclador de cizallamiento durante el cual un material de relleno y la enzima se aglomeran en forma conjunta para formar gránulos. Granulados de absorción se preparan permitiendo que los núcleos de un material portador absorban o sean recubiertos con la enzima. Los materiales de relleno típicos incluyen sulfato disódico, caolín, talco, silicato de magnesio y aluminio y fibras de celulosa. Opcionalmente, aglutinantes tales como dextrinas se incluyen también en los granulados aglomerados. Se pueden utilizar materiales portadores típicos que incluyen almidón, por ejemplo, en forma de yuca, maíz, patata, arroz y trigo, o sales. Opcionalmente los granulados se recubren con una mezcla de recubrimiento. Tal mezcla comprende agentes de recubrimiento, preferiblemente agentes de recubrimiento hidrófobos, tales como aceite de palma hidrogenada y sebo de vacuno, y, si se desea, otros aditivos tales como carbonato de calcio y caolín.

40 En una realización particularmente preferida, las composiciones que comprenden las manansas de la invención están destinadas a aplicaciones en procesamiento de alimentos y de piensos o como suplemento para alimentos y piensos. En este caso, las composiciones de mananasa pueden contener adicionalmente otros sustituyentes tales como agentes colorantes, compuestos aromáticos, estabilizantes, vitaminas, minerales, otras enzimas para mejoramiento del pienso o alimento y similares. Esto aplica en particular a las así llamadas premezclas. Los aditivos para alimentos de acuerdo con la presente invención pueden combinarse con otros componentes para alimentos para producir productos alimenticios procesados. Tales otros componentes para alimentos incluyen uno o más, de otros aditivos para alimentos preferiblemente termoestables, suplementos enzimáticos, vitaminas y aditivos minerales para alimentos. El aditivo para alimento combinado resultante, incluyendo posiblemente varios tipos diferentes de compuestos pueden ser entonces mezclados en una cantidad apropiada con los otros componentes para alimentos, tales como las proteínas de cereales o planta para formar un producto alimenticio procesado. El procesamiento de estos componentes en un producto alimenticio puede ser llevado a cabo utilizando cualquiera de los métodos disponibles en la actualidad.

55 En una forma de realización preferida de la invención, la composición de mananasa comprende adicionalmente una cantidad efectiva de una o más enzimas para mejoramiento del pienso o del alimento, en particular seleccionado del grupo que consiste de, pero sin limitarse a, hemicelulasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lactasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,4-glucanasas, celulasas, xylosidasas, xilanasas, xiloglucanasas, esterases de acetilxilano, galactanasas, exo-manansas, pectinasas, pectinliasas, pectinesterasas, poligalacturonasas, arabinasas,

ramnogalacturonasas, lacasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, proteasas, amilasas, fosfatasas, enzimas lipolíticas, cutinasas y/o otras. Las formulaciones de las mananasas de la invención se utilizan preferiblemente para el procesamiento y/o fabricación de alimentos o piensos para animales.

5 Aplicaciones técnicas: Se prevé el uso de los derivados de mananasa como aditivos para alimentos o coadyuvantes digestivos que promueven la degradación de material alimenticio que contiene oligomanosa, liberando así oligomanosas potencialmente benéficas o derivadas de las mismas.

10 Otra aplicación en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es la producción de mano-oligosacáridos como prebióticos importantes de PKE para piensos y alimentos. Por medio del tratamiento de PKE o de otros componentes que contienen galactomanano con mananasa, se producen mano-oligosacáridos y D-manosa. Los mano-oligosacáridos se utilizan como componentes prebióticos para piensos y alimentos: los mano-oligosacáridos promover el crecimiento de probióticos (por ejemplo, Bifidobacterias y Lactobacillus sp), inhiben el crecimiento de enterobacterias de Salmonella, neutralizan las propiedades antinutricionales de lectinas y encuentran aplicaciones en la industria farmacéutica. Además los mano-oligosacáridos y especialmente manosa se sospecha que son componentes estimuladores del sistema inmunológico en piensos.

15 Aún otra aplicación en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es la escisión de los componentes que contienen manano en la pared celular de frutas para mejorar la recuperación del jugo, por ejemplo, por medio de la adición de dichas enzimas a piñas, limones, naranjas, limas, pomelos, antes del procesamiento exprimido.

20 Otra aplicación en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es el uso de la mananasa de acuerdo a la presente invención para mejorar la producción en la extracción de aceite de palmiste. El contenido de aceite que queda en la torta de presión de palmiste está entre 5 a 12% después del prensado. Este resto puede ser reducido adicionalmente por medio de extracción química hasta aproximadamente un 3%. Por medio de la aplicación de una mananasa de acuerdo con la invención, la liberación de la grasa podría aumentar rápidamente, proporcionando así un proceso mejorado (véase el ejemplo 18). Adicionalmente, la torta de presión resultante de palmiste sería de mayor calidad debido al contenido reducido de fibras de galactomanano que se sabe que son componentes antinutritivos en los piensos.

25 Incluso otra aplicación en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es el suministro de D-manosa de PKE u otros componentes que contienen galactomanano. La harina de palmiste contiene aproximadamente 20% de manosa enlazada como fibras de galactomanano. El tratamiento de PKE, de copra o de otras sustancias sin procesar que contienen galactomanano con mananasas provoca la liberación de D-manosa (véanse los ejemplos).  
30 La manosa y sus derivados son ingredientes utilizados en los alimentos (por ejemplo, productos alimenticios dietéticos bajos en calorías), productos farmacéuticos (la manosa cura más del 90% de todas las infecciones del tracto urinario), cosméticos, textiles y en la fabricación de polímeros. Debido al suministro limitado de manosa, es muy costosa en la actualidad en comparación con otros azúcares de hexosa más comunes y su suministro es escaso. La D-manosa también se puede utilizar como materia prima para la producción de manitol. Manitol en sí mismo se deriva de la manosa a través de reducción con mucho mayor rendimiento y menos subproductos que de la conversión de la fructosa. El manitol es un poliol ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades funcionales únicas: El manitol se utiliza como edulcorante, para formulaciones farmacéuticas (tabletas masticables y polvos granulados), en la producción de la goma de mascar, como agente para dar cuerpo, textura y contra el apelmazamiento para la alimentos, como componente de alimentos para diabéticos y de compuestos farmacéuticos osmóticamente activos.

35 Además, en el contexto anterior del procesamiento de alimentos y piensos, se provee el uso de una mananasa de acuerdo con la invención para la hidrólisis parcial de galactomananos por incubación de goma guar o de goma de algarrobo. Los hidrolizados resultantes se usan en la industria de alimentos y cervecera como componentes de texturizado y para aplicaciones farmacéuticas. Producción de azúcares: Las enzimas mananasa descritas en la  
45 presente invención son en particular útiles para la producción de azúcares u oligosacáridos de material vegetal que contiene polimánosa tales como palmiste, coco, konjac, goma de algarrobo, goma guar y semillas de soja. Se prefiere material vegetal como harina de palmiste, torta de presión de palmiste, harina de copra, pellas de copra y vainas de semilla de soja.

50 En una realización particularmente preferida las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención se aplican para la producción de manosa y manopolímeros tales como manobiosa, manotriosa, manotetraosa, manopentaosa, manohexaosa, manoheptaosa, manooctaosa, manononaosa y polímeros superiores de manosa y/o derivados de los mismos. También se prefieren los galactosil manooligosacáridos de los mismos con diferentes proporciones entre galactosa y manosa en el rango de 1 a 0,05. En una realización preferida adicional de la presente invención, los azúcares se componen de manosa y glucosa, y se denominan como glucomanos. Estos polioles puede estar  
55 compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más monómeros de manosa y/o glucosa con un contenido de manosa de 1/15, 1/14, 1/13, 1/12, 1/11, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3, 1/2, 1, 2/3, 3/4, 3/5, 4/5, 5/6, 2/7, 3/7, 4/7, 5/7, 6/7, 3/8, 5/8, 7/8, 2/9, 4/9, 3/10, 2/11, 4/11, 3/12, 2/13 o 1/14. También se prefieren particularmente los galactosil

glucomanooligosacáridos de los mismos con diferentes proporciones entre galactosa y manosa en el rango de 1 a 0,05.

5 En una realización preferida adicional de la presente invención, la mananasa se utiliza en combinación con otras carbohidrasas como glucanasa, y/o xilanasa, y/o alfa-galactosidasa y/o celulasa para la hidrólisis del material vegetal con el propósito de generar los azúcares. En una realización más preferida de la presente invención, la hidrólisis del materia vegetal que contiene polimánosa conduce a azúcares que exhiben una funcionalidad prebiótica. Estos azúcares se generan para promover el crecimiento de probióticos, bacterias que se sabe que dan soporte a un sistema inmunológico sano. Ejemplos de tales bacterias son las bifidobacterias. Bifidobacterias conocidas son *B. adolescens*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. bifidum*, *B. Bourn*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. mínimo*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum* y *B. thermophilum*.

15 Extracción de café: Las enzimas mananasa descritas de acuerdo con la presente invención se utilizan para la hidrólisis de galactomanano que está presente en extractos líquidos de café. En una realización preferida de la invención, la mananasa se utiliza para inhibir la formación de geles a medida que se presentan durante la liofilización de extractos líquidos de café. La menor viscosidad del extracto reduce el consumo de energía durante el secado. En aún una realización más preferida de la invención las enzimas mananasa se aplican en una forma inmovilizada lo cual reduce el consumo de enzima y previene la contaminación del extracto de café. En este contexto, otra aplicación interesante es el uso de enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención para la producción de manosa o de mano-oligosacáridos a partir de residuos de café, con el propósito de recibir productos de mayor valor. Como se describió anteriormente, la mananasa libera manosa u oligosacáridos de los residuos de café que son componentes funcionales de gran valor de alimentos y piensos. En la industria de bebidas de café, los posos de café se usan generalmente como combustible o son tratados como residuos industriales. El café tostado contiene 1.8 - 4.4% de manano. Por lo tanto los posos de café contienen una gran cantidad de  $\beta$ -manano, que puede ser convertido en mano-oligosacáridos por medio de hidrólisis enzimática. Los mano-oligosacáridos obtenidos a partir de manano de café se dice que reduce los niveles de lípidos en suero en los humanos (Jpn J food eng 6 (2005)).

20 Piensos para animales: Varios factores antinutricionales limitan el uso de material vegetal específico en la preparación de piensos para animales y alimentos para humanos. El material vegetal que contiene oligomananos como manano, galactomanano, glucomanano y galactoglucomanano se describe para reducir la digestibilidad y absorción de compuestos nutricionales, como vitaminas, minerales, azúcares y grasas por los animales. Los efectos negativos son en particular debidos a la alta viscosidad de los manopolímeros y a la capacidad de los manopolímeros para adsorber compuestos nutricionales. Estos efectos pueden ser eliminados / reducidos a través del uso de enzimas que degradan manopolímeros, a saber, enzimas mananasa que luego permiten una proporción más alta de material vegetal barato que contiene manopolímero barato en los piensos y por lo tanto una reducción de costes. Adicionalmente, a través de la actividad de las enzimas mananasa, los manopolímeros se degradan hasta monosacáridos que pueden ser fácilmente asimilados y proporcionar energía adicional.

35 Con el propósito de utilizar una enzima como suplemento efectivo para piensos, por ejemplo, para animales monogástricos, como aves de corral o cerdos, debe ser estable en el estómago. Esto significa que tiene que ser estable a pH bajo (aproximadamente pH 2 - 3) y adicionalmente debe ser resistente contra pepsina a este pH bajo. Además, tales enzimas necesitan ser activas a pH bajo (aproximadamente pH 3,0) para ser efectivas en el estómago. Las enzimas mananasa proporcionadas en la presente invención reúnen todos estos criterios a diferencia de otras enzimas mananasa como por ejemplo la mananasa de tipo silvestre de *Trichoderma reesei* que no es estable a pH bajo, en particular no es estable contra pepsina a pH bajo. Por lo tanto, las enzimas mananasa proporcionadas en la presente invención son especialmente adecuadas para aplicaciones con piensos en las cuales la enzima tiene que ser activa en el animal.

40 Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son útiles como aditivos para piensos para animales monogástricos tales como aves de corral y cerdos, así como para alimentación humana. El pienso puede sin embargo también ser suministrado a patos, gansos, así como bovinos, caninos, caprinos, equinos, felinos, así como crustáceos y peces. Las enzimas mananasa también pueden ser utilizadas para tratar previamente el pienso en vez de añadirlo al mismo.

50 En una realización preferida de la invención, las enzimas mananasa se añaden al piensos para cerdos destetados, lechones, cerditos, cerdos de engorde, cerdos en crecimiento, gallinas ponedoras, pollos de engorde, pavos.

55 En una forma de realización preferida adicional de la invención, las enzimas mananasa son aditivos para piensos compuesta de material vegetal tal como palmiste, coco, konjac, goma de algarrobo, goma guar, semillas de soja, cebada, avena, lino, trigo, maíz, semillas de lino, pulpa de cítricos, semilla de algodón, cacahuetes, colza, girasol, guisantes, altramuces y vitaminas, así como minerales. En una forma de realización incluso más preferida de la invención, las enzimas mananasa son aditivos para piensos compuestas parcialmente de harina de palmiste, torta

de presión de palmiste, harina de copra, pellas de copra y/o vainas de soja.

5 En una forma de realización preferible adicional de la invención, las enzimas mananasa se usan en combinación con otras enzimas seleccionadas del grupo que consiste de, pero sin limitarse a, fitasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, pectinasas, xilanasas, arabinoxylanases, proteasas, beta-glucanasas, celulasas, galactanasas, endoglucanasas, xilosidasas, cutinasas, lipasas y/o fosfolipasas para la preparación de piensos. Las enzimas mananasa con o sin enzimas adicionales pueden ser usadas también en combinación con minerales, vitaminas y otros suplementos típicos para piensos.

10 Ya que las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son enzimas termoestables, pueden ser sometidas a calor sin perder actividad significativa. Por lo tanto, las enzimas mananasa se pueden utilizar en procesos de producción de piensos peletizados en los cuales se aplica calor a la mezcla de piensos antes de la etapa de peletización, como es el caso en la mayoría de los molinos comerciales para pellas. La enzima mananasa se puede añadir a los otros ingredientes para piensos por adelantado a la etapa de peletización o después de la etapa de peletización a las pellas de pienso ya formadas. Dentro del alcance de la presente invención, se prefiere la adición antes del proceso de peletización.

15 En una forma de realización preferible adicional de la presente invención, las enzimas mananasa se utilizan en piensos para animales que son especialmente suministrados a animales bajo circunstancias en las cuales no se desean antibióticos.

20 En una realización incluso más preferida, las enzimas mananasa se utilizan en piensos para animales parcialmente compuestos de harina de palmiste, torta de presión de palmiste, harina de copra, pellas de copra y/o vainas de soja. En la realización más preferida, las enzimas mananasa se utilizan en piensos animales para pollos de engorde que están parcialmente compuestos de harina de palmiste, torta de presión de palmiste, harina de copra, pellas de copra y/o vainas de soja.

25 Industria de la pulpa de papel: Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son útiles en el blanqueado ayudado por enzimas de pulpas de papel tales como pulpas químicas, pulpa semiquímica, pulpas kraft, pulpas mecánicas o pulpas preparadas por medio del método de sulfito. Las pulpas pueden ser también pulpas completamente libres de cloro blanqueadas con oxígeno, ozono, peróxido o peroxiácidos.

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, las enzimas mananasa se utilizan para el blanqueamiento asistido por enzimas de pulpas producidas por medio de métodos de fabricación de pasta modificados o continuos que exhiben un bajo contenido de lignina. En una realización adicionalmente preferida de la presente invención, las enzimas mananasa en tales aplicaciones se pueden ser aplicadas ya sea solas o preferiblemente en combinación con enzimas xilanasas y/o endoglucanasas y/o alfa-galactosidasas y/o celobiohidrolasa.

35 Agentes de blanqueamiento y/o agente de desencolado en la industria textil: Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son también útiles para el blanqueamiento de fibras celulósicas que no sean de algodón, hilo o textiles que contienen lino, yute, ramio o lienzo mediante la incubación de la fibra, hilo o textil con una mananasa de acuerdo con la presente invención durante un tiempo dado y bajo condiciones adecuadas para producir un blanqueamiento de la fibra, hilo o textil. La degradación de la hemicelulosa mejora el proceso de blanqueamiento del textil.

40 En el estampado textil que utiliza una pasta para estampado que contiene un colorante y un polímero biológico (por ejemplo, goma guar) como espesante, la remoción del espesante y el exceso de colorante es mucho más eficiente lavando el estampado en presencia de mananasa. La descomposición enzimática del espesante disminuye el tiempo de proceso así como la cantidad de energía y de agua necesarios para alcanzar una calidad satisfactoria del textil.

45 Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son útiles en el desencolado de textiles elaborados a partir de, por ejemplo, fibras sintéticas en donde se utilizan a menudo galactomananos como la goma guar o goma de algarrobo como agentes de encolado.

Estimulación de pozos de petróleo y de gas por medio de fracturación hidráulica: Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son útiles en un método de fracturación hidráulica utilizado en la estimulación de pozos de petróleo o gas. Aquí, las enzimas mananasa actúan como agentes de licuefacción en un fluido hidráulico que se basa en o que está compuesto de un manopolímero y usualmente contiene arena.

50 Ya que las enzimas mananasa de acuerdo con la presente invención son enzimas termoestables, se usan preferiblemente en aplicaciones de fracturación hidráulica que se llevan a cabo a altas temperaturas.

En otra forma de realización preferida de la invención, la actividad de licuación de las enzimas mananasa en una aplicación de fracturación hidráulica se controla (inhibo o promueve) por medio de las condiciones ambientales tales como el pH y la temperatura.

5 Detergentes: Las enzimas mananasa acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en composiciones detergentes con el propósito de facilitar la remoción de manchas / suciedad que contienen manopolímero. En una forma de realización preferida de la presente invención, las enzimas mananasa se utilizan en composiciones detergentes en combinación con otras enzimas del grupo de las amilasas, celulasas, lipasas, proteasas, pectinasas y endoglucanasas.

10 Remoción de biopelículas: Las enzimas mananasa descritos en la presente invención son útiles para la remoción de biopelículas que contienen manopolímero. Preferiblemente, para tales aplicaciones las enzimas mananasa se usan en combinación con detergentes y/o con otras enzimas del grupo de las alfa-galactosidasas, pectinasas, xilanasas, arabinoxilanasas, proteasas, beta-glucanasas, celulasas, galactanasas, endoglucanasas, xilosidasas, cutinasas y lipasas.

15 Sistemas de suministro: Las enzimas mananasa acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para el suministro de materia en forma dirigida y/o que depende del tiempo. Esto se logra a través del uso de sistemas que se basan en geles de manopolímeros que contienen y transportan la materia. La función de la enzima mananasa en tal sistema es la liberación controlada de la materia por medio de degradación parcial o completa del gel, debido a un cambio específico en el ambiente del gel, por ejemplo, el pH y/o la temperatura que activa las enzimas mananasa.

20 En una realización más preferida de la presente invención, las enzimas mananasa se utilizan para el suministro en forma dirigida de un medicamento en una aplicación farmacéutica.

Procesamiento de recursos renovables:

25 Los recursos renovables, es decir, sustratos de biomasa que se cultivan y se cosechan tallos como cultivos, paja, madera y productos de madera, están recibiendo más y más atención, ya que son sustratos adecuados para la producción de combustibles biológicos, es decir, combustibles sólido, líquido o gaseosos tales como biodiesel, biogas, aceite vegetal, bioetanol, biobutanol, biohidrógeno, bio-dimetil éter, biometanol, BTL ("biomasa a líquido")-combustible, GTL ("gas a líquido")-combustible, y similares. En la primera generación de combustibles biológicos, dichas plantas han sido convertidas utilizando métodos establecidos de la industria de alimentos, es decir, se exprimieron con el propósito de obtener aceite vegetal o granos que contienen almidón que fueron convertidos en azúcar y posteriormente fermentados con levadura con el fin de obtener bioetanol. Esto significa que las reservas de energía (es decir, grasa y/o almidón) de dichas plantas fueron utilizadas exclusivamente. Esto condujo a pobres rendimientos energéticos, o pobres cantidades de producción de biocombustible por acre. En la segunda generación de combustibles biológicos, no solamente se utilizaron las reservas de energía de dichas plantas, si no que el enfoque tiende a utilizar la biomasa completa de la planta. En este contexto, una mananasa de acuerdo con la invención se puede utilizar para convertir la biomasa vegetal que contiene hemicelulosa en azúcares, los cuales pueden ser metabolizados por levaduras específicas (por ejemplo, *Saccharomyces* sp.) o cepas bacterianas y otros microorganismos con el propósito de producir productos de fermentación. Estos productos de fermentación pueden ser combustibles como el bioetanol, biobutanol, pero también pueden ser moléculas que sirven como bloques de construir tales como el ácido 3-hidroxipropiónico, ácido aspártico, ácido glucónico y xilitol. Para más moléculas que sirven como bloques de construcción que pueden derivarse de azúcares véase (Werpy y Petersen (2004) Top value added chemicals from biomass: Volumen 1 - Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Reporte del laboratorio nacional de energías renovables NREL/TP-510-35523, figura 3 y tabla 8).

45 Otros usos potenciales comprenden el procesamiento catalítica de productos que han sido obtenidos a partir de recursos renovables con la ayuda de mananasas de acuerdo con la invención. Esto comprende el procesamiento de glucosa y/o de fructosa, ambas obtenidos con la ayuda de un mananasa de acuerdo con la invención, en 2,5-dimetilfurano, un compuesto heterocíclico que se supone que tiene propiedades como combustible mucho mejores que las del bioetanol, ya que tiene una densidad de energía mayor al 40%, es químicamente estable e insoluble en agua.

50 Dichos enfoques extraen grandes beneficios de las propiedades mejoradas de las mananasas de acuerdo con la invención, particularmente de la estabilidad térmica mejorada. Esto significa que la respectiva conversión de biomasa en azúcar puede tener lugar bajo condiciones de alta temperatura, que aceleran el respectivo proceso y por lo tanto los hace económicamente más eficiente.

55 En recientes experimentos de los inventores, los sustratos torta de presión de palmiste (PKE) fueron utilizados para levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Dichos sustratos contienen aproximadamente 37% de galactomanano. Resultó que PKE tratado con dos mananasas de acuerdo con la invención (es decir, variante B, variante C y/o

variante 31) conducen a la liberación de una gran cantidad de azúcares, y por lo tanto resultó un mejor crecimiento de la levadura en comparación con PKE no tratado. Este es un claro indicio hacia el postulado anteriormente, es decir que las mananasa de acuerdo con la invención puede ser herramientas útiles para mejorar el rendimiento, por ejemplo en la producción de bioetanol de fuentes renovables (véase el ejemplo 19).

- 5 Todos estos usos de una mananasa de acuerdo con la invención tienen en común que estos enfoques sacan un beneficio substancial de las propiedades mejoradas de la mananasa de acuerdo a la invención, particularmente en términos de termoestabilidad mejorada y resistencia mejorada frente a bajos valores de pH y enzimas proteasa.

- 10 Esto se debe principalmente al hecho de que la mayoría de dichos usos se llevan a cabo en entornos con condiciones desfavorables, como en los tractos digestivos de mamíferos, donde predominan valores de pH bajos, o a temperaturas elevadas que se pueden aplicar para acelerar, facilitar y optimizar económicamente procesos de hidrólisis como la conversión de los recursos renovables en azúcares como se describió anteriormente.

La presente invención se describe adicionalmente mediante las siguientes Figuras y Ejemplos, que sin embargo, no deben interpretarse como limitantes de la invención.

Descripción detallada de las figuras

- 15 Figura 1: termoestabilidad de mananasa de *Trichoderma reesei* y la variante RS3. La mananasa de tipo silvestre de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y la variante S3R se compararon con respecto a su termoestabilidad en la producción de manosa a partir del sustrato de torta de presión de palmiste (A) y de galactomanano de algarrobo a diferentes temperaturas (B). Se demuestra que dentro del error experimental las dos mananastas se comportan de manera similar y por lo tanto la mutación S3R se concluye que no tiene efecto sobre las propiedades que son sometidas a mejora para las variantes de la enzima reveladas en esta solicitud.

- 20 Figura 2: Termoestabilidad de variantes de mananasa y de tipo silvestre en amortiguador. Las muestras de las diferentes variantes fueron incubadas a las temperaturas indicadas durante 45 min y se midió la actividad residual con galactomanano AZCL normalizado para actividad a 25° C. La temperatura donde la actividad residual es igual al 50% puede ser llamada TI50 y se resume en la tabla 3. La variante C tiene un TI50 incrementado en 8° C comparación con la mananasa de tipo silvestre.

- 30 Figura 3: Actividad de variantes a diferentes temperaturas, sobre el galactomanano. Los rendimientos totales de manosa después de incubación de diferentes variantes de mananasa con sustrato galactomanano durante 16 horas a diferentes temperaturas se normalizaron para el rendimiento manosa a 63° C. La disminución del rendimiento de manosa con la temperatura se debe básicamente al decaimiento de la enzima como se demuestra en la figura 1. Sin embargo, el rendimiento relativo de manosa con la temperatura refleja un compuesto de termoestabilidad y temperatura óptima. Este compuesto, sin embargo es un parámetro relevante para un proceso técnico y demuestra la superioridad de las variantes de la invención.

- 35 Figura 4: termoestabilidad de mananastas de tipo silvestre y de variantes. Se evaluaron las diferentes mananastas por la actividad y la actividad residual sobre el sustrato de torta de presión de palmiste a diferentes temperaturas. La actividad residual se midió después de 71 horas de incubación a las temperaturas indicadas con galactomanano de AZCL. Se observa claramente que la actividad residual de la mananasa comercial y de tipo silvestre ha disminuido a 50% y básicamente a 0% a 63° C y 67° C, respectivamente, mientras que la mejor variante mananasa muestra > 70% de actividad residual incluso a 70° C. Esto demuestra claramente la mayor termoestabilidad de las variantes.

- 40 Figura 5: rendimientos de manosa sobre el sustrato PKE. Se incubó la torta de presión de palmiste con diferentes variantes a diferentes temperaturas y tiempos. Se utilizó la misma cantidad de mananasa para cada variante. Se puede observar claramente que la cantidad total de manosa generada es más alta para la variante B, que no tiene la termoestabilidad más alta, pero una combinación favorable de actividad específica más alta y mayor termoestabilidad. Mientras que para el tipo silvestre el rendimiento de manosa disminuye drásticamente con la temperatura, permanece constante para la variante B e incluso aumenta ligeramente para la variante C. Esto demuestra el mayor rendimiento de manosa y estabilidad térmica de las variantes sobre un sustrato técnicamente relevante.

- 45 Figura 6: rendimiento de manosa con diferentes concentraciones de la variante B. La mayor termoestabilidad de la variante de mananasa permite ejecutar el proceso con menores cantidades de enzima, manteniendo constante el rendimientos de manosa. Se pueden obtener rendimientos similares de manosa con aproximadamente 50% de variante B comparado con el de tipo silvestre, con base en la masa de proteína.

- 50 Figura 7: pepsina y estabilidad de pH. Se investigó la estabilidad de diferentes variantes de mananasa contra incubación a pH 2,3 y pepsina a pH 2,3. La actividad residual se presenta como una función del tiempo de

incubación. Claramente, las variantes muestran una mayor estabilidad contra condiciones de pH bajo. La variante C permanece 100% activa después de 3 horas de incubación a pH 2,3, mientras que la de tipo silvestre está básicamente inactiva. Se observa una tendencia similar para la estabilidad proteolítica contra la pepsina. Nuevamente, la variante C pierde solamente 20% de su actividad, mientras que todas las otras son más susceptibles a la degradación proteolítica y a la inactivación inducida por el pH.

Figura 8: perfil de actividad con el pH. Con los métodos dados en el Ejemplo 15, la actividad de las variantes B y C se determina en un rango de valores de pH desde pH 2 hasta pH 5,5. Las variantes muestran mayor actividad a condiciones de pH bajo que confieren una actividad alta en el tracto gastrointestinal superior de animales cuando se utiliza como un aditivo para piensos.

Figura 9: comparación de la liberación de manosa a partir de goma de guar, goma de algarroba, y glucomanano de konjac, todos tratados con mananasa de acuerdo con la invención (véase el Ejemplo 20).

### Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se proporcionan los materiales y métodos de la presente invención que incluyen la determinación de propiedades catalíticas de las enzimas obtenidas por el método. Debe entender que estos ejemplos son únicamente para propósitos ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de esta invención de ninguna manera.

**Ejemplo 1:** Clonación del gen para mananasa de *Trichoderma reesei*: Se aisló ADN cromosómico de la cepa RutC30 de *Trichoderma reesei* después de crecimiento sobre placas de agar YPD (20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura llevados hasta 1 L con agua, con agitación, 20 g de agar; se añadió un décimo de volumen de dextrosa al 20% después de tratamiento en autoclave). Se rasparon aproximadamente 10 mg de biomasa de la placa, se combinaron con 0,2 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 500 µl de una mezcla en proporción 24:24:1 de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico y se sometió a agitación tipo vórtice durante 2 - 5 min, seguido por centrifugación a 10000 - 15000 x g. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se precipitó con etanol. Se resuspendió el precipitado en 20 µl de agua. Se utilizó el ADN resultante (2 microlitros) como molde en una reacción PCR utilizando Taq ADN polimerasa y que contenía cebadores hacia adelante (SEQ ID NO: 3) e inversos (SEQ ID NO: 4) que emplean los siguientes parámetros para los ciclos: 94° C, 2 min seguido por 25 ciclos de 94° C 1 min, 50° C 1 min y 72° C 2 min seguido por 5 min a 72° C. El producto resultante se purificó usando el kit MinElute de Qiagen, se cortó con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI, se ligó en el vector pUC19. Se removieron los intrones por medio de PCR de extensión de solapamiento y se amplificó el gen libre del intrón con cebadores que añaden un sitio XbaI en el comienzo del marco de lectura abierto (SEQ ID NO: 8; SEQ ID N o: 9). La adición del sitio XbaI cambió el tercer aminoácido de la proteína madura de serina por arginina, que no tuvo ningún efecto notable sobre las propiedades fenotípicas de la proteína. La secuencia de señal del factor de acoplamiento alfa *S. cerevisiae* se fusionó con los tres primeros codones del gen modificado para mananasa utilizando cebadores de cola por medio de amplificación por PCR y se ligó dentro del vector pYES2 utilizando HindIII y XbaI. El casete ccdB del vector pZErO-1 (Invitrogen) fue luego amplificado por PCR y clonado utilizando sitios XbaI y XhoI como un fragmento de relleno en el vector resultante. Este relleno fue reemplazado con el gen para mananasa o bibliotecas de variantes del gen para mananasa utilizando XbaI y XhoI para producir el constructo de expresión final. La secuencia de ADN del gen para mananasa libre del intrón fue confirmada utilizando un kit comercial (GenomeLab DTCS Quick Start Kit, Beckman Coulter) y el Sistema de Análisis de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter).

**Ejemplo 2:** Generación de una secuencia de señal del factor de acoplamiento alfa que aumenta la expresión de mananasa de *Trichoderma reesei*: Se amplificó la secuencia de ADN del péptido señal del factor de acoplamiento alfa (SEQ ID NO: 5) a partir del vector pPICZalphaA (Invitrogen) y mutó utilizando un kit comercialmente disponible (el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph® II, Stratagene, Inc.). Se clonó la biblioteca resultante de secuencias de señal mutadas dentro del vector pYES2 que alberga el gen para mananasa de *Trichoderma reesei* por medio de procedimientos estándar de clonación y se transformó en *E. coli* de la siguiente manera: Se volvió competente por electroporación XL1-blue de la siguiente manera. Se inoculó una colonia aislada de una placa fresca en 12 ml de medio SOB (100 g de Bacto-triptona, 25 g de extracto de levadura, 2,9 g de NaCl, 0,9 g KCl, se llevó a 5 L con agua) que carecía de antibióticos y se agitó a 150 rpm durante la noche a 37° C. Se transfirió luego un volumen de 2,5 ml del cultivo a cada uno de los cuatro matraces Erlenmeyer no estriados de 1 L que contenían 250 ml de SOB y se cultivó como anteriormente hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6, seguido por 15 min sobre hielo. Se llevaron a cabo las siguientes etapas a 4 grados centígrados. Se centrifugaron en forma separada los cultivos de bacterias durante 10 min a 2800 x g y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los precipitados bacterianos en 250 ml cada uno de glicerol al 10%, se centrifugó nuevamente como anteriormente y se descartaron los sobrenadantes. Se resuspendieron dos precipitados en 250 ml de glicerol al 10%. Los otros dos fueron tratados en forma idéntica. Se centrifugaron nuevamente ambas suspensiones como anteriormente y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados celulares se suspendieron en su líquido intersticial y se llevó el volumen hasta 4.5 - 5.5 ml con glicerol al 10%, se tomaron alícuotas de 50 µl en crioviales y se congelaron en forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenó a -80° C. Para las electroporaciones, se descongeló sobre hielo una alícuota de células competentes, se

mezcló con 1 µg de ADN y transformó en una cubeta de 2 mm de abertura a 2,5 kV. Inmediatamente después de la electroporación, se suplementaron los transformantes con 1 ml de medio líquido LB y se incubó durante 1 h a 37° C. Se diluyeron 10 µl del cultivo en LB y se analizó la eficiencia de la transformación sembrando en placa con agar LB sólido que contenía 20 µg/ml de neomicina. El cultivo transformado restante se usó para inocular 100 ml de medio LB líquido que contenía 20 µg/ml de neomicina ("medio líquido selectivo"). Después de cultivar durante la noche, se preparó ADN del plásmido por medio del Kit de aislamiento de ADN Qiaprep Spin (Qiagen) y se utilizó 1 µg de ADN para transformar la cepa BY4741 de huésped *Saccharomyces* por medio del método de acetato de litio (véase el ejemplo 5). Esta biblioteca de la variante del factor de acoplamiento alfa fue luego sembrada en placas de SC-galactosa [8,4 g de base nitrogenada de levadura (Becton-Dickinson); 1 g de mezcla completa de suplemento - uracilo (Bio101), fue llevado hasta 1 L con agua, se agitó y se calentó a 50° C hasta que se disolvió, se ajustó a pH 5,6 con NaOH 1 N; se añadió un volumen de 1/9 de galactosa al 40% después de esterilización en autoclave; para placas de SC-galactosa, se añadieron 20 g de agar antes de esterilización en autoclave para cada L de medio final] que contenía AZCL-galactomanano al 0,2 % (Megazyme, Inc.). Las colonias de levadura que secretan cantidades crecientes de la mananasa de *Trichoderma reesei* fueron visibles ya que tiene zonas más grandes de solubilización del sustrato de AZCL-galactomanano. Este tamizaje resultó en candidatos específicos mejorados en el nivel de secreción de mananasa. La mejor colonia candidata específica se sembró en zigzag para dar lugar a colonias individuales sobre medio sólido de SC-glucosa [8,4 g de base nitrogenada de levadura (Becton-Dickinson); 1 g de mezcla completa de suplemento - uracilo (Bio101), se llevó hasta 1 l con agua, se agitó y calentó a 50 grados centígrados hasta disolución, se ajustó a pH 5,6 con NaOH 1 N; se añadió una novena parte del volumen de glucosa al 20% después de esterilización en autoclave; para placas de SC-glucosa, se añadieron 20 g de agar antes de tratamiento en autoclave para cada litro de medio final]. Se preparó ADN del plásmido con el kit de Zymoprep (Zymo Research), se transformó en *E. coli* y se aisló por medio del kit de aislamiento de ADN Qiaprep Spin (Qiagen). Se generaron reacciones de secuenciación de ADN utilizando un kit comercial (kit de inicio rápido DTCS GenomeLab, Beckman Coulter) y se determinó la secuencia de señal mejorada utilizando el sistema de análisis de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter). La secuencia de ADN de la secuencia candidata de señal mejorada se determinó mediante este método. La secuencia resultante de ADN del péptido señal del factor de acoplamiento alfa mejorado (SEQ ID NO: 6), a través de la aplicación del código genético estándar para genes nucleares (véase "El código genético" en New England Biolabs Catalog and Technical Reference, 2003-2003), determinó inequívocamente la secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína del péptido señal del factor de acoplamiento alfa mejorado codificado (SEC ID NO: 7). Se encontró que esta secuencia de señal mejorada difiere de la secuencia de señal del factor de acoplamiento alfa de tipo silvestre por las siguientes mutaciones: T25I, I66M, I70T, G79V. La remoción del gen para mananasa de este constructo dio lugar a un nuevo vector de clonación designado como pYES21.3\_19.

**Ejemplo 3:** Tamizaje y selección de variantes de mananasa con termoestabilidad mejorada: Con el fin de identificar las variantes de la enzima que tienen una termoestabilidad mejorada, se utilizó un criterio de tamizaje con base en una configuración de espectroscopía de fluorescencia confocal como se divulga en el documento WO 94/16313. Una suspensión de células de una biblioteca de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con plásmidos que codifican para las variantes de mananasa en el medio de cultivo se dispuso en una concentración de cfu que garantiza que las células individuales se dispensaron en cada pozo de la placa de microtitulación. Los cultivos se desarrollaron durante 48 h a 30° C y se secretó proteína en el sobrenadante. Se añadieron dos volúmenes de una suspensión de galactomanano (0,1% de galactomanano - algarrobo, Megazyme, en acetato de sodio 50 mM, pH 5,0) a un volumen de cultivo y se incubó a temperaturas elevadas > 60° C durante 16 h. Se evaluó el contenido de manosa mediante la adición de un volumen de ensayo que contenía todos los componentes para la detección enzimática (kit de Megazyme), incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y sometiendo las muestras a medición mediante espectroscopía de fluorescencia confocal.

Las variantes con mejor estabilidad a la temperatura produjeron una mayor señal fluorescente y se seleccionaron para la generación de bibliotecas adicionales. Este proceso cíclico se repitió hasta que se alcanzó la estabilidad a la temperatura deseada. En cada ronda sucesiva se incrementó la temperatura de incubación con el fin de aumentar la ventaja selectiva de variantes mejoradas.

**Ejemplo 4:** Adquisición de genes específicos para mananasa y determinación de la secuencia de ADN y de la proteína después del tamizaje de la biblioteca: El tamizaje de una biblioteca que contenía una población diversa de enzimas mananasa candidatas, cada una individualmente albergada en el plásmido de expresión, pYES21.3\_19, dio como resultado candidatos específicos mejorados en las características examinadas (por ejemplo, termoestabilidad, nivel de expresión, etc.). Dado que los miembros individuales de la biblioteca se analizaron como cultivos individuales, el resultado del proceso de tamizaje fue la identificación de cultivos específicos que expresan genes para mananasa putativamente mejorados. El mejor cultivo candidato se sembró en placa para dar lugar a colonias individuales sobre placas de glucosa SC sólida. Se inoculó una colonia aislada resultante en medio de SC-glucosa líquida, y se preparó el ADN del plásmido por medio del kit Zymoprep (Zymo Research). El ADN resultante del plásmido se transformó en la cepa XL1-blue de *E. coli* utilizando métodos estándar, se amplificó mediante el crecimiento celular en medio líquido y sólido de Luria-Bertani suplementados con 50 µg / ml de ampicilina y se aisló mediante un kit de Qiagen. Se generaron las reacciones de secuenciación de ADN utilizando el ADN resultante del plásmido con un kit comercial (GenomeLab DTCS Quick Start Kit, Beckman Coulter) y se determinó la secuencia del gen para mananasa mejorado utilizando el sistema de análisis de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter). Se

determinó en forma no ambigua la secuencia de ADN de un gen candidato mejorado para mananasa por medio de este método, y se determinó en forma no ambigua la secuencia de ADN resultante del gen para mananasa, a través de la aplicación del código genético estándar para genes nucleares (véase Sambrook, J. F.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición, 1989, Nueva York), la secuencia de aminoácidos de la proteína mananasa codificada.

**Ejemplo 5:** Transformación de *S. cerevisiae* por medio de acetato de litio: las existencias congeladas (crioexistencias) se generaron primero de la siguiente manera: Se generó un cultivo previo de 15 ml de BY4741 en YPD en un matraz Erlenmeyer de 50 ml incubado a 30° C y 150 rpm durante la noche. Se utilizaron 10 ml de este cultivo para inocular 100 ml de YPD precalentado en un matraz Erlenmeyer de 500 ml incubado a 30° C y 150 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 6 - 8. Se mezcló este cultivo con un volumen igual de glicerol al 30% y se almacenó en alícuotas de 1,6 ml a -80° C

Generación de células competentes: Se inocularon 50 ml de YPD con una densidad óptica inicial a 600 nm de 0,5 usando crioexistencias (ver más arriba), o utilizando un cultivo previo de YPD fresco preparado durante la noche (ver más arriba). Se incubó el cultivo de 50 ml a 30° C a 150 rpm durante 2 - 4 h hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 1,0. Se centrifugó luego el cultivo a 1500 x g a 20 - 25° C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 ml de agua estéril y se centrifugó durante 5 min a 2500 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de agua y transfirió a un tubo de centrifuga de 2 ml y se centrifugó nuevamente entre 10.000 a 15.000 x g durante 10 s. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento y se llevó hasta 500 µl con acetato de litio 100 mM (aproximadamente 2 x 10<sup>9</sup> células / ml) y se incubó durante 15 min a 30° C

Transformación de células competentes: Se preparó ADN portador por ebullición de 2,63 mg de ADN de esperma de salmón por ml de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se almacenó a -20° C. Se mezcló el plásmido que iba a ser transformado (1 µg) se mezcló con 38 µl de ADN portador en un tubo de centrifuga de 2 ml y se enfrió sobre hielo. Se mezclaron 50 µl de células competentes sometidas a agitación tipo vórtice con el ADN y se añadieron 300 µl de PEG / LiAc (500 µl de acetato de litio 1 M; 500 µl de agua y 4 ml de PEG 3350 al 50%) y se mezclaron. Se incubó la mezcla a 30° C durante 30 min, luego a 42° C durante 20 min y se centrifugó a 10.000 - 15.000 x g durante 10 s. Se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de YPD y se incubó durante 2 horas a 30° C y 150 rpm, antes de sembrar en placa con SC-glucosa sólida.

**Ejemplo 6:** Nueva transformación y expresión de genes específicos para mananasa en *Saccharomyces cerevisiae*: Después de la confirmación de la secuencia correcta de ADN, se transformó el ADN aislado en la cepa huésped de *Saccharomyces*, BY4741, por medio del método de acetato de litio (véase el ejemplo 5). Los cultivos transformados se sembraron en placa con medio sólido SC-glucosa y se incubaron a 30° C. Se aislaron colonias individuales sobre este medio sólido. Se inoculó una colonia aislada resultante en un tubo de ensayo de 15 ml que contenía 2 ml de SC-glucosa que se agitó en un agitador rotatorio a 150 rpm y 30° C durante la noche. A partir de este cultivo, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de medio SC-glucosa líquido hasta una OD de 0,05 a 600 nm. Se agitó el matraz en un agitador rotatorio a 150 rpm y 30° C durante la noche hasta que la densidad óptica a 600 nm estuviera por encima de 2. Se sometió el cultivo a centrifugación y se descartó el sedimento celular. A continuación, se analizó la mananasa mejorada deseada o se utilizó directamente como un sobrenadante de cultivo y/o se purificó opcionalmente a partir del líquido sobrenadante y se analizó o utilizó como una preparación purificada. Se encontró que este proceso es escalable hasta grandes volúmenes. El tercer codón de la proteína madura se revirtió a partir de una arginina hasta el codón de serina original y se encontró que no tenía ningún efecto apreciable sobre las propiedades fenotípicas de la proteína.

**Ejemplo 7:** Expresión y purificación de mananasa: Se almacenan clones de *S. cerevisiae* que albergan el gen para β-mananasa como crio cultivos a -80° C, bien conocidos por cualquier persona capacitada en la técnica. Se inocularon un cultivo previo en 100 ml de medio A (16,8 g / l de base nitrogenada de levadura, 2 g / l de CSM-URA; 4% de galactosa; 1% de hidrolizado de caseína) suplementado con 2% de glucosa y 20 µg / ml de rifampicina a partir de una crioexistencia y se desarrolló durante 48 h a 30° C en un matraz de 1 l. Estos cultivos sirvieron para inocular un cultivo de expresión de 1 l hasta una densidad de 100 mDO en un medio de expresión (medio A + 10 µg / ml de rifampicina) en un matraz de 5 l. El cultivo se desarrolló durante 72 h a 30° C. Las células se removieron por centrifugación y se sometió el sobrenadante a concentración 40 veces por medio de ultrafiltración utilizando una membrana de corte de 5 kDa (módulo Vivaflow 200). El concentrado se sometió posteriormente a diafiltración con el mismo corte para efectuar un intercambio de amortiguador (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, pH 5,0) y se concentró hasta un volumen final de 1/40 del volumen de cultivo.

El concentrado se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se ajustó el pH a 8,0 justo antes de la carga sobre una columna metálica de afinidad (BD-Talon, BD-Bioscience; volumen de lecho de 25 ml equilibrada con amortiguador de diafiltración). La columna se lavó con varios volúmenes de lecho de amortiguador de diafiltración de pH 8,0 seguido por tres volúmenes de lecho 2% de amortiguador B (amortiguador B: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). Se eluyó la mananasa con un gradiente de 2% a 100% de amortiguador B durante cinco

volúmenes de columna. Se comprobó la actividad de las fracciones con el ensayo de AZCL y se reunieron en consecuencia.

**Ejemplo 8:** Comparación de la mananasa de *Trichoderma reesei* y la variante S3R: La estabilidad a la temperatura y la producción de manosa de mananasa de *Trichoderma reesei* como se muestra en la SEQ ID NO: 1 se comparó con la variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 mediante la introducción de la sustitución S3R (serina por alanina en la posición 3). En un primer experimento, el sustrato era de torta de presión de palmiste tamizado para obtener unos granos de < 45 µm que se suspendieron en amortiguador (acetato sódico 100 mM, pH 5,0, 0,1% de TritonX100) a una concentración de 4% (p / v). Se mezcló el sobrenadante de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan las enzimas mananasa en proporción 1 a 1 con la suspensión de sustrato y se incubó a diferentes temperaturas durante 24 h. Se determinaron las concentraciones de manosa con un kit comercial (Megazyme) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Como se observa en la figura 1A, la producción de manosa de las dos manansas era idéntica dentro del error del experimento. Del mismo modo, en un segundo experimento se comparó la estabilidad térmica de las enzimas mananasa en una configuración descrita en el ejemplo 9, utilizando galactomanano de algarroba como sustrato. Los resultados mostrados en la figura 1B apoyan el hallazgo de que la mananasa de tipo silvestre de *Trichoderma reesei* de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y la variante S3R tienen la misma estabilidad térmica.

**Ejemplo 9:** Actividad mejorada a temperaturas de reacción más altas sobre el sustrato de galactomanano: Las manansas se puede utilizar para despolimerizar carbohidratos de polímanano presentes en una variedad de plantas o de material microbiano. Estos procesos se realizan preferiblemente a temperaturas elevadas proporcionando enzimas termoestables con una ventaja selectiva. Las variantes de mananasa de la presente invención son más termoestables que la mananasa de tipo silvestre de *Trichoderma reesei* (incluyendo la enzima de la variante S3R) como se demuestra en este ejemplo. Los clones de levadura que expresan diferentes variantes de mananasa se desarrollaron en un cultivo previo en medio A (16,8 g / l de base nitrogenada de levadura; 2 g / l de CSM-URA; 4% de galactosa; 1% de hidrolizado de caseína) suplementado con 2% de glucosa y 20 µg / ml de rifampicina. Estos cultivos sirvieron para inocular un cultivo de expresión de 250 µl en placas de 96 pozos profundos con una densidad de 100 mOD en medio de expresión (medio A + 10 µg / ml de rifampicina) y se desarrollaron durante 72 h a 30° C. Se removieron las células por centrifugación. Se generó una solución patrón de sustrato de galactomanano (galactomanano de algarroba, de baja viscosidad; Megazyme) mediante la suspensión de galactomanano a razón de 10 g / l en acetato de sodio 50 mM, amortiguador de pH 5,0, esterilizando en autoclave y filtrando la solución a través de un filtro de 0,8 µm. Se mezclaron 15 µl de sobrenadante de cultivo de levadura con 81 µl de 1% de galactomanano (dilución 1/10 de la solución patrón en acetato de sodio 100 mM, pH 5,0) y se incubó a diferentes temperaturas durante 16 h.

El contenido de manosa de la muestra se determinó usando un kit de ensayo comercial de Megazyme de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en varias reacciones enzimáticas acopladas que en última instancia conducen a la formación de resorufina fluorescente. Se mezclaron dos volúmenes de muestra (diluida 1/15 en acetato de sodio 50 mM, pH 5,0) con un volumen de ensayo que contenía todos los componentes de la reacción. Se determinó la intensidad de la fluorescencia después de 60 min de incubación a 37° C y el contenido de manosa de las muestras se calculó a partir de una curva de calibración de manosa.

**Ejemplo 10:** Producción de manosa mejorada a temperaturas elevadas sobre el sustrato de torta de presión de palmiste: Una de las aplicaciones preferidas implica la despolimerización de galactomanano en palmiste para uso como suplemento en piensos. El sustrato de torta de presión de palmiste (PKE) se compone de palmiste molido con una distribución de tamaño de partícula entre aproximadamente 10 µm y 1 mm. Opcionalmente, el sustrato puede ser tamizado para obtener un tamaño de partícula más uniforme de, por ejemplo, 45 µm.

Se colocan 400 mg de sustrato seco en un tubo de plástico de 1,5 ml y se añaden 600 µl de una solución de mananasa (100 µg / ml). La suspensión se mezcla vigorosamente en un agitador tipo vórtice y se coloca en un bloque térmico precalentado a la temperatura deseada, por ejemplo 63° C, 67° C ó 70° C. Se toman muestras en los instantes indicados, se centrifuga (30 min, 20.000 g, 4° C) y se toman aprox. 130 µl de la fase fluida y se almacenan a -20° C para su posterior análisis.

El contenido de manosa de la muestra se determina usando un kit de ensayo comercial de Megazyme de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en varias reacciones enzimáticas acopladas que en última instancia conducen a la formación de resorufina fluorescente. Se mezclan dos volúmenes de muestra con un volumen de ensayo que contiene todos los componentes de la reacción. La intensidad de la fluorescencia se determina después de 60 min de incubación a 37° C y se calcula el contenido de manosa de las muestras a partir de una curva de calibración de manosa.

Para la determinación por HPLC de componentes de manosa y de otros azúcares se determina el índice de refracción de la muestra y se calcula el contenido de azúcar a partir de una curva de calibración de glucosa. Las muestras se diluyen hasta un contenido total de azúcar del 3% con agua destilada, se centrifuga durante 30 min a

20.000 g a 4° C y se somete a análisis por HPLC usando dos columnas aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm) en serie calentadas a 85° C con un cartucho relleno con Carbo-C como precolumna (Biorad) y agua como disolvente. Se fijó la velocidad de flujo en 0,6 ml / min y detección a través de cambio del índice de refracción en un RID-10A (Shimadzu). Se identifican azúcares específicos usando muestras auténticas como estándares.

5 **Ejemplo 11:** Actividad residual de mananasa después de incubación de PKE: La actividad residual de mananasa se analizó con enzimas mananasa (tal como las aisladas en el ejemplo 7) después de la incubación de PKE con diferentes variantes de mananasa a diferentes temperaturas y e instantes de tiempo. Como sustrato para determinación de la actividad se utilizó AZCL-galactomannan-algarrobo (Megazyme). Se suspendieron 100 mg de  
10 AZCL-galactomanano en 30 ml de amortiguador A (NaAc 50 mM, pH 5,0; 10% de glicerina; 0,1% de TritonX100), se homogeneizó en un homogeneizador Dounce y se diluyó en proporción 1: 3 en amortiguador A.

En una placa de microtitulación de 96 pozos profundos se mezclaron de 650 µl de suspensión del sustrato con 50 µl de muestra o de estándar de la enzima. Después de incubación durante 30 min a 55° C, se centrifugaron las placas a 4000 rpm durante 1 min y se transfirió el sobrenadante a una placa transparente de 96 pozos. Se determinó la absorción a 590 nm en un lector estándar de placas (Ultra, Tecan). Comparando las muestras antes y después de la  
15 incubación con calor se calculó la actividad residual.

**Ejemplo 12:** Producción de manosa como función de la concentración de enzima: la termoestabilidad mejorada permite ejecutar un proceso particular con una menor concentración de enzima comparado con un enzima menos termoestable como se demuestra en este ejemplo. Se usó la mananasa de tipo silvestre en una concentración de 100 µg/ml mientras que la variante de la mananasa termoestable se utilizó en concentraciones de 100, 80, 60, 40 y  
20 µg/ml, respectivamente, sobre PKE como sustrato. Las temperaturas fueron de 63° C y de 67° C. La concentración de manosa se determinó como se describe usando el kit comercial de Megazyme.

**Ejemplo 13:** Termoestabilidad de las variantes de mananasa en amortiguador: La termoestabilidad de variantes de mananasa de la invención se analizó adicionalmente mediante la incubación de las muestras a diversas temperaturas antes de la determinación de la actividad residual. Se mezclaron cuatro volúmenes de sobrenadante de cultivos de levadura que expresan las variantes de mananasa con un volumen de amortiguador (acetato de sodio 500 mM, pH 5,0) y se incubó a temperaturas que varían de 58° C a 82° C. La actividad se determinó usando AZCL galactomanano como sustrato como se describe en el ejemplo 11. La comparación de la actividad frente a una muestra mantenida a 25° C permitió el cálculo de la actividad residual después de incubación térmica.  
25

**Ejemplo 14:** Pepsina y estabilidad con el pH: En una realización preferida de la invención, se utilizan mananasas variantes como un suplemento para piensos. La actividad de la mananasa sobre sustratos que contienen polimanano incluidos en la composición estándar del pienso sería la liberación benéfica de oligomananos y manosa con efectos positivos para la salud de los animales. Para esta aplicación, las variantes de mananasa tendrían que soportar las duras condiciones en el estómago, por ejemplo, el bajo pH y las proteasas, respectivamente. La resistencia a las condiciones de pH bajo se ha analizado para diferentes variantes. Cuatro volúmenes de una solución de mananasa (50 µg / ml en acetato de sodio 50 mM, pH 5,0) se mezclaron con 1 volumen de amortiguador de glicina 1 M/ HCl de pH 2,0 (pH final 2,3) y se incubaron a 37° C. En diferentes momentos se tomaron alícuotas y se ajustó el pH a 6,1 mediante la adición de 5 volúmenes de amortiguador A (NaCl 10 mM, fosfato de sodio 200 mM, pH 6,5).  
30  
35

Se midió la actividad residual mediante la mezcla de un volumen de la muestra con 13 volúmenes de suspensión al 0,1% de AZCL galactomanano en NaAc 50 mM, pH 5,0 e incubación a 50° C durante 20 min. Después de la centrifugación, se midió el AZCL-galactomanano solubilizado como absorbancia a 590 nm. Se cuantificó la actividad enzimática mediante la comparación con un estándar con concentraciones conocidas de enzima y se calculó la actividad residual por medio de la normalización de las muestras mantenidas a pH 5,0.  
40

La resistencia a la pepsina se midió como anteriormente pero incluyendo pepsina en el amortiguador de glicina 1 M / HCl a una concentración de 5 mg / ml, obteniéndose una concentración final de 1 mg / ml.  
45

**Ejemplo 15:** Actividad mejorada a bajo pH: Como se describe en forma detallada más arriba, la actividad a pH bajo confiere una ventaja a las enzimas mananasa en la aplicación como aditivo para piensos ya que los sustratos de poliosa ya están metabolizados bajo condiciones ácidas como las presentes por ejemplo en el estómago de cerdos y en el buche y el estómago de las aves de corral. El perfil de actividad de diferentes variantes ha sido analizado en condiciones de pH relevantes, es decir, valores de pH por debajo de 6. Se ajustaron preparaciones de proteína de las variantes B y C a diferentes valores de pH por medio de dilución en sistemas amortiguadores apropiados (pH 2 - 3,5: amortiguador de glicina 500 mM, pH 4 - 5,5: amortiguador de acetato de sodio 250 mM; lo protocolos detallados para la preparación de estos tampones son conocidos para la persona capacitada en la técnica) y se incubaron durante 4 horas a 37° C con 40% de sustancia seca de sustrato de torta de presión de palmiste que contiene sustrato de polimanosa (véase más arriba). Después de la finalización de la reacción, se determinó la concentración de manosa utilizando un kit comercial cuantificación de manosa de Megazyme de acuerdo con las instrucciones del  
50  
55

5 fabricante. El ensayo se basa en diferentes reacciones enzimáticas acopladas que conducen en última instancia a la formación de resorufina fluorescente. Se mezclan dos volúmenes de muestra con un volumen de ensayo que contiene todos los componentes de la reacción. La intensidad de la fluorescencia se determina después de 60 min de incubación a 37° C, y el contenido de manosa de las muestras se calcula a partir de una curva de calibración de manosa. Los datos se corrigieron para pequeñas alteraciones de los valores de pH en la preparación de las soluciones de proteína y la actividad de fondo se midió mediante la realización del ensayo descrito más arriba con muestras de proteína inactivadas a 90° C durante 15 min para tener en cuenta los efectos adicionales de sustancias amortiguadoras en la reacción. Los valores de fondo se restan de los resultados experimentales en los datos suministrados en la Figura 8. Las variantes B y C muestran una gran actividad en condiciones de pH bajo que confieren propiedades superiores a las variantes para la aplicación en el pienso para la producción de manosa a partir de materias primas que contienen polimánosa en el tracto gastrointestinal superior de los animales.

15 **Ejemplo 16:** Estabilidad a la pepsina / pH: Se mezclaron 4 volúmenes de una solución de mananasa con 1 volumen de amortiguador de glicina 1 M / HCl de pH 2,5 con 1,25 mg / ml de pepsina y se incubó a 37° C durante 1 h. El valor del pH de la mezcla de incubación es de 2,65. Se añadieron a continuación 21 volúmenes de solución de galactomanano al 0,86% en amortiguador de acetato de sodio 190 mM pH 5,5 y se incubó la reacción a 37° C durante 16 h. Se mezclaron 2 volúmenes de la mezcla de la reacción con 1 volumen del ensayo de detección de manosa (como se describió) a 37° C durante 30 min. Se determinaron las unidades de fluorescencia se determinaron con excitación a 535 nm y emisión a 595 nm utilizando un lector de fluorescencia. La actividad residual relativa en % se determina en comparación con la actividad después de incubación a pH 5,0. (Véase la Tabla 5).

20 Tabla 5: Estabilidad proteolítica / pH bajo, los valores de actividad residual se determinaron a pH 2,65 en presencia / ausencia de 0,25 mg/ml de pepsina:

variante	mutaciones	Actividad residual	
		pH 2,65 - 0,25 mg/ml de Pepsina	pH 2,65 + 0,25 mg/ml de Pepsina
TS	-	25	10
variante B	L207F, F274L	70	23
variante C	T201S, Q280R, F274L	90	84
variante 31	T201S, L207F, F274L	100	87,6
variante 42	N173H, V181T, T201S, L207W, F274L	100	81

25 Para la estabilidad proteolítica / pH bajo, especialmente la posición T201 parece ser muy importante. Otras posiciones importantes son Q280 y L207. Esto significa que todas las variantes que portan una sustitución en cualquiera de estos residuos representan realizaciones particularmente preferidas de la presente invención.

En este contexto, cabe destacar que las variantes mostradas en la Tabla 5, además de contar con una estabilidad proteolítica / pH bajo mejorado, todos tienen igualmente estabilidad mejorada con la temperatura, como se menciona en la Tabla 3A. Esto significa que dichas variantes son realizaciones particularmente preferidas de la presente invención.

30 Algunas de dichas variantes, es decir la variante B (secuencia de aminoácidos representada como la SEQ ID NO: 10) y la variante C (secuencia de aminoácidos representada como la SEQ ID NO: 11), la variante 31 y la variante 42 son realizaciones aún más preferidas debido a las propiedades altamente mejoradas, ambas en términos de estabilidad a la temperatura, así como en términos de estabilidad proteolítica / pH bajo.

**Ejemplo 17:** liberación de manosa / manooligosacáridos de café molido

35 Se suspendió 40% (p/v) de café molido en agua o se lavó 10 veces con agua antes de la suspensión en agua. Se incubaron las suspensiones con 200 µg/ml de la variante B de mananasa durante 16 h a 50° C, 600 rpm. Después del tratamiento, se centrifugaron las muestras y se determinó el contenido de manosa de los sobrenadantes en comparación con las muestras no tratadas con el ensayo de manosa como se describió anteriormente (véase la Tabla 6).

Tabla 6: rendimientos de manosa de residuos de café lavados y no lavados en comparación con residuo de café no tratados

Muestras	Manosa (mg/ml)
Muestra de residuo de café tratada con la variante B	38,1
Muestra de residuo de café no lavada tratada con la variante B	24,6

**Ejemplo 18:** Extracción de aceite de PKE

- 5 Se suspendió 33% (p/v) de PKE seco en amortiguador de NaAc 250 mM pH 5,0. A esta suspensión se le añadieron ya sea 100 µg/ml de la variante B o C o no se le añadió enzima. Se incubó durante 16 horas a 50° C. Luego se secó el PKE tratado y se determinó el peso. Se extrajo el aceite de palmiste en un aparato Soxhlet con n-hexano durante 24 h. Se removió el disolvente y se determinó el contenido de aceite por peso (véase la Tabla 7).

Tabla 7: rendimiento de aceite de PKE tratado y no tratado

muestra	% de aceite (por g de masa seca)
No tratada	4,05
Variante B tratada	4,36
Variante C tratada	4,19

10

**Ejemplo 19:** Crecimiento de levadura en caldo con sobrenadante de PKE tratado con mananasa

- 15 Se incubó una suspensión de PKE al 33% (p/v) en amortiguador de NaAc 250 mM pH 5,0 + / - 200 µg/ml de la variante B durante 16 h a 50° C. Después de la centrifugación se añadió 1 volumen de los sobrenadantes a el medio a base de levadura (4 vol. Yb (4x), 4 vol. CSM-U (4x), 1 vol. de hidrolizado de caseína). Se inocularon los medios con *S. cerevisiae* y se incubó durante 72 horas a 30° C, 160 rpm. Se determinó la OD a 600 nm (véase la Tabla 8).

Tabla 8: crecimiento de levadura sobre sustrato de PKE tratado y no tratado

muestra	OD 600 nm
Sin tratamiento enzimático	4,45
Con tratamiento con mananasa	5,6

- 20 Se repitió el mismo experimento con PKE lavado (10x vol. de agua, PKE lavado) y con PKE incubado durante 16 horas en NaAc 250 mM pH 5 y lavado posterior con agua (PKE pretratado) antes del tratamiento enzimático (véase la Tabla 9).

Tabla 9: Crecimiento de levadura sobre un sustrato de PKE tratado y no tratado

muestra	OD 600 nm
PKE lavado sin mananasa	3,4
PKE lavado con mananasa	4,5

(continuación)

PKE pretratado sin mananasa	3,6
PKE pretratado con mananasa	5,0

5 Los resultados muestran que el tratamiento con mananasa de PKE libera azúcares que pueden ser utilizados para la producción fermentativa de etanol por *S. cerevisiae*.

**Ejemplo 20:** Liberación de manosa a partir de goma guar, goma de algarrobo y glucomanano konjac

Se incubaron suspensiones al 1% (p/v) de goma de guar, goma de algarrobo y glucomanano konjac en agua con 200 µg/ml de la variante B a 50° C y 400 rpm durante 16 h. Después de la centrifugación, se detectó el contenido de manosa en el sobrenadante como se describió anteriormente (véase la figura 9).

10 Listado de secuencias, texto libre

SEQ ID NO 1: mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre / aminoácido

SEQ ID NO 2: mananasa de *Trichoderma reesei* tipo silvestre / ADN

SEQ ID NO 3: pesca hacia delante de cebador Mann5A

SEQ ID NO 4: pesca inversa de cebador Mann5A

15 SEQ ID NO 5: ADN líder tipo silvestre

SEQ ID NO 6: ADN líder mejorado

SEQ ID NO 7: prot seq2 líder mejorado

SEQ ID NO 8: cebador hacia adelante para la clonación de PIN libre de intrón con el líder en pYES2

SEQ ID NO 9: cebador inverso para la clonación de PIN libre de intrón con el líder en pYES2

20 SEQ ID NO 10: variante B de mananasa

SEQ ID NO 11: variante C de mananasa

SEQ ID NO 12: variante 31 de mananasa

Listado de secuencias

<110> Direvo Biotech AG

25 <120> Mananasas

<130> DD40052

<150> EP06117441

<151> 18 de Julio de 2006

<160> 13

30 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 1

Ala Ser Ser Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu  
 20 25 30  
 Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln  
 50 55 60  
 Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val  
 85 90 95  
 Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn  
 100 105 110  
 Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly  
 115 120 125  
 Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr  
 130 135 140  
 Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser  
 165 170 175  
 Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys  
 180 185 190

5

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Thr Leu Gly Asp Glu Gly Leu Gly  
 195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr  
 210 215 220

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

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly  
 245 250 255

Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys  
 260 265 270

Val Phe Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala  
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met  
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser  
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val  
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro  
 340 345 350

<210> 2

<211> 1029

<212> ADN

5 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 2

ES 2 410 788 T3

gcttcgagct ttgtaacat atccggcacc caattcaaca tcgatggcaa agtaggctac 60  
 tttgcgggca ccaactgcta ctggtgctcg ttcctgacca accacgccga cgttgattcc 120  
 acctttagcc acatctcttc ctctggcctc aaggtagtcc gtgtatgggg cttcaacgac 180  
 gtcaacacgc agccctctcc cggccagatc tggttccaga agctgtccgc tacggggctt 240  
 acgatcaaca cgggagctga tgggctgcag actctcgact acgtagtcca gtcagccgag 300  
 cagcacaacc tcaagctcat catcccgttc gtcaacaact ggagcgacta cggcgggata 360  
 aacgcctatg tcaacgcctt tggcggcaat gcgaccacct ggtacactaa cacggccgcg 420  
 caaactcagt accgcaagta cgtccaggcc gtcgtcagcc gctacgcaa ctcgacggcc 480  
 atctttgcgt gggagctggg caacgagcct cgctgcaacg ggtgcagtac tgatgtgatt 540  
 gttcagtggg cgacgagtgt gtcccaatat gtcaagtcac ttgattcgaa ccatctcgtg 600  
 acgcttgag acgaggggct cggctctcagt actggagacg gcgcttatcc gtatacttat 660

ggcgagggca ctgattttgc caagaatgta caaatcaagt cgcttgactt tggactttc 720  
 cacctctatc cggactcttg gggaacaaac tacacttggg gcaatggctg gattcagact 780  
 catgccgccg cttgtttagc agcaggcaa ccttgcgtgt ttgaagaata cggcgcacag 840  
 caaaaccct gcaccaacga ggcaccctgg caaacaacct ctctcacgac tcgcggcagt 900  
 ggtggcgaca tgttttggca gtggggagac acttttgcca acggtgcca gtcgaacagt 960  
 gacccgtaca ccgtctggta caactcatcg aactggcaat gcttgggtcaa gaaccacgtt 1020  
 gatgctatt 1029

<210> 3

5 <211> 27

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> pesca hacia adelante del cebador mannA

10 <400> 3

ccggaattca tgctctcaaa gagtctc 27

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

15 <213> artificial

ES 2 410 788 T3

<220>

<223> pesca inversa del cebador mannA

<400> 4

ccaagcttt catgtattca ggcattg 27

5 <210> 5

<211> 267

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 5

	atgagatttc cttcaatddd tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct	60
	ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg	120
	tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgtdtttgc cattttccaa cagcacaat	180
	aacgggttat tgtdtataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta	240
10	tcttdggaga aaagagaggc tgaagct	267

<210> 6

<211> 267

<212> ADN

<213> artificial

15 <220>

<223> ADN líder mejorado

<400> 6

	atgagatttc cttcaatddd tactgctggt ttattcgcag catcctctgc attagctgct	60
	ccagtcaaca ctataacaga agatgaaacg gcacaaattc ctgctgaagc tgtcatcggg	120
	tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgtdtttgc cattttccaa cagcacaat	180
	aacgggttat tgtdtatgaa tactactact gccagcattg ctgctaaaga agaagtggta	240
	tcttdggaga aaagagaggc tgaagct	267

<210> 7

20 <211> 89

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> proteína líder mejorada

<400> 7

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Ile Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
 20 25 30  
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
 35 40 45  
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60  
 Phe Met Asn Thr Thr Thr Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Val Val  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala  
 85

5 <210> 8

<211> 54

<212> ADN

<213> artificial

<220>

10 <223> cebador hacia delante para clonación de PIN libre de intrón con líder en pYES2

<400> 8

gaaggttctt tgataaaag agaagcttgc ggtactgcag cctgtccac gtgc 54

<210> 9

<211> 39

15 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador inverso para clonación de PIN libre de intrón con líder en pYES2

<400> 9

ccctctagtc tcgagtcctg tattcaggca ttgcgagta 39

<210> 10

<211> 358

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> variante B de mananasa

<400> 10

Ala Ser Arg Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly  
1 5 10 15

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu  
20 25 30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser  
35 40 45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln  
50 55 60

Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser  
65 70 75 80

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val  
85 90 95

Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn  
100 105 110

Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly  
115 120 125

Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr  
130 135 140

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser  
165 170 175

Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys  
180 185 190

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Thr Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly  
195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr  
210 215 220

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

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly  
245 250 255

Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys  
 260 265 270

Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala  
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met  
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser  
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val  
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro  
 340 345 350

His His His His His His  
 355

<210> 11

<211> 358

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> variante C de mananasa

<400> 11

ES 2 410 788 T3

Ala Ser Arg Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly  
 1 5 10 15

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu  
 20 25 30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser  
 35 40 45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln  
 50 55 60

Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser  
 65 70 75 80

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val  
 85 90 95

Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn  
 100 105 110

Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly

ES 2 410 788 T3

	115					120						125			
Gly	Asn 130	Ala	Thr	Thr	Trp	Tyr 135	Thr	Asn	Thr	Ala	Ala 140	Gln	Thr	Gln	Tyr
Arg	Lys	Tyr	Val	Gln	Ala 150	Val	Val	Ser	Arg	Tyr 155	Ala	Asn	Ser	Thr	Ala 160
Ile	Phe	Ala	Trp	Glu 165	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro 170	Arg	Cys	Asn	Gly	Cys 175	Ser
Thr	Asp	Val	Ile 180	Val	Gln	Trp	Ala	Thr 185	Ser	Val	Ser	Gln	Tyr 190	Val	Lys
Ser	Leu	Asp 195	Ser	Asn	His	Leu	Val 200	Ser	Leu	Gly	Asp	Glu 205	Gly	Leu	Gly
Leu	Ser 210	Thr	Gly	Asp	Gly	Ala 215	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Tyr 220	Gly	Glu	Gly	Thr
Asp 225	Phe	Ala	Lys	Asn	Val 230	Gln	Ile	Lys	Ser	Leu 235	Asp	Phe	Gly	Thr	Phe 240
His	Leu	Tyr	Pro	Asp 245	Ser	Trp	Gly	Thr	Asn 250	Tyr	Thr	Trp	Gly	Asn 255	Gly
Trp	Ile	Gln	Thr 260	His	Ala	Ala	Ala	Cys 265	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys 270	Pro	Cys
Val	Leu	Glu 275	Glu	Tyr	Gly	Ala	Arg 280	Gln	Asn	Pro	Cys	Thr 285	Asn	Glu	Ala
Pro	Trp 290	Gln	Thr	Thr	Ser	Leu 295	Thr	Thr	Arg	Gly	Met 300	Gly	Gly	Asp	Met
Phe 305	Trp	Gln	Trp	Gly	Asp 310	Thr	Phe	Ala	Asn	Gly 315	Ala	Gln	Ser	Asn	Ser 320
Asp	Pro	Tyr	Thr	Val 325	Trp	Tyr	Asn	Ser	Ser 330	Asn	Trp	Gln	Cys	Leu 335	Val
Lys	Asn	His	Val 340	Asp	Ala	Ile	Asn	Gly 345	Gly	Thr	Thr	Thr	Pro 350	Pro	Pro
His	His	His 355	His	His	His										

<210> 12

<211> 358

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> variante 31 de mananasa

<400> 12

Ala Ser Ser Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly  
 1 5 10 15

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu  
 20 25 30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser  
 35 40 45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln  
 50 55 60

Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser  
 65 70 75 80

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val  
 85 90 95

Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn  
 100 105 110

Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly  
 115 120 125

Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr  
 130 135 140

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala  
 145 150 155 160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser  
 165 170 175

Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys  
 180 185 190

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Ser Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly  
 195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr  
 210 215 220

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

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly  
 245 250 255

Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys  
 260 265 270

Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala  
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met  
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser  
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val  
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro  
 340 345 350

His His His His His His  
 355

<210> 13

<211> 358

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> variante 16 de mananasa

<400> 13

Ala Ser Ser Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu  
 20 25 30  
 Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln  
 50 55 60  
 Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val  
 85 90 95  
 Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn  
 100 105 110  
 Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly  
 115 120 125

Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr  
 130 135 140

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala  
 145 150 155 160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser  
 165 170 175

Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys  
 180 185 190

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Ser Leu Gly Asp Glu Gly Leu Gly  
 195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr  
 210 215 220

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

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly  
 245 250 255

Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys  
 260 265 270

Val Phe Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala  
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met  
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser  
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val  
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro  
 340 345 350

His His His His His His  
 355

**REIVINDICACIONES**

1. Una  $\beta$ -mananasa modificada que se deriva de la mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre mostrada en la SEQ ID NO: 1 por medio de la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la posición 274 con relación a la numeración de dicha mananasa de tipo silvestre por leucina (L) o metionina (M) u homólogos de los mismos, que  
 5 comprende dicha al menos una sustitución de aminoácidos de leucina (L) o metionina (M) en la posición 274 con relación a la numeración de dicha mananasa de tipo silvestre, en donde dicha mananasa modificada, o dichos homólogos, tienen una mayor termoestabilidad con relación a la mananasa de tipo silvestre y en donde los homólogos tienen una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1.
2. La mananasa modificada de la reivindicación 1, en donde el residuo en la posición 274 se sustituye por leucina (L) y que comprende además una sustitución en una o más de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de  
 10 - L207F,  
 - T201 S, Q280R,  
 - A215T; N282D,  
 - Y220F,  
 15 - V187M,  
 - V181A,  
 - V148I,  
 - N173H; N331S,  
 - N13D,  
 20 - Q317H,  
 - F4Y; I70V,  
 - Q101R; Q281H,  
 - T201 G; L207F,  
 - T201 S; L207F,  
 25 - V181T; L207W; A215T,  
 - K74M; A313T; V325I,  
 - N173H; V181H; L207W,  
 - T201S; L207Y; Q280R,  
 - T201S; L207W; Q280R,  
 30 - T201S; L207R; Q280R,  
 - N173H; L207W,  
 - 215T; Q280R,  
 - V181H; L207W,  
 - A215T; N282D,

- N173H; V181T; T201S; L207W,

- N173H; V181H; L207W; A215T,

- V181H; L207W,

- A215T; Q280R; N282D,

5 - N173H; V181T; L207W; A215T; Q280R; N282D.

3. La mananasa modificada de la reivindicación 1, en donde

(i) la sustitución se localiza en la segunda mitad de la molécula y los cambios se presentan en una posición de 200 o superior, de acuerdo con la numeración de la mananasa de tipo silvestre dada en la SEQ ID NO: 1; y/o

(ii) el número de sustituciones es de 2 a 30, de 2 a 10, y/o de 2 a 5.

10 4. Una molécula de ácido nucleico, que codifica la mananasa modificada de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4.

6. Una célula huésped que es transformada con el vector de la reivindicación 5 y/o que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.

15 7. Un método para preparar la mananasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 6, y el aislamiento de la mananasa modificada del cultivo.

8. Una composición que comprende la mananasa modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

20 9. La composición de la reivindicación 8, que es adecuada para el procesamiento de alimentos y de piensos, como suplemento para alimentos y piensos, para blanqueamiento asistido por enzimas de pulpas de papel, para estimulación de pozos de petróleo y de gas fracturamiento hidráulico, para la remoción de biopelículas, o en sistemas de suministro.

10. El uso de una mananasa modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3

- para el procesamiento de alimentos y piensos,

25 • para extracción de café,

- para el procesamiento de residuos de café,

- como un suplemento para alimentos piensos,

- para blanqueamiento asistido por enzimas de pulpas de papel,

- como agente de blanqueamiento y/o de desengolado en la industria textil,

30 • para estimulación de pozos de petróleo y de gas por fracturamiento hidráulico,

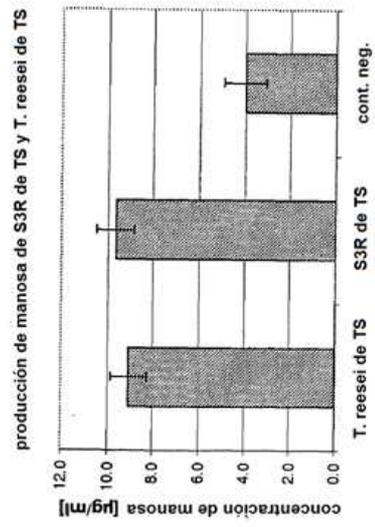
- como detergente,

- para la remoción de biopelículas,

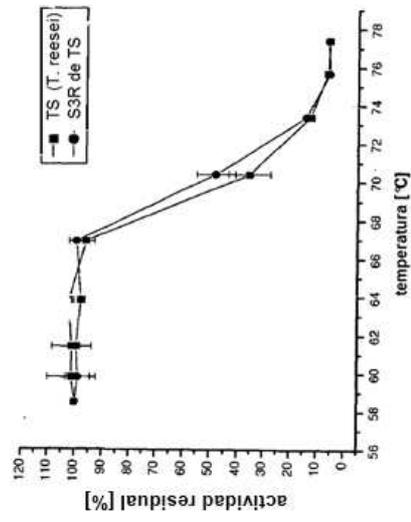
- en sistemas de suministro, y/o

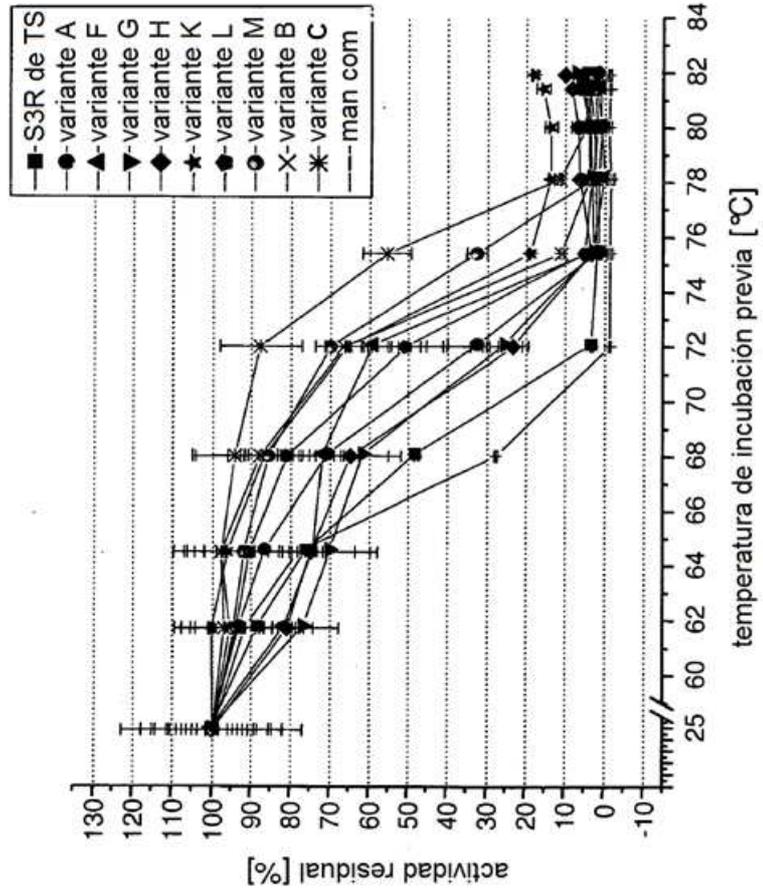
- para el procesamiento de recursos renovables destinados a la producción de combustibles biológicos.

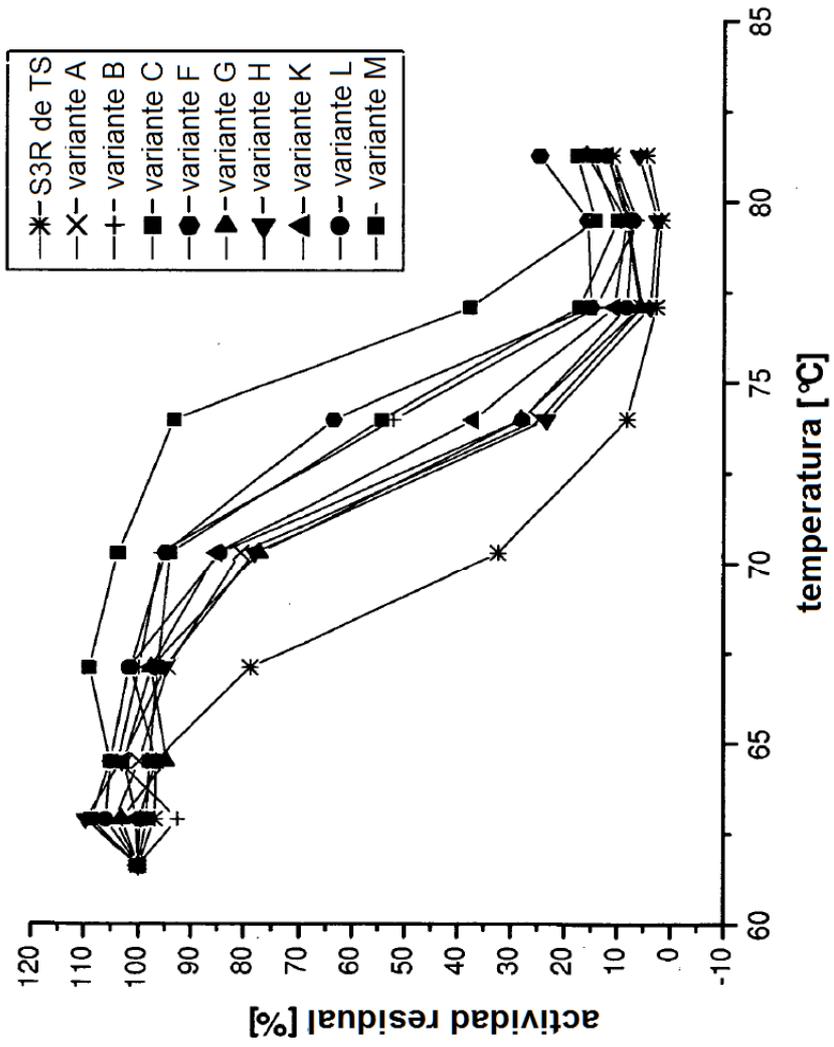
A

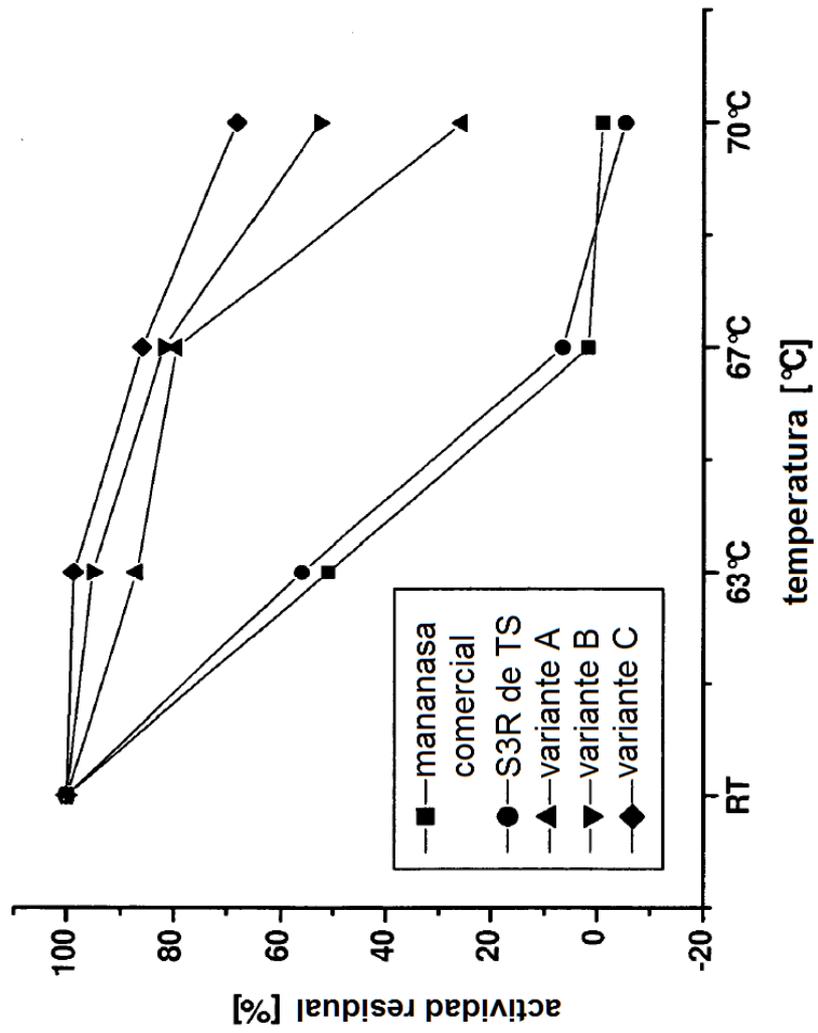


B



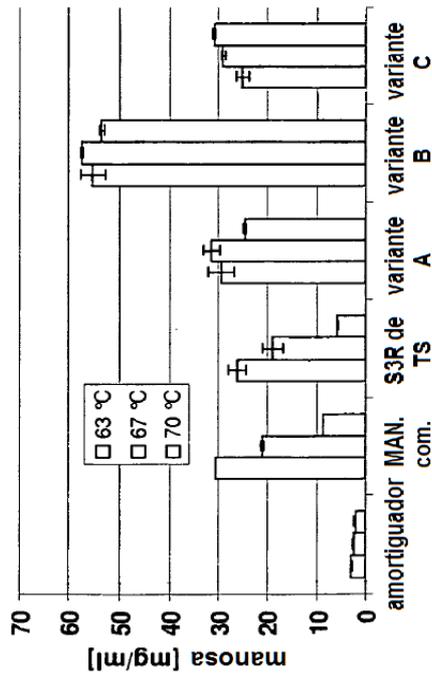






A

producción de manosa después de 43 H



B

producción de manosa después de 71 h

