

REPUBLICA DE COLOMBIA



PATENTE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-036875- -00000-0000

EXPEDIENTE N

Fecha: 2016-02-15 14:49:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de invención de:

Título: MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CAFÉ EMPLEANDO ENZIMAS CON ACTIVIDAD DE BETA-1,3-GALACTANASA

Solicitante: NOVOZYMES A/S

De: BAGSVAERD, DINAMARCA

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Febrero de 2016

WF- 9935



No. 16-036875- -00000-0000

Fecha: 2016-02-15 14:49:57 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7

**DIRECCIÓN DE NUEVAS C...
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT**

1	TIPO DE SOLICITUD	<input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I	<input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad <input type="checkbox"/> Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT		
	Solicitud Internacional No.	PCT/EP2014/067504	Fecha 15.08.2014
	Publicación Internacional No.	WO/2015/022428	Fecha 19.02.2015
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
	MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CAFÉ EMPLEANDO ENZIMAS CON ACTIVIDAD DE BETA-1,3-GALACTANASA		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	A23F 5/24 (2006.01)		
5	SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. <input type="checkbox"/> Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
	NOVOZYMES A/S		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	Krogshoejvej 36	No. TELÉFONO
	CIUDAD	Bagsvaerd DK-2880	CORREO ELECTRÓNICO
	DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
	PAÍS DE RESIDENCIA	Dinamarca	
7	INVENTOR (ES) <input type="checkbox"/> Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. SPODSBERG	Nikolaj	Dinamarca
	2. KROGH	Kristian Bertel Roemer M	Dinamarca
	3. MONRAD	Rune Nygaard	Dinamarca
	4. EKLOEF	Jens	Dinamarca
	5. RASMUSSEN	Louise	Dinamarca
	6. LYNGLV	Gitte Budolfsen	Dinamarca
	7. COULOMB	Laure	Francia
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
	1. Dinamarca		Bagsvaerd, 2880 Vandkarsevej 62
	2. Dinamarca		Bagsvaerd, 2880 Klirevaenget 35
	3. Dinamarca		Hilleroed, 3400 Skovledet 66 B
	4. Dinamarca		Copenhagen Oe, -2100 Kildevaeldsgade 74
	5. Dinamarca		Helsinge, 3200 Granvej 55
	6. Dinamarca		Frederiksberg, 2000 Egernevej 39
	7. Francia		Toulouse, F-31077 118 Route De Narbonne, Residence les Integrales 85B
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
<input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en hoja de información complementaria.			

9 REPRESENTANTE LEGAL APODERADO

APELLIDOS JARAMILLO CAMPUZANO		NOMBRES MAURICIO		IDENTIFICACIÓN C.C. 80.421.942 T.P. 74.555	
DIRECCIÓN	Calle 67 NO. 7 – 35, oficina 1204		No. TELÉFONO	3192900 Ext. 214	
CIUDAD	Bogotá D.C.		CORREO ELECTRÓNICO	dbotero@gpzlegal.com	
PAÍS	Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL		

10 DECLARACIÓN(ES) DE PRIORIDAD SI NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Oficina Europea de Patentes	EP	13180578.0	2013.08.15

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

SI NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

SI NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

SI NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

- Micro, pequeñas y medianas empresas
- Universidades públicas o privadas
- Entidades sin ánimo de lucro

Si aplica, debe aportar los soportes de acuerdo a lo que se indica en el numeral 18 - Documentos que acompañan la solicitud

14 RESUMEN

La presente invención se refiere a un método para producir un extracto de café que comprende utilizar una enzima con actividad de β-1,3-galactanasa y a un extracto de café que comprende al menos un 20% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total.

15 FIGURA CARACTERÍSTICA

Empty box for characteristic figure.

16	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
----	--	----	-------

17	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
----	---	--	--



18	DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD
----	--

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. X Descripción N° de folios: 77
2. X Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 15
3. Dibujos y/o figuras N° folios
4. X Resumen.
5. Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. X Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. Arte final 12 x 12.
8. X Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. Poderes, si fuera el caso.
10. Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. Reducción de tasas
Micro, pequeñas o medianas empresas
 Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.
 Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.
Universidades públicas o privadas
 Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación
Entidades sin ánimo de lucro
 Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
 Hoja de información complementaria.
 Otros, especificar
14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0011889

Bogotá D.C., Febrero 10 de 2016 - 09:43:56

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.

NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	777276452	09/02/2016	1.124.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	80.000.00	80.000.00
			=====
			80.000.00
			=====
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-036875- -00000-0000

Fecha: 2016-02-15 14:49:57
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Faltos: 7

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 10 de 2016 - 09:43:57

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

S



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0011890

Bogotá D.C., Febrero 10 de 2016 - 09:43:56

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.

NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	777276452	09/02/2016	1.124.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	40.000.00	200.000.00
			\$200.000.00

SON: **DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-036875- -00000-0000

Fecha: 2016-02-15 14:49:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 10 de 2016 - 09:43:57



AI



No. 16-036875-00000-0000

Fecha: 2016-02-15 14:49:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa Incompleta

PATENTE DE INVENCION PCT

MODELO DE UTILIDAD PCT

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa Incompleta

DISEÑO INDUSTRIAL

(Art. 119 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa Incompleta

ESQUEMA DE TRAZADO

(Art. 92 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa Incompleta

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código	2020
Tipo de Radicación: Entrada: <input checked="" type="checkbox"/> Salida: <input type="checkbox"/> Traslado: <input type="checkbox"/> Convenio: <input type="checkbox"/>			
Radicator:			
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA			
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:	
Expediente: <u>16-036875-0</u>		Solicitante / <i>Quejoso</i> / Demandante / otros.	
Prueba excluida: <u>CD</u>			
Nº. de Pruebas excluidas: <u>1</u>			
Fecha de emisión de la Prueba:			
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO			
Nº. de bloque:		Otras especificaciones:	
Nº. de rodante:			
Nº. de estante:			
Nº. de archivador:			
Nº. de entrepaño:			
Nº. de gaveta:			
Nº. de caja:			
IMPORTANTE:			
<ul style="list-style-type: none"> El material gráfico <i>o especial</i> que se encuentra <i>dentro o anexo a</i> las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros. 			
Observaciones:		Unidad de Conservación	
<u>El cd contiene 4 archivos PDF cargados y procesados en el sistema.</u>		<input type="checkbox"/> Bolsa <input type="checkbox"/> Caja <input type="checkbox"/> Libro <input type="checkbox"/> Sobre <input type="checkbox"/> Tomo <input type="checkbox"/> Otro	
		Soporte Documental	
		<input checked="" type="checkbox"/> CD <input type="checkbox"/> Disquete <input type="checkbox"/> DVD <input type="checkbox"/> Folleto <input type="checkbox"/> Periódico <input type="checkbox"/> Plano <input type="checkbox"/> Publicación Periódica <input type="checkbox"/> USB <input type="checkbox"/> Otro	
<u>5j.</u>		<u>etc</u>	

**MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CAFÉ EMPLEANDO ENZIMAS
CON ACTIVIDAD DE BETA-1,3-GALACTANASA**

Referencia a la lista de secuencias

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en un
5 soporte de lectura informática. El soporte de lectura
informático se incorpora a la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción
asistida por enzimas de extractos de café.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El extracto de café, es decir, una solución acuosa de
sólidos solubles extraída de los granos de café, tiene
varias aplicaciones industriales. Se utiliza, p. ej., en la
fabricación de café instantáneo; en productos de café
15 listos para el consumo tales como bebidas de café en lata y
de café en botella; y en aplicaciones no relacionadas con
bebidas tales como postres instantáneos, productos de
confitería y sabores.

Los extractos de café comerciales se producen
20 normalmente mediante el procesamiento térmico por etapas,
una combinación de etapas de humectación, extracción e
hidrólisis, que disuelve un porcentaje alto de los sólidos
de café tostado y molido. Se requieren temperaturas muy
altas para conseguir una hidrólisis térmica eficaz, y esto
25 puede generar sabores desagradables y procesos intensivos
de inversión de capital y costos.

Se ha sugerido el uso de diversas enzimas diferentes
en la producción de extractos de café para mejorar la
calidad de los productos y la economía de los procesos
30 (remítase, p. ej., a los documentos US4.983.408,

WO2007/011531, US5.714.183). El uso de mananasa en la producción de un extracto de café soluble se ha descrito, p. ej., en los documentos WO2007/011531 y US5.714.183.

El documento EP1600461A1 describe la extracción 5 enzimática de arabinogalactano a partir de granos de café verdes y tostados, donde el arabinogalactano está mínimamente degradado.

En Kotake *et al.* (2009), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73:2303-2309 se han descrito la clonación y la expresión en 10 *Pichia pastoris* de exo-beta-1,3-galactanasa de *Irpex lacteus*.

Un objeto de la presente invención es obtener extractos de café con un rendimiento alto de sólidos solubles.

15 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

Los inventores de la presente han demostrado que la extracción de café asistida por enzimas puede disolver carbohidratos de forma más selectiva y eficaz que los procesos convencionales. Esto tiene el potencial de ahorrar 20 granos y reducir el costo de las operaciones. Además, la posible degradación enzimática de los posos consumidos puede hacerlos más aplicables para su uso en la producción de etanol o como sustrato para azúcares/polímeros. Por tanto, la extracción de café asistida por enzimas también 25 tiene el potencial de actualización de las corrientes colaterales del proceso de extracción.

Los inventores han descubierto que la incubación de granos de café tostados y molidos o granos de café parcialmente extraídos con β -1,3-galactanasa da lugar a una 30 liberación sustancial de sólidos de café solubles. Los

resultados obtenidos indican que el rendimiento de sólidos solubles es considerablemente superior cuando se utiliza una β -1,3-galactanasa en comparación con una β -1,4-galactanasa. El rendimiento de sólidos solubles es al menos el mismo cuando se incuba con una β -1,3-galactanasa que cuando se incuba con una mananasa y, para la mayoría de las β -1,3-galactanasas evaluadas, el rendimiento de sólidos solubles es mayor que cuando se incuba con mananasa.

Los inventores descubrieron que la incubación con β -1,3-galactanasa liberaba más color por materia seca que la incubación con mananasa, es decir, los extractos tenían un aspecto más oscuro. Esto puede indicar una mejor liberación de compuestos con sabor cuando se utiliza una β -1,3-galactanasa en comparación con una mananasa. Sin que ello suponga ceñirse a ninguna teoría, esto podría deberse a la captura de tales compuestos dentro de la matriz de galactano o debido a su presencia en complejos melanoidínicos liberados en el sobrenadante por las beta-1,3-galactanasas. La diferencia en la liberación de color por parte de los diferentes tratamientos enzimáticos se determinó midiendo la absorbancia a 361 nm. Aunque la diferencia de color también fue claramente visible en los extractos de café y podía ser detectada fácilmente a simple vista.

Se analizó la composición de azúcar total en los extractos y se demostró que la incubación con β -1,3-galactanasa dio lugar a la solubilización de una cantidad sustancial de oligosacáridos que comprendían galactosa. Cuando se utilizó una β -1,3-galactanasa que tenía principalmente actividad de endo- β -1,3-galactanasa, la

mayor parte de la galactosa liberada fue liberada como oligosacáridos. Una cantidad mayor de oligosacáridos en el extracto de café en comparación con monosacáridos contribuirá más a la viscosidad y la sensación bucal. Además, los oligosacáridos del arabinogalactano en el extracto de café probablemente tendrán un efecto prebiótico.

Se demostró que los oligosacáridos disueltos resultantes de la incubación de los posos de café consumido con beta-1,3-galactanasa tenían una proporción alta de galactosa respecto a arabinosa.

Se analizó la distribución de peso molecular de los extractos de café. Los extractos de café resultantes de posos de café incubados con beta-1,3-galactanasas dieron como resultado sólidos de café con un peso molecular promedio mayor en comparación con posos de café incubados con mananasa.

Los inventores también descubrieron que la desramificación del sustrato de arabinogalactano potencia la actividad de las beta-1,3-galactanasas empleadas. Es decir, la disminución de las cadenas laterales en el sustrato incrementa la actividad de las beta-1,3-galactanasas. Esto es relevante para el tratamiento enzimático del café tostado, ya que la tostación da lugar a la desramificación del arabinogalactano en los granos de café.

La presente invención se refiere a un método para producir un extracto de café, que comprende los siguientes pasos:

a. proporcionar granos de café tostados y molidos;

b. añadir a dichos granos de café agua y una enzima con actividad de β -1,3-galactanasa;

c. incubar para obtener un extracto de café acuoso;
y

5 d. separar el extracto de café de los granos de café de los que se extrajo.

Los inventores descubrieron que el rendimiento de sólidos solubles era sustancialmente superior cuando los posos de café se incubaban tanto con una β -1,3-galactanasa como con una mananasa. El aumento del rendimiento es más
10 que aditivo en comparación con la incubación con cada enzima sola, lo cual indica que existe un efecto sinérgico. Sin que ello suponga ceñirse a ninguna teoría, el efecto sinérgico observado se puede explicar por la incorporación
15 de galactomananos en complejos de galactano-proteína-melanoidina en los granos de café.

Por tanto, en una realización preferida del método de la invención, el paso b. comprende además la adición de una enzima con actividad de mananasa.

20 En otra realización preferida, los granos de café tostados y molidos han sido sometidos a una extracción parcial. Tales granos de café también se denominan posos de café.

La presente invención también se refiere a un extracto
25 de café que:

a. comprende al menos un 20% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total;

b. tiene un contenido de galactosa libre inferior a un 50% en peso del contenido de galactosa total;

c. tiene una proporción en peso de galactosa total respecto arabinosa total superior a 3:1; y

d. se caracteriza por que al menos un 45% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un
5 grado de polimerización superior a 5.

En una realización preferida, el extracto de café se caracteriza además por que al menos un 15% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a 55.

10 En otra realización preferida, el extracto de café comprende oligosacáridos de arabinogalactano con un grado de polimerización superior a 2 e inferior a 55 en una cantidad que es al menos un 15% basado en el peso total de sólidos de café solubles.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

La expresión " β -1,3-galactanasa" o "enzima con actividad de β -1,3-galactanasa" se refiere a una enzima que hidroliza específicamente beta-1,3-galactano y beta-1,3-galactooligosacáridos. La enzima tiene principalmente
20 actividad de endo- β -1,3-galactanasa (EC 3.2.1.181) o puede tener actividad exo (EC 3.2.1.145). A los efectos de la presente invención, la actividad de β -1,3-galactanasa se determina de acuerdo con los procedimientos que se describen en los Ejemplos. En un aspecto, una β -1,3-
25 galactanasa que se vaya a utilizar en un método de la presente invención tiene una actividad de β -1,3-galactanasa de al menos un 20%, p.ej., al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 100% del
30 polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. La actividad de β -

1,3-galactanasa se puede cuantificar utilizando el ensayo de azúcares reductores (ensayo PAH-BAH) que se describe en el Ejemplo 7 con goma arábiga degradada de Smith o goma arábiga tratada con ácido como sustrato.

5 En el contexto de la presente invención, una "mananasa" es una beta-mananasa. Puede ser una enzima definida de acuerdo con la técnica como una manano-endo-1,4-beta-manosidasa (EC 3.2.1.78) que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-manosídicos en mananos,
10 galactomananos y glucomananos, teniendo dicha enzima los nombres alternativos mananohidrolasa de 1,4- β -D-manano; endo-1,4- β -mananasa; endo- β -1,4-mananasa; β -mananasa B; 4-mananohidrolasa de β -1,4-manano; endo- β -mananasa; y β -D-mananasa. A efectos de la presente invención, la actividad
15 de mananasa se puede determinar utilizando el ensayo de evaluación de la actividad descrito por Staalbrand *et al.* (1993), Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*, *J. Biotechnol.*, 29:229-42. En un aspecto, una mananasa que se vaya a utilizar en
20 un método de la presente invención tiene una actividad de mananasa de al menos un 20%, p. ej., al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 100% del polipéptido con el número de acceso a GENESEQP AXU66990
25 que se muestra en la presente como la SEQ ID NO:15.

La expresión "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualesquiera modificaciones posteriores a la traducción, tales como el procesamiento del extremo N, truncamiento del
30 extremo C, glicosilación, fosforilación, etc. En una

realización, el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el 21 y el 256 de la SEQ ID NO: 2, según el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), con lo que se predijo un péptido señal de 20 residuos. En una 5 realización, el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4 está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el 26 y el 258 de la SEQ ID NO: 4, según el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), con lo que se predijo un péptido señal de 25 residuos. En una 10 realización, el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 8 está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el 28 y el 265 de la SEQ ID NO: 8, según el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), con lo que se predijo un péptido señal de 27 residuos. En una 15 realización, el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 10 está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el 21 y el 448 de la SEQ ID NO: 10, según el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 20 residuos. En la técnica 20 existe constancia de que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido diferente en el extremo C y/o el extremo N) expresados por el mismo polinucleótido. También existe constancia en la técnica de que diferentes células 25 huésped procesan los polipéptidos de manera diferente y, por lo tanto, una célula huésped que exprese un polinucleótido puede producir un polipéptido maduro diferente (p. ej., con un aminoácido diferente en el

extremo C y/o el extremo N) en comparación con otra célula huésped que exprese el mismo polinucleótido.

La expresión "secuencia que codifica el polipéptido maduro" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro.

Identidad secuencial: La relación entre dos secuencias de aminoácidos es descrita por el parámetro "identidad secuencial". A los efectos de la presente invención, la identidad secuencial entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o versiones posteriores. Los parámetros utilizados son una penalización por la apertura de un hueco de 10, una penalización por la extensión del hueco de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle denominado "la identidad más larga" (que se obtiene utilizando la opción *nobrief* (no resumida)) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula como se indica a continuación:

$$\frac{(\text{Residuos idénticos} \times 100)}{(\text{Longitud de la alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})}$$

La presente invención se refiere a un método para producir un extracto de café, que comprende los siguientes pasos:

- a. proporcionar granos de café tostados y molidos;

b. añadir a dichos granos de café agua y una enzima con actividad de β -1,3-galactanasa;

c. incubar para obtener un extracto de café acuoso;
y

5 d. separar el extracto de café de los granos de café de los que se extrajo.

El método de la presente invención se puede aplicar a granos de café tostados y molidos frescos o a posos de café tostados que han sido sometidos a una extracción previa con
10 agua.

En una realización preferida, los granos de café tostados y molidos han sido sometidos a una extracción parcial.

El método de la invención se puede aplicar a granos de
15 café molidos obtenidos mediante el procesamiento convencional del café soluble. En este, el café tostado normalmente se muele y se somete a extracción (térmica) con agua en múltiples etapas. Lo habitual en la técnica es una ejecución en dos etapas, en la que la primera etapa
20 comprende humedecer los posos de café, recuperar el sabor y extraer los componentes fácilmente solubles (tales como la cafeína, minerales y azúcares simples). La segunda etapa es normalmente una etapa de hidrólisis, en la que se fragmentan biopolímeros de café grandes y componentes
25 adheridos para obtener unos hidrosolubles más pequeños. En la primera etapa, el café tostado normalmente se somete a una extracción con agua a una temperatura menor o igual a 100 °C. Los posos de esta extracción, que se pueden denominar "posos atmosféricos", se someten posteriormente a
30 una extracción con agua sobrecalentada a temperaturas

comprendidas entre 140 °C y 180 °C o incluso superiores. Los posos extraídos parcialmente procedentes de la extracción sobrecalentada se pueden denominar "posos sobrecalentados".

5 Si el método de la invención se aplica a posos extraídos parcialmente, se puede llevar a cabo una primera extracción añadiendo el café tostado y molido que puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 900 micrones a un tanque agitado con camisa que contiene
10 agua, donde la proporción de sólidos respecto al agua es de aproximadamente 1:5. La suspensión se agita, se calienta indirectamente hasta una temperatura inferior a aproximadamente 140 °C, preferentemente en el rango de aproximadamente 85-90 °C, y se mantiene a esta temperatura
15 durante aproximadamente 30 minutos. A continuación, la suspensión se descarga del recipiente, y se separan los posos subsecuentes y el extracto utilizando un filtro. Los posos extraídos parcialmente se someten al método de la invención y el extracto producido en la primera extracción
20 se puede combinar con el segundo extracto producido utilizando el método de la invención.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "posos de café molidos extraídos parcialmente" o "posos de café extraídos parcialmente" quieren decir que
25 los granos de café molidos han sido sometidos a al menos una extracción. Tales granos de café molidos extraídos parcialmente también se pueden denominar posos de café consumidos.

El método de la invención se puede aplicar, en
30 general, a granos tostados que comprenden café tostado y

molido los cuales han sido molidos hasta un tamaño de partícula promedio de entre aproximadamente 0.3 y aproximadamente 5 mm, preferentemente entre aproximadamente 0.4 y aproximadamente 0.9 mm.

5 Además, se puede añadir un paso de tratamiento del sabor previo al método de la invención para recuperar los compuestos con aroma o constituyentes aromáticos del café antes de las etapas de extracción y/o hidrólisis. Los procesos útiles incluyen, sin carácter limitante, los
10 descritos en el documento EP 0 489 401. Una ejecución práctica incluye humectar el café tostado y molido con agua en un recipiente en una proporción de aproximadamente 1:0.5 en peso. Se aplica un vacío al recipiente (p. ej., de aproximadamente 150 mbar) y después se aplica un vapor a
15 presión baja al lecho de posos húmedos durante hasta aproximadamente 4-8 minutos para evaporar los compuestos con aroma del café tostado y molido. Los compuestos volátiles evaporados se hacen condensar, por ejemplo, a aproximadamente 5° C, y se conservan para añadirlos de
20 nuevo a extractos o sólidos extraídos.

 El método de la invención se puede poner en práctica en café tostado que ha sido purgado con vapor a presión baja para extraer componentes con sabor volátiles, tal como se ha descrito anteriormente.

25 El método de la invención se puede aplicar a cualquier tipo de posos de café con materia hidrolizable con los que estén familiarizados los expertos en la técnica, tales como posos de café desaceitado, posos de café descafeinado, posos de café molido húmedos, etc.

El tratamiento enzimático de los granos de café tostados y molidos se ha de llevar a cabo a una temperatura a la que las enzimas sean activas y durante un periodo suficientemente prolongado para permitir la reacción
5 enzimática.

En un modo de operación discontinuo posible, después de que la reacción enzimática haya finalizado esencialmente, la mezcla se somete a una separación del grueso, por ejemplo, centrifugación o filtración a banda,
10 que elimina la mayor parte de los sólidos insolubles. El extracto separado, que sigue conteniendo material particulado fino, aceite y proteína enzimática, se hace recircular a través de un dispositivo de membrana de flujo cruzado, que elimina todo el material insoluble y también
15 puede eliminar la enzima. La mayor parte o toda la enzima permanece en el material retenido por la membrana y se puede reciclar en la reacción.

En un modo de operación posible, se extrae material permeado a través de la membrana semipermeable de forma
20 constante durante la reacción enzimática, es decir, parte de la mezcla de reacción se hace circular de forma continua a través de la celda de separación de la membrana semipermeable de flujo cruzado. El proceso se puede hacer operar en un modo semicontinuo, en el que se extrae
25 material permeado hasta que el volumen en el recipiente de reacción se reduzca hasta un punto en el que su viscosidad o la caída de presión sea alta. En este momento, parte del material retenido se purga y se añade suspensión de café fresca y cierta cantidad de enzima fresca. El material
30 retenido purgado se puede desechar o se puede lavar para

recuperar la enzima que posteriormente se puede reutilizar. La enzima en el material retenido (no purgado) remanente se retiene y se reutiliza.

Como alternativa, se puede añadir suspensión de
5 alimentación fresca de forma continua al tanque de alimentación junto con cierta cantidad de la enzima con la extracción mediante purga del mismo volumen de la corriente de reciclaje.

En cualquier caso, la realización del proceso en un
10 modo de operación semicontinuo o continuo permite la permeación de componentes disueltos al exterior de la zona de reacción antes de que se puedan descomponer aún más.

Si se utiliza el método de la invención para tratar posos de café tostado y molido que han sido sometidos a una
15 extracción previa con agua y/o una hidrólisis térmica, el extracto obtenido mediante el método de esta invención se puede combinar con los extractos obtenidos con anterioridad.

Cuando se utilizan posos atmosféricos como
20 alimentación en el método de la invención, el extracto producido se puede combinar con el extracto obtenido durante la etapa de extracción atmosférica. Los extractos se combinan en función de la proporción de los rendimientos del café tostado extraído de cada etapa. El extracto
25 combinado posteriormente se concentra, se aromatiza y se seca acorde con la práctica convencional en la técnica.

El extracto de café se puede deshidratar, tal como una composición de café soluble o mixta seca, o puede ser un producto de café listo para beber, una composición mixta
30 líquida, una composición congelada o una composición

concentrada líquida. El extracto de café de la invención también se puede utilizar en aplicaciones que no sean bebidas, tales como postres instantáneos o productos de confitería, etc.

5 Un experto en la técnica estará familiarizado con los procesos para preparar tales composiciones de café a partir de extractos de café solubles.

En el método de la invención, se añaden agua y enzima a los granos de café que pueden haberse sometido
10 previamente a una extracción parcial.

El agua, p. ej., se puede añadir de modo que la concentración final de material seco sea de un 2%-30% (p/p), preferentemente de un 5%-20% (p/p), tal como de aproximadamente un 10% (p/p).

15 La enzima con actividad de β -1,3-galactanasa se puede añadir en una concentración de al menos 0.001 g de proteína enzimática/kg de granos de café, preferentemente al menos 0.005 g de enzima proteica/kg de granos de café, tal como en una concentración de 0.001-0.5 g de proteína
20 enzimática/kg de granos de café, preferentemente 0.005-0.2 g de proteína enzimática/kg de granos de café.

La enzima con actividad de β -1,3-galactanasa se añade preferentemente como un preparado enzimático caracterizado por que al menos un 5%, preferentemente al menos un 10% o
25 al menos un 20%, de la proteína total en el preparado es una enzima con actividad de β -1,3-galactanasa como actividad enzimática predominante.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una actividad a 60 °C que es al menos el
30 50%, preferentemente al menos el 60% o al menos el 70%, de

su actividad a 40 °C. La actividad a temperaturas diferentes se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 11.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una actividad relativa para degradar goma arábica degradada de Smith que es al menos 10 veces superior a su actividad relativa para degradar goma arábica. La actividad relativa para degradar estos sustratos con un grado de ramificación diferentemente se puede determinar tal como se describe en los Ejemplo 6-7.

En una realización, la enzima que tiene actividad de β -1,3-galactanasa es una β -1,3-galactanasa, preferentemente una endo- β -1,3-galactanasa (EC 3.2.1.181) o una exo- β -1,3-galactanasa (EC 3.2.1.145). En una realización, la enzima que tiene actividad de β -1,3-galactanasa es una endo- β -1,3-galactanasa (EC 3.2.1.181). En otra realización, la enzima que tiene actividad de β -1,3-galactanasa es una exo- β -1,3-galactanasa (EC 3.2.1.145).

En una realización, la enzima que tiene actividad de β -1,3-galactanasa tiene principalmente actividad de endo- β -1,3-galactanasa.

En una realización, la enzima que tiene actividad de β -1,3-galactanasa es una β -1,3-galactanasa de la familia GH16.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad respecto a la secuencia madura de cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4 u 8. Preferentemente, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un

65%, p. ej., al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, respecto a la secuencia madura de cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4 u 8. En otra realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa difiere en hasta 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respecto al polipéptido maduro de cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4 u 8.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 2. Preferentemente, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 65%, p. ej., al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 2. En otra realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa difiere en hasta 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 4. Preferentemente, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos con

una identidad de al menos un 65%, p. ej., al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 4. En otra realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa difiere en hasta 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 8. Preferentemente, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 65%, p. ej., al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 8. En otra realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa difiere en hasta 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 8.

En una realización, la enzima que tiene actividad de β -1,3-galactanasa es una β -1,3-galactanasa de la familia GH43.

En una realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos un 60% de identidad respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 10. Preferentemente, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 65%, p. ej., al menos un 70%,
5 al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, respecto a la secuencia madura de la SEQ ID NO: 10. En otra
10 realización, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa difiere en hasta 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 10.

Una β -1,3-galactanasa que se vaya a utilizar en el
15 método de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. A los efectos de la presente invención, la expresión "obtenido a partir de", tal como se utiliza en la presente en relación con una fuente determinada, significará que el polipéptido
20 codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la cual se ha insertado el polinucleótido procedente de la fuente. En una realización, la β -1,3-galactanasa obtenida a partir de una fuente determinada se secreta extracelularmente.

25 La β -1,3-galactanasa puede ser una β -1,3-galactanasa bacteriana. Por ejemplo, la β -1,3-galactanasa puede ser una β -1,3-galactanasa de una bacteria grampositiva tal como una β -1,3-galactanasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*,
30 *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces*, o una β -1,3-

galactanasa de una bacteria gramnegativa tal como una β -1,3-galactanasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.

5 La β -1,3-galactanasa puede ser una β -1,3-galactanasa fúngica. Por ejemplo, la β -1,3-galactanasa puede ser una β -1,3-galactanasa de una levadura tal como una β -1,3-galactanasa de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o una β -1,3-galactanasa de un hongo filamentoso tal como una β -1,3-galactanasa de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*,
10 *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*,
15 *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria*.

En una realización, la β -1,3-galactanasa se obtiene a partir de *Auricularia*, preferentemente a partir de *Auricularia delicata*.

En una realización, la β -1,3-galactanasa se obtiene a partir de *Magnaporthe*, preferentemente a partir de *Magnaporthe oryzae*.

En una realización, la β -1,3-galactanasa se obtiene a partir de *Neurospora*, preferentemente a partir de *Neurospora crassa*.

En una realización, la β -1,3-galactanasa se obtiene a partir de *Irpex*, preferentemente a partir de *Irpex lacteus*.

Se sobreentenderá que, para las especies mencionadas anteriormente, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos y otros equivalentes taxonómicos, p. ej., anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el cual se conocen. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

Las cepas de estas especies son de dominio público y se puede acceder a ellas fácilmente en una serie de colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

La β -1,3-galactanasa se puede identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suelo, abono, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (p. ej., suelo, abono, agua, etc.) utilizando sondas adecuadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales son de uso común en la técnica. Entonces, se puede obtener un polinucleótido que codifique la β -1,3-galactanasa cribando de manera similar un ADN genómico o

una colección de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifique la β -1,3-galactanasa con la o las sondas, el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son de uso común para los expertos en la técnica (remítase, p. ej., a Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2.^a edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

En una realización del método de la invención, el paso b. comprende además la adición de una enzima con actividad de mananasa.

Una mananasa que se vaya a utilizar en el método de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Se han identificado mananasas, p. ej., en varios organismos del género *Bacillus*. Por ejemplo, Talbot *et al.* (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 56, N.º 11, págs. 3505-3510, describe una beta-mananasa derivada de *Bacillus stearothermophilus* que tiene un pH óptimo de 5.5-7.5. Mendoza *et al.* (1994), *World J. Microbiol. Biotech.*, Vol. 10, N.º 5, págs. 551-555, describe una beta-mananasa derivada de *Bacillus subtilis* que tiene una actividad óptica a pH 5.0 y 55 °C. El documento JP-03047076 describe una beta-mananasa derivada de *Bacillus sp.*, que tiene un pH óptimo de 8-10. El documento JP-63056289 describe la producción de una beta-mananasa termoestable alcalina. El documento JP-08051975 describe la producción de beta-mananasas alcalinas a partir de *Bacillus alcalofílico sp.* AM-001. En el documento WO 97/11164 se describe una mananasa purificada a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*. El documento WO 94/25576

describe una enzima de *Aspergillus aculeatus*, CBS 101.43, que exhibe actividad de mananasa y el documento WO 93/24622 describe una mananasa aislada a partir de *Trichoderma reesei*.

5 Un preparado de mananasa comercial adecuado es Mannaway® producido por Novozymes A/S.

En una realización, la enzima con actividad de mananasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad respecto a la SEQ ID NO: 15.
10 Preferentemente, la enzima con actividad de mananasa tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 65%, p. ej., al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos
15 un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, respecto a la SEQ ID NO: 15. En otra realización, la enzima con actividad de mananasa difiere en hasta 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respecto al polipéptido de la SEQ
20 ID NO: 15.

En una realización, la mananasa se obtiene a partir de una cepa del género *Bacillus*.

En una realización, la mananasa es la mananasa que tiene la secuencia de aminoácidos GENESEQP:AXU66990
25 descrita en el documento WO2010000858.

En una realización del método de la invención, la enzima con actividad de β -1,3-galactanasa y la enzima con actividad de mananasa actúan sinérgicamente para incrementar la cantidad de sólidos de café solubilizados.

En el método de la invención, después de que se hayan añadido el agua y la enzima a los granos de café tostados y molidos, la composición que comprende los granos de café, el agua y la enzima se incuba para crear un extracto de
5 café acuoso.

La incubación se ha de realizar a una temperatura a la que las enzimas sean activas, normalmente en el rango de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 90 °C, preferentemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente
10 70 °C durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 24 horas para permitir la reacción enzimática.

Tras la incubación, el extracto de café se separa de
15 los granos de café sometidos a extracción por cualquier método conocido en la técnica.

En una realización, el extracto de café obtenido mediante el método de la invención comprende al menos un 20% basado en el peso total de los sólidos de café solubles de galactosa total. Preferentemente, el extracto de café
20 comprende al menos un 25% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total.

La galactosa total en el extracto de café en el contexto de la presente invención se refiere a la galactosa libre disuelta más la galactosa adherida en los oligosacáridos disueltos.
25

En una realización, el contenido de galactosa libre en el extracto de café obtenido mediante el método de la invención es inferior al 50% en peso del contenido de galactosa total. Preferentemente, el contenido de galactosa
30

libre es inferior al 40% en peso, preferentemente inferior al 30% o inferior al 25% en peso, del contenido de galactosa total. En una realización, el contenido de galactosa libre es inferior al 20% en peso, preferentemente inferior al 15% o inferior al 10% en peso, del contenido de galactosa total.

En una realización, el extracto de café obtenido mediante el método de la invención tiene una proporción en peso de galactosa total respecto a arabinosa total superior a 3:1, preferentemente superior a 4:1 o superior a 5:1.

La arabinosa total en el extracto de café en el contexto de la presente invención se refiere a la arabinosa libre disuelta más la arabinosa adherida en los oligosacáridos disueltos.

En una realización, el extracto de café obtenido mediante el método de la invención se caracteriza por que al menos un 45% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 5. Preferentemente, al menos un 50% en peso, p. ej., al menos un 55% o al menos un 60% en peso, de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 5.

En una realización, el extracto de café obtenido mediante el método de la invención se caracteriza por que al menos un 15% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a 55. Preferentemente, al menos un 15% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a 45, p. ej., inferior a 35 o inferior a 25.

En una realización, el extracto de café obtenido mediante el método de la invención comprende oligosacáridos de arabinogalactano con un grado de polimerización superior a 2 e inferior a 55 en una cantidad que es al menos un 15%
5 basado en el peso total de sólidos de café solubles.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un extracto de café que:

- a. comprende al menos un 20% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total;
- 10 b. tiene un contenido de galactosa libre inferior a un 50% en peso del contenido de galactosa total;
- c. tiene una proporción en peso de galactosa total respecto a arabinosa total superior a 3:1; y
- d. se caracteriza por que al menos un 45% en peso de
15 su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 5.

En una realización, el extracto de café comprende al menos un 20% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total. Preferentemente, el extracto
20 de café comprende al menos un 25% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total.

En una realización, el contenido de galactosa libre en el extracto de café es inferior al 40% en peso, preferentemente inferior al 30% o inferior al 25% en peso,
25 del contenido de galactosa total. En una realización, el contenido de galactosa libre es inferior al 20% en peso, preferentemente inferior al 15% o inferior al 10% en peso, del contenido de galactosa total.

En una realización, el extracto de café tiene una proporción en peso de galactosa total respecto a arabinosa total superior a 4:1 o superior a 5:1.

En una realización, el extracto de café se caracteriza por que al menos un 50% en peso, p. ej., al menos un 55% o al menos un 60% en peso, de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 5.

En una realización preferida, el extracto de café se caracteriza además por que al menos un 15% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a 55. Preferentemente, al menos un 15% en peso de su fracción de carbohidratos son oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a 45, p. ej., inferior a 35 o inferior a 25.

En otra realización preferida, el extracto de café comprende oligosacáridos de arabinogalactano con un grado de polimerización superior a 2 e inferior a 55 en una cantidad que es al menos un 15% basado en el peso total de sólidos de café solubles.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

En los siguientes ejemplos, se utilizan las siguientes enzimas galactanasa:

SEQ ID NO:	Ejemplo	Descripción	Origen	GH
2	Ejemplo 1	Endo- β -1,3-galactanasa	<i>Auricularia delicata</i>	GH16
4	Ejemplo 2	Endo- β -1,3-galactanasa	<i>Magnaporthe oryzae</i>	GH16

8	Ejemplo 3	Endo- β -1,3- galactanasa	<i>Neurospora</i> <i>crassa</i>	GH16
10	Ejemplo 4	Exo- β -1,3- galactanasa	<i>Irpex lacteus</i>	GH43
12	Ejemplo 5	Endo- β -1,4- galactanasa	<i>Ignisphaera</i> <i>aggregans</i>	GH53

La enzima mananasa empleada en los ejemplos es Mannaway® 25L.

Materiales

Los productos químicos utilizados como tampones y
5 sustratos eran productos comerciales de al menos grado de reactivo.

Medios y soluciones

Medio YP + 2% de glucosa: compuesto por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa.

10 Placas de PDA agar: compuestas por infusión de papa (la infusión de papa se preparó hirviendo 300 g de papas en rodajas (lavadas, pero sin pelar) en agua, durante 30 minutos y después decantando o colando el caldo a través de una estopilla. A continuación se añadió agua destilada
15 hasta que el volumen total de la suspensión fue de un litro, seguida de 20 g de dextrosa y 20 g de agar en polvo. El medio se esterilizó en un autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8.^a edición, Revisión A, 1998).

20 Las placas LB estaban compuestas por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio, 15 g de bacto-agar y agua desionizada hasta un 1 litro. El medio se esterilizó en un autoclave a 15 psi

durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8.^a edición, Revisión A, 1998).

Las placas de sacarosa COVE estaban compuestas por 342 g de sacarosa (Sigma S-9378), 20 g de agar en polvo, 20 mL de una solución de sales de Cove (26 g de MgSO₄·7H₂O, 26 g de KCL, 26 g KH₂PO₄, 50 mL de una solución de metales traza de Cove) y agua desionizada hasta 1 litro), y agua desionizada hasta 1 litro). El medio se esterilizó en un autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8.^a edición, Revisión A, 1998). El medio se enfrió hasta 60 °C y se añadieron acetamida 10 mM, CsCl 15 mM y Tritón X-100 (50 µL/500 mL).

La solución de metales traza de Cove estaba compuesta por 0.04 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.4 g de CuSO₄·5H₂O, 1.2 g de FeSO₄·7H₂O, 0.7 g de MnSO₄·H₂O, 0.8 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 10 g de ZnSO₄·7H₂O y agua desionizada hasta 1 litro.

Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de la endo-β-1,3-galactanasa de *Auricularia delicata* (GALACTANASA1)

El ensamblaje del genoma de *Auricularia delicata* SS-5 (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, EE. UU.) se obtuvo en el NCBI, Bethesda MD, EE. UU., junto con los modelos genéticos correspondientes y se utilizó como punto de partida para detectar homólogos de GH16 en el genoma. Se construyeron modelos genéticos más precisos de forma manual empleando múltiples secuencias de proteínas GH16 conocidas como guía.

Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene la secuencia de ADNc de *Auricularia*

delicata que codifica un polipéptido de la familia GH16 con actividad de endo- β -1,3-galactanasa

Sobre la base de la secuencia de nucleótidos de la secuencia del genoma de *Auricularia delicata* SS-5 (DOE
5 Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, EE. UU.), se obtuvo un gen sintético P24GUG (SEQ ID NO: 1) recurriendo a GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) que codificaba el ADNc de la endo-beta-1,3-galactanasa de *Auricularia delicata* con sitios de restricción BamHI y
10 XhoI adicionales para facilitar la clonación en un vector de expresión.

El constructo de GeneArt que contenía P24GUG se trató con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, y los productos de reacción se aislaron mediante electroforesis
15 en gel de agarosa al 1.0% utilizando base Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM, tampón de EDTA disódico (TAE) 1 mM, en la cual se extrajo una banda del producto de 780 pb del gel y se purificó utilizando un kit de purificación de ADN de PCR y bandas de gel GFX® ILLUSTRATE® (GE Healthcare Life
20 Sciences, Brondby, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento se clonó posteriormente mediante ligamiento en pDau109 digerido con Bam HI y Xho I utilizando ADN-ligasa de T4 (Roche
Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para obtener el plásmido
25 pP24GUG. La clonación del gen P24GUG en pDau109 digerido con Bam HI-Xho I dio lugar a la transcripción del gen P24GUG de *Auricularia delicata* bajo el control de un promotor doble NA2-tpi. NA2-tpi es un promotor modificado a
30 partir del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de

Aspergillus niger en el que la secuencia líder sin traducir se reemplazó con una secuencia líder sin traducir del gen que codifica la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

5 El plásmido pP24GUG ligado se transformó en células químicamente competentes de *E. coli* One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se colocaron en placas LB suplementadas con 0.1 mg de ampicilina por mL. Después de
10 incubar a 37 °C durante toda la noche, se observaron colonias en desarrollo bajo selección en las placas LB con ampicilina. Se cultivaron dos colonias transformadas con el constructo P24GUG GH16 en medio LB suplementado con 0.1 mg de ampicilina por mL y el plásmido se aisló con un kit
15 QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los plásmidos aislados se secuenciaron con cebadores del vector y cebadores específicos para el gen P24GUG con el fin de determinar un clon de la expresión del plásmido
20 representativo que estuviera exento de errores.

Caracterización de la secuencia de ADNc de *Auricularia delicata* que codifica un polipéptido GH16 con actividad de endo- β -1,3-galactanasa

La secuenciación del ADN del clon de ADNc de P24GUG
25 GH16 de *Auricularia delicata* se realizó con un secuenciador de ADN automático, modelo 3700 de Applied Biosystems utilizando la versión 3.1 de la química de terminadores BIG-DYE™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE. UU.) y la estrategia del paseo con cebador (*primer walking*). Los datos de la secuencia de nucleótidos se
30

analizaron para determinar la calidad y se compararon todas las secuencias entre sí con la ayuda del software PHRED/PHRAP (Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. UU.).

5 La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen P24GUG de *Auricularia delicata* se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente. La secuencia codificante tiene 771 pb que incluyen el codón de parada. La proteína predicha
10 codificada tiene 256 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 20 residuos. La proteína madura predicha contiene 236 aminoácidos con una masa molecular predicha de 26 kDa y un pH isoeléctrico de 7.3.

15 Expresión de la endo- β -1,3-galactanasa GH16 de *Auricularia delicata* (GALACTANAS1)

 El plásmido de expresión pP24GUG se transformó en MT3568 de *Aspergillus oryzae*. El MT3568 de *Aspergillus oryzae* es un derivado con la AMDS (acetamidasa)
20 interrumpida de JaL355 (WO 02/40694) en el que se restauró la auxotrofía de pyrG en el proceso de inactivación del gen de la acetamidasa (AMDS) de *Aspergillus oryzae*. Se preparan protoplastos de MT3568 de acuerdo con el método de la Patente Europea N.º 0238023, páginas 14-15, que se
25 incorporan a la presente por referencia.

 Los transformantes se purificaron en placas de selección de sacarosa COVE mediante conidios de un único tipo antes de esporularlos en placas PDA. La producción del polipéptido GH16 de *Auricularia delicata* por parte de los
30 transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de

cultivo de cultivos estacionarios en 96 pocillos profundos de 1 mL a 30 °C en medio YP+ 2% de glucosa. La expresión se verificó en un gel de 48 pocillos para SDS-PAGE al 8% E-Page (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) mediante tinción de Coomassie. Se seleccionó un transformante para los estudios posteriores y se denominó *Aspergillus oryzae* 99.1.

Para la producción a escala mayor, se esparcieron esporas de *Aspergillus oryzae* 99.1 sobre una placa PDA y se incubaron durante 5 días a 37 °C. La placa de esporas confluentes se lavó dos veces con 5 mL de TWEEN® 20 al 0.01% para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de esporas se utilizó a continuación para inocular quince matraces de 500 mL que contenían 150 mL de medio Dap-4C (documento WO 2012/103350). El cultivo se incubó a 30 °C con agitación constante a 100 rpm. El cuarto día después de la inoculación, el caldo de cultivo se recogió por filtración a través de un filtro PES de 0.2 µm MF75 Supor MachV superior de rosca (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda correspondiente a la proteína GH16 de aproximadamente 26 kDa. La identidad de la banda como el polipéptido GH16 de *Auricularia delicata* se verificó mediante secuenciación peptídica.

Purificación de la endo-β-1,3-galactanasa de *Auricularia delicata* (GALACTANAS1)

El caldo de cultivo celular recogido de la GALACTANAS1 de *Auricularia delicata* se suplementó con sulfato de amonio hasta una concentración final de 2 M y el pH se ajustó a 7.5. A continuación, la muestra se cargó en

una columna hidrófoba (lecho empacado de perlas de butil Toyo; gradiente: 0-100% de B en 10 volúmenes de columna; tampón A: Mes 50 mM y sulfato de amonio 2 M; tampón B: Mes 50 mM). La SDS-PAGE (condiciones reductoras) confirmó que la galactanasa no se eluyó a través de la columna en la fracción correspondiente al flujo que atravesó la columna o de lavado. Sobre la base de la SDS-PAGE, las fracciones que contenían proteínas con el PM esperado de 27.7 kDa (fracciones 30-50) se combinaron, se concentraron y se reemplazó su tampón por un tampón de acetato de sodio 20 mM y pH 6.5 mediante centrifugación en una membrana con un PMNL de 3kDa de una columna Vivaspin (3000 x g de centrifugación giratoria).

Ejemplo 2. Clonación, expresión y purificación de la endo- β -1,3-galactanasa de *Magnaporthe oryzae* (GALACTANASA2)

Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene la secuencia de ADNc de *Magnaporthe oryzae* que codifica un polipéptido de la familia GH16 con actividad de endo- β -1,3-galactanasa

Se analizó un ensamblaje preliminar del genoma de *Magnaporthe oryzae* 70-15 (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, EE. UU.) utilizando GeneMark v2.3c (Georgia Tech's Center for Bioinformatics and Computational Genomics, Atlanta, Georgia, EE. UU.). Se usaron modelos genéticos construidos por software como un punto de partida para detectar homólogos de GH16 en el genoma. Se construyeron modelos genéticos más precisos de forma manual empleando múltiples secuencias de proteínas GH16 conocidas como guía. Una secuencia obtenida de este modo fue idéntica

a la entrada A4QYM3 en Swissprot que figura como una proteína GH16 putativa sin caracterizar.

Sobre la base de la secuencia de nucleótidos de la secuencia del genoma de *Magnaporthe oryzae* 70-15 (Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, Reino Unido), se obtuvo un gen sintético P24HNK (SEQ ID NO: 3) recurriendo a GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) que codificaba el ADNc de la endo-beta-1,3-galactanasa de *Magnaporthe oryzae* con sitios de restricción BamHI y XhoI adicionales para facilitar la clonación en un vector de expresión.

El constructo de GeneArt que contenía P24HNK se trató con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, y los productos de reacción se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% utilizando base Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM, tampón de EDTA disódico (TAE) 1 mM, en la cual se extrajo una banda del producto de 790 pb del gel y se purificó utilizando un kit de purificación de ADN de PCR y bandas de gel GFX® ILLUSTRATE® (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento se clonó posteriormente mediante ligamiento en pDaul09 digerido con Bam HI and Xho I utilizando ADN-ligasa de T4 (Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para obtener el plásmido pP24HNK. La clonación del gen P24HNK en pDaul09 digerido con Bam HI-Xho I dio lugar a la transcripción del gen P24HNK de *Magnaporthe oryzae* bajo el control de un promotor doble NA2-tpi. NA2-tpi es un promotor modificado a partir del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que la secuencia líder sin traducir se

reemplazó con una secuencia líder sin traducir del gen que codifica la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

El plásmido pP24HNK ligado se transformó en células
5 químicamente competentes de *E. coli* One Shot® TOP10F´
(Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con el
protocolo del fabricante y se colocaron en placas LB
suplementadas con 0.1 mg de ampicilina por mL. Después de
incubar a 37 °C durante toda la noche, se observaron
10 colonias en desarrollo bajo selección en las placas LB con
ampicilina. Se cultivaron dos colonias transformadas con el
constructo P24HNK GH16 en medio LB suplementado con 0.1 mg
de ampicilina por mL y el plásmido se aisló con un kit
QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.)
15 de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los plásmidos aislados se secuenciaron con cebadores
del vector y cebadores específicos para el gen P24HNK con
el fin de determinar un clon de la expresión del plásmido
representativo que estuviera exento de errores.

20 Caracterización de la secuencia de ADNc de *Magnaporthe*
oryzae que codifica un polipéptido P24HNK GH16 con
actividad de endo- β -1,3-galactanasa

La secuenciación del ADN del clon de ADNc de P24HNK
GH16 de *Magnaporthe oryzae* se realizó con un secuenciador
25 de ADN automático, modelo 3700 de Applied Biosystems
utilizando la versión 3.1 de la química de terminadores
BIG-DYE™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.
UU.) y la estrategia del paseo con cebador (*primer*
walking). Los datos de la secuencia de nucleótidos se
30 analizaron para determinar la calidad y se compararon todas

las secuencias entre sí con la ayuda del software PHRED/PHRAP software (Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. UU.).

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen P24HNK de *Magnaporthe oryzae* se muestran en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente. La secuencia codificante tiene 777 pb que incluyen el codón de parada. La proteína predicha codificada tiene 258 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 25 residuos. La proteína madura predicha contiene 233 aminoácidos con una masa molecular predicha de 26 kDa y un pH isoeléctrico de 4.9.

Expresión de la endo- β -1,3-galactanasa GH16 de *Magnaporthe oryzae* (GALACTANASA2)

El plásmido de expresión pP24HNK se transformó en MT3568 de *Aspergillus oryzae*. El MT3568 de *Aspergillus oryzae* es un derivado con la AMDS (acetamidasa) interrumpida de JaL355 (WO 02/40694) en el que se restauró la auxotrofia de pyrG en el proceso de inactivación del gen de la acetamidasa (AMDS) de *Aspergillus oryzae*. Se preparan protoplastos de MT3568 de acuerdo con el método de la Patente Europea N.º 0238023, páginas 14-15, que se incorporan a la presente por referencia.

Los transformantes se purificaron en placas de selección de sacarosa COVE mediante conidios de un único tipo antes de esporularlos en placas PDA. La producción del polipéptido GH16 de *Magnaporthe oryzae* por parte de los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo de 96 cultivos estacionarios en pocillos profundos

de 1 mL a 30 °C en medio YP+ 2% de glucosa. La expresión se verificó en un gel de 48 pocillos para SDS-PAGE al 8% E-Page (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) mediante tinción de Coomassie. Se seleccionó un transformante para los estudios posteriores y se denominó *Aspergillus oryzae* 100.3.

Para la producción a escala mayor, se esparcieron esporas de *Aspergillus oryzae* 100.3 sobre una placa PDA y se incubaron durante 5 días a 37 °C. La placa de esporas confluentes se lavó dos veces con 5 mL de TWEEN® 20 al 0.01% para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de esporas se utilizó a continuación para inocular quince matraces de 500 mL que contenían 150 mL de medio Dap-4C (documento WO 2012/103350). El cultivo se incubó a 30 °C con agitación constante a 100 rpm. El cuarto día después de la inoculación, el caldo de cultivo se recogió por filtración a través de un filtro PES de 0.2 µm MF75 Supor MachV superior de rosca (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda correspondiente a la proteína GH16 de aproximadamente 26 kDa. La identidad de la banda como el polipéptido GH16 de *Magnaporthe oryzae* se verificó mediante secuenciación peptídica.

Purificación de la endo-β-1,3-galactanasa de *Magnaporthe oryzae* (GALACTANASA2)

El caldo de cultivo celular recogido de *Magnaporthe oryzae* se suplementó con sulfato de amonio 1.5 M hasta una concentración final de 1.5 M y el pH se ajustó a 7. A continuación, la muestra se cargó en una columna hidrófoba

(lecho empacado de perlas de butil Toyo; gradiente: 0-100% de B en 10 volúmenes de columna; tampón A: Mes 50 mM y sulfato de amonio 1.5 M; tampón B: Mes 50 mM). La SDS-PAGE (condiciones reductoras) confirmó que la galactanasa no se eluyó a través de la columna en la fracción correspondiente al flujo que atravesó la columna o de lavado. Sobre la base de la SDS-PAGE, las fracciones que contenían proteínas con el PM esperado de 28.5 kDa (fracciones 33-46) se combinaron, se concentraron y se reemplazó su tampón por un tampón de acetato de sodio 20 mM y pH 6.5 mediante centrifugación en una membrana con un PMNL de 3kDa de una columna Vivaspin (3000 x g de centrifugación giratoria).

Ejemplo 3. Clonación, expresión y purificación de la endo- β -1,3-galactanasa de *Neurospora crassa* (GALACTANASA3)

15 Extracción de ADN genómico de la cepa FGSC987 de *Neurospora crassa*

Para generar ADN genómico para la amplificación por PCR, se propagó la cepa FGSC987 de *Neurospora crassa* (ATCC 24698, LGC Standards AB, Borås, Suecia) en placas con agar PDA cultivándola a 26 °C durante 7 días. Se utilizaron esporas recogidas de las placas PDA para inocular 25 mL de medio YP + 2% de glucosa en un matraz de agitación deflectado y se incubaron a 26 °C durante 72 horas con agitación a 85 rpm.

25 Se aisló ADN genómico de acuerdo con un protocolo del kit DNeasy Plant Maxi modificado (Qiagen Danmark, Copenhagen, Dinamarca). El material fúngico del cultivo anterior se recogió por centrifugación a 14 000 x g durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y se congelaron 0.5 g del pellet en nitrógeno líquido con arena de cuarzo y se

30

molieron hasta obtener un polvo fino en un mortero preenfriado. El polvo se transfirió a un tubo de centrifugación de 15 mL y se añadieron 5 mL de tampón AP1 (precalentados a 65 °C) y 10 µL de solución patrón de RNasa A (100 mg/mL), y a continuación se agitó enérgicamente con un vórtex. Tras incubar durante 10 minutos a 65 °C con inversión regular del tubo, se añadieron 1.8 mL de tampón AP2 al lisado por mezcla suave seguida de incubación en hielo durante 10 min. El lisado se centrifugó posteriormente a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se decantó en una columna de centrifugado QIAshredder Maxi colocada en un tubo colector de 50 mL. A continuación se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El flujo que atravesó la columna se transfirió a un tubo de 50 mL nuevo, y se añadieron 1.5 volúmenes de tampón AP3/E y a continuación se agitó en un vórtex. Se transfirieron 15 mL de la muestra a una columna de centrifugado DNeasy Maxi colocada en un tubo colector de 50 mL, y se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el flujo que atravesó la columna y se agregaron 12 mL de tampón AW a la columna de centrifugado DNeasy Maxi colocada en un tubo colector de 50 mL, y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras desechar el flujo que atravesó la columna, se repitió la centrifugación para eliminar el alcohol remanente. La columna de centrifugado DNeasy Maxi se transfirió a un tubo de 50 mL nuevo y se añadieron 0.5 mL de tampón AE (precalentados a 70 °C). Tras incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, la muestra se eluyó por centrifugación a 3000 x g durante 5

minutos a temperatura ambiente. La elución se repitió con 0.5 mL más de tampón AE y se combinaron los eluatos. La concentración del ADN recogido se midió con un espectrofotómetro UV a 260 nm.

5 Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene la secuencia genómica de la cepa FGSC987 de *Neurospora crassa* que codifica un polipéptido de la familia GH16 con actividad de endo- β -1,3-galactanasa

Sobre la base de la secuencia genómica de entrada
10 Q7RZX8 en Swissprot que figura como una proteína GH16 predicha derivada de la secuencia genómica de *Neurospora crassa* (Broad Institute, Cambridge, MA, EE. UU.), se designaron dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos para ampliar por PCR el gen P24HN2 de la cepa FGSC987 de
15 *Neurospora crassa* a partir del ADN genómico preparado anteriormente. Se empleó un kit de clonación IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.) para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pDaul09 (documento WO 2005/042735).

20 F-P24HN2 (SEQ ID NO: 5)
5'-ACACAACTGGGGATCCACC**ATGAGGAGGTCCTTCCAACAACCC**-3'
R-P24HN2 (SEQ ID NO: 6)
5'-CCCTCTAGATCTCGAGTGGACATCTTGAAGGGACAACTCCT-3'

Las letras en negrita representan la secuencia del
25 gen. La secuencia subrayada es homóloga a los sitios de inserción de pDaul09.

Se empleó un MJ Research PTC-200 DNA Engine para llevar a cabo la reacción de PCR. Se utilizó un kit de PCR Phusion® High-Fidelity (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia)
30 para la amplificación por PCR. La reacción de PCR consistía

en 10 μ L de 5X tampón HF (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia),
1 μ L de dNTPs (10 mM), 0.5 μ L de ADN-polimerasa Phusion® (2
unidades/ μ L) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) 2 μ L del
cebador F-P24HN2 (2.5 μ M), 2 μ L del cebador R-P24HN2 (2.5
5 μ M), 2 μ L de ADN genómico de *Neurospora crassa* (100 ng/ μ L)
y 32.5 μ L de agua desionizada en un volumen total de 50 μ L.
Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 2
minutos; 35 ciclos cada uno a 98 °C durante 10 segundos, 60
°C durante 30 segundos y 72 °C durante 2 minutos; y 1 ciclo
10 a 72 °C durante 10 minutos. La muestra se mantuvo
posteriormente a 12 °C hasta que se retiró de la máquina de
PCR.

Los productos de reacción se aislaron mediante
electroforesis en gel de agarosa al 1.0% utilizando base
15 Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM, tampón de EDTA disódico
(TAE) 1 mM, en la cual se extrajo una banda del producto de
1077 pb del gel y se purificó utilizando un kit de
purificación de ADN de PCR y bandas de gel GFX® Illustra
(GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Dinamarca) de
20 acuerdo con las instrucciones del fabricante. A
continuación el fragmento se clonó en pDaul09 digerido con
Bam HI y *Xho* I utilizando el kit de clonación IN-FUSION™
para obtener el plásmido pP24HN2. La clonación del gen
P24HN2 en pDaul09 digerido con *Bam* HI-*Xho* I dio lugar a la
25 transcripción del gen P24HN2 de *Neurospora crassa* bajo el
control de un promotor doble NA2-tpi. NA2-tpi es un
promotor modificado a partir del gen que codifica la alfa-
amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que la secuencia
líder sin traducir se reemplazó con una secuencia líder sin

traducir del gen que codifica la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

El protocolo de clonación se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit de clonación IN-FUSION™ para
5 generar un constructo P24HN2 GH16. El plásmido tratado y el inserto se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se colocaron en placas LB suplementadas con
10 0.1 mg de ampicilina por mL. Después de incubar a 37 °C durante toda la noche, se observaron colonias en desarrollo bajo selección en las placas LB con ampicilina. Se cultivaron dos colonias transformadas con el constructo P24HN2 GH16 en medio LB suplementado con 0.1 mg de
15 ampicilina por mL y el plásmido se aisló con un kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos aislados se secuenciaron con cebadores del vector y cebadores específicos para el gen P24HN2 con
20 el fin de determinar un clon de la expresión del plásmido representativo que estuviera exento de errores de la PCR.

Caracterización de la secuencia genómica de *Neurospora crassa* FGSC987 que codifica un polipéptido GH16 con actividad de endo- β -1,3-galactanasa

25 La secuenciación del ADN del clon genómico de P24HN2 GH16 de *Neurospora crassa* FGSC987 se realizó con un secuenciador de ADN automático, modelo 3700 de Applied Biosystems utilizando la versión 3.1 de la química de terminadores BIG-DYE™ (Applied Biosystems, Inc., Foster
30 City, CA, EE. UU.) y la estrategia del paseo con cebador

(*primer walking*). Los datos de la secuencia de nucleótidos se analizaron para determinar la calidad y se compararon todas las secuencias entre sí con la ayuda del *software* PHRED/PHRAP (Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. 5 UU.).

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen P24HN2 de *Neurospora crassa* se muestran en la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8, respectivamente. La secuencia codificante tiene 1025 pb que 10 incluyen el codón de parada y está interrumpida por dos intrones. La proteína predicha codificada tiene 265 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 27 residuos. La proteína madura predicha 15 contiene 238 aminoácidos con una masa molecular predicha de 26 kDa y un pH isoeléctrico de 9.3.

Se determinó una alineación global por pares comparativa de las secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, 20 *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) con una penalización por la apertura de un hueco de 10, una penalización por la extensión del hueco de 0.5 y la matriz EBLOSUM62. La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Neurospora crassa* que codifica el polipéptido 25 P24HN2 GH16 con actividad de endo- β -1,3-galactanasa comparte una identidad del 97% (excluyendo los huecos) respecto a la secuencia de aminoácidos deducida de una proteína de la familia GH16 de *Neurospora tetrasperma* sin caracterizar putativa (número de acceso a SWISSPROT: 30 F8MMR0).

Expresión de la endo- β -1,3-galactanasa GH16 de *Neurospora crassa* (GALACTANASA3)

El plásmido de expresión pP24HN2 se transformó en MT3568 de *Aspergillus oryzae*. El MT3568 de *Aspergillus*
5 *oryzae* es un derivado con la AMDS (acetamidasa) interrumpida de JaL355 (WO 02/40694) en el que se restauró la auxotrofia de pyrG en el proceso de inactivación del gen de la acetamidasa (AMDS) de *Aspergillus oryzae*. Se preparan protoplastos de MT3568 de acuerdo con el método de la
10 Patente Europea N.º 0238023, páginas 14-15, que se incorporan a la presente por referencia.

Los transformantes se purificaron en placas de selección de sacarosa COVE mediante conidios de un único tipo antes de esporularlos en placas PDA. La producción del
15 polipéptido GH16 de *Neurospora crassa* por parte de los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo de cultivos estacionarios en 96 pocillos profundos de 1 mL a 30 °C en medio YP+ 2% de glucosa. La expresión se verificó en un gel de 48 pocillos para SDS-PAGE al 8% E-
20 Page (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) mediante tinción de Coomassie. Se seleccionó un transformante para los estudios posteriores y se denominó *Aspergillus oryzae* 90.1.

Para la producción a escala mayor, se esparcieron esporas de *Aspergillus oryzae* 90.1 sobre una placa PDA y se
25 incubaron durante 5 días a 37 °C. La placa de esporas confluentes se lavó dos veces con 5 mL de TWEEN® 20 al 0.01% para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de esporas se utilizó a continuación para inocular quince matraces de 500 mL que contenían 150 mL de
30 medio Dap-4C. El cultivo se incubó a 30 °C con agitación

constante a 100 rpm. El cuarto día después de la inoculación, el caldo de cultivo se recogió por filtración a través de un filtro PES de 0.2 μm MF75 Supor MachV superior de rosca (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda correspondiente a la proteína GH16 de aproximadamente 26 kDa. La identidad de la banda prominente como el polipéptido GH16 de *Neurospora crassa* se verificó mediante secuenciación peptídica.

10 Método alternativo para producir la endo- β -1,3-galactanasa GH16 de *Neurospora crassa* (GALACTANASA3)

Sobre la base de la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID NO: 7, se puede obtener un gen sintético recurriendo a diversos proveedores tales como el Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Alemania) o DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, EE.UU.). El gen sintético se puede diseñar de modo que incorpore secuencias de ADN adicionales, tales como sitios de restricción o regiones de recombinación homóloga, para facilitar la clonación en un vector de expresión.

Utilizando los dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos F-P24HN2 y F-P24HN2 descritos anteriormente, se puede utilizar una simple reacción de PCR para amplificar el marco de lectura completo del gen de la SEQ ID NO: 7. Posteriormente, el gen puede se puede clonar en un vector de expresión, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, y se puede expresar en una célula huésped, por ejemplo, en *Aspergillus oryzae*, tal como se ha descrito anteriormente.

Purificación de la endo- β -1,3-galactanasa de *Neurospora crassa* (GALACTANASA3)

El caldo de cultivo celular recogido de *Neurospora crassa* se suplementó con sulfato de amonio 1.5 M hasta una
5 concentración final de 1.5 M y el pH se ajustó a 8. A continuación, la muestra se cargó en una columna hidrófoba (lecho empacado de perlas de butil Toyo; gradiente: 0-100% de B en 10 volúmenes de columna; tampón A: Mes 50 mM y sulfato de amonio 1.5 M; tampón B: Mes 50 mM). La SDS-PAGE
10 (condiciones reductoras) confirmó que la galactanasa no se eluyó a través de la columna en la fracción correspondiente al flujo que atravesó la columna o de lavado. Sobre la base de la SDS-PAGE, las fracciones que contenían proteínas con el PM esperado de 28.9 kDa (fracciones 34-48) se
15 combinaron, se concentraron y se reemplazó su tampón por un tampón de acetato de sodio 20 mM y pH 6.5 mediante centrifugación en una membrana con un PMNL de 3kDa de una columna Vivaspin (3000 x g de centrifugación giratoria).

Ejemplo 4. Clonación, expresión y purificación de la
20 **exo- β -1,3-galactanasa GH43 de *Irpex lacteus* (GALACTANASA4)**

Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene la secuencia de ADNc de una cepa de *Irpex lacteus* que codifica un polipéptido de la familia GH43 con actividad de exo- β -1,3-galactanasa

25 Sobre la base de la secuencia de nucleótidos EMBL:AB461394, se obtuvo un gen sintético P24QQC (SEQ ID NO: 9) recurriendo a GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) que codificaba el ADNc de la exo-beta-1,3-galactanasa de *Irpex lacteus* con sitios de restricción BamHI y XhoI

adicionales para facilitar la clonación en un vector de expresión.

El constructo de GeneArt que contenía P24QQC se trató con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, y los productos de reacción se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% utilizando base Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM, tampón de EDTA disódico (TAE) 1 mM, en la cual se extrajo una banda del producto de 1360 pb del gel y se purificó utilizando un kit de purificación de ADN de PCR y bandas de gel GFX® ILLUSTRATE® (GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación el fragmento se clonó en pDaul09 digerido con Bam HI y Xho I utilizando el kit de clonación IN-FUSION™ para obtener el plásmido pP24QQC. La clonación del gen P24QQC en pDaul09 digerido con Bam HI-Xho I dio lugar a la transcripción del gen P24QQC de *Irpex lacteus* bajo el control de un promotor doble NA2-tpi. NA2-tpi es un promotor modificado a partir del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que la secuencia líder sin traducir se reemplazó con una secuencia líder sin traducir del gen que codifica la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

El protocolo de clonación se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit de clonación IN-FUSION™ para generar un constructo P24QQC GH43. El plásmido tratado y el inserto se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se colocaron en placas LB suplementadas con

0.1 mg de ampicilina por mL. Después de incubar a 37 °C durante toda la noche, se observaron colonias en desarrollo bajo selección en las placas LB con ampicilina. Se cultivaron dos colonias transformadas con el constructo P24QQC GH43 en medio LB suplementado con 0.1 mg de ampicilina por mL y el plásmido se aisló con un kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los plásmidos aislados se secuenciaron con cebadores del vector y cebadores específicos para el gen P24QQC con el fin de determinar un clon de la expresión del plásmido representativo que estuviera exento de errores de la PCR.

Caracterización de la secuencia de ADNc de *Irpex lacteus* que codifica un polipéptido GH43 con actividad de exo- β -1,3-galactanasa

La secuenciación del ADN del clon de ADNc de P24QQC GH43 de *Irpex lacteus* se realizó con un secuenciador de ADN automático, modelo 3700 de Applied Biosystems utilizando la versión 3.1 de la química de terminadores BIG-DYE™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE. UU.) y la estrategia del paseo con cebador (*primer walking*). Los datos de la secuencia de nucleótidos se analizaron para determinar la calidad y se compararon todas las secuencias entre sí con la ayuda del software PHRED/PHRAP software (Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. UU.).

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen P24QQC de *Irpex lacteus* se muestran en la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, respectivamente. La secuencia codificante tiene 1347 pb que incluyen el codón de parada. La proteína predicha

codificada tiene 448 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 20 residuos. La proteína madura predicha contiene 428 aminoácidos con una masa molecular predicha de 46 kDa y un pH isoeléctrico de 6.1. Los aminoácidos 337-448 constituyen un CBM35 putativo.

Expresión de la exo- β -1,3-galactanasa GH43 de *Irpex lacteus* (GALACTANASA4)

El plásmido de expresión pP24QQC se transformó en MT3568 de *Aspergillus oryzae*. El MT3568 de *Aspergillus oryzae* es un derivado con la AMDS (acetamidasa) interrumpida de JaL355 (WO 02/40694) en el que se restauró la auxotrofia de pyrG en el proceso de inactivación del gen de la acetamidasa (AMDS) de *Aspergillus oryzae*. Se preparan protoplastos de MT3568 de acuerdo con el método de la Patente Europea N.º 0238023, páginas 14-15, que se incorporan a la presente por referencia.

Los transformantes se purificaron en placas de selección de sacarosa COVE mediante conidios de un único tipo antes de esporularlos en placas PDA. La producción del polipéptido GH43 de *Irpex lacteus* por parte de los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo de cultivos estacionarios en 96 pocillos profundos de 1 mL a 30 °C en medio YP+ 2% de glucosa. La expresión se verificó en un gel de 48 pocillos para SDS-PAGE al 8% E-Page (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) mediante tinción de Coomassie. Se seleccionó un transformante para los estudios posteriores y se denominó *Aspergillus oryzae* 433.1.

Para la producción a escala mayor, se esparcieron esporas de *Aspergillus oryzae* 433.1 sobre una placa PDA y se incubaron durante 5 días a 37 °C. La placa de esporas confluentes se lavó dos veces con 5 mL de TWEEN® 20 al 0.01% para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de esporas se utilizó a continuación para inocular quince matraces de 500 mL que contenían 150 mL de medio Dap-4C (documento WO 2012/103350). El cultivo se incubó a 30 °C con agitación constante a 100 rpm. El cuarto día después de la inoculación, el caldo de cultivo se recogió por filtración a través de un filtro PES de 0.2 µm MF75 Supor MachV superior de rosca (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda correspondiente a la proteína GH43 de aproximadamente 46 kDa. La identidad de la banda como el polipéptido GH43 de *Irpex lacteus* se verificó mediante secuenciación peptídica.

Purificación de la exo-β-1,3-galactanasa GH43 de *Irpex lacteus*

El caldo filtrado se ajustó a pH 7.5 y se filtró sobre un filtro PES de 0.22 µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware, # de catálogo 595-4520). A continuación, se añadió sulfato de amonio 1.8 M al filtrado. El filtrado se cargó en una columna de flujo rápido Phenyl Sepharose™ 6 (alto nivel de sustitución) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada con sulfato de amonio 1.8 M, HEPES 25 mM pH 7.5. Tras lavar con sulfato de amonio 1.0 M, las proteínas adheridas se eluyeron en tandas con HEPES 25 mM pH 7.5. Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones se combinaron y se aplicaron a una

columna Sephadex™ G-25 (medio) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada en HEPES 25 mM pH 7.5. Las fracciones se aplicaron a una columna SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada en HEPES
5 25 mM pH 7.5 y las proteínas adheridas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-1000 mM en 20 VC. La proteína no se adhirió a la columna y el eluato se concentró utilizando ultrafiltración en un filtro PES 20 Vivaspin con un PMNL de 30 000 (Sartorius Stedim Biotech
10 GmbH, Goettingen, Alemania), y el concentrado se analizó por SDS-PAGE.

Ejemplo 5 Clonación, expresión y purificación de la endo- β -1,4-galactanasa GH53 de *Ignisphaera aggregans* (BETA-1,4-GALACTANASA)

15 Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene la secuencia de ADN de *Ignisphaera aggregans* que codifica un polipéptido de la familia GH53 con actividad de endo- β -1,4-galactanasa

Sobre la base de la secuencia de nucleótidos UNIPROT:E0SSW8, se generó un gen con codones optimizados
20 para la expresión de *A. oryzae* que codificaba una endo- β -1,4-galactanasa truncada en el extremo C (SEQ ID NO: 11) basándose en un algoritmo similar desarrollado por Gustafsson *et al.*, 2004*. El gen sintético (SEQ ID NO: 11),
25 que abarca los nucleótidos comprendidos entre el 1 y el 1221 de la secuencia de nucleótidos UNIPROT:E0SSW8, se obtuvo recurriendo a GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), el cual codificaba el ADN de la endo- β -1,4-galactanasa truncada en el extremo C de *Ignisphaera*
30 *aggregans* con un sitio de restricción BamHI en 5', un sitio

de restricción HindIII en 3' respecto al codón de parada, y una secuencia consenso de Kozac (CACCC) situada entre el codón de inicio y el sitio de restricción BamHI.

El constructo de GeneArt que contenía el gen sintético
5 de la endo- β -1,4-galactanasa se trató con las enzimas de restricción BamHI e HindIII, y los productos de reacción se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% utilizando base Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM, tampón de EDTA disódico (TAE) 1 mM, en la cual se extrajo una
10 banda del producto de 1239 pb del gel y se purificó utilizando un kit de purificación de ADN de PCR y bandas de gel GFX® ILLUSTRATE® (GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento de 1239 bp se clonó posteriormente en pDau109
15 (WO 2005/042735) digerido con *Bam*HI e *Hind*III utilizando una ADN-ligasa de T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). El pDau109 digerido con *Bam*HI-*Hind*III y el fragmento de *Bam*HI/*Hind*III que contiene la secuencia que codifica la endo- β -1,4-galactanasa se mezclaron en una proporción molar
20 de 1:3 (es decir, una proporción en masa de aproximadamente 2.5:1 o 20 ng:50 ng) y se ligaron con 50 U de ADN-ligasa de T4 en 1X tampón para la ADN-ligasa de T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) con ATP 1 mM a 16 °C durante toda la noche de acuerdo con las instrucciones del
25 fabricante.

La clonación del gen sintético de la endo- β -1,4-galactanasa en pDau109 digerido con *Bam*HI-*Hind*III dio lugar a la transcripción del gen de la endo- β -1,4-galactanasa de *Ignisphaera aggregans* bajo el control de un promotor doble
30 NA2-tpi. NA2-tpi es un promotor modificado a partir del gen

que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que la secuencia líder sin traducir se reemplazó con una secuencia líder sin traducir del gen que codifica la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

5 El plásmido tratado y el inserto se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se colocaron en placas LB suplementadas con 0.1 mg de ampicilina por mL. Después de
10 incubar a 37 °C durante toda la noche, se observaron colonias en desarrollo bajo selección en las placas LB con ampicilina.

La inserción del gen de la endo- β -1,4-galactanasa de *Ignisphaera aggregans* en pDau109 se verificó mediante PCR
15 en colonias tal como se describe a continuación utilizando los siguientes cebadores.

Cebador F-pDau109 (SEQ ID NO: 13):

5'-CCCTTGTCGATGCGATGTATC-3'

Cebador R-pDau109 (SEQ ID NO: 14):

20 5'-ATCCTCAATTCCGTCGGTCGA-3'

Se utilizó una mezcla 1.1X REDDYMIX® Master (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) para la amplificación por PCR. La reacción de PCR estaba constituida por 10 μ L de mezcla 1.1X REDDYMIX® Master, 0.5
25 μ L de cebador F-pDau109 (10 μ M) y 0.5 μ L de cebador R-pDau109 (10 μ M). Se utilizó un palillo para transferir una cantidad pequeña de células a la solución de PCR. Se realizó la PCR con un PTC-200 DNA Engine programado para 1 ciclo a 94 °C durante 2 minutos y 30 segundos; 30 ciclos
30 cada uno a 94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30

segundos, y 68 °C durante 1 minuto y 30 segundos; y 1 ciclo a 68 °C durante 7 minutos. La muestra se mantuvo posteriormente a 10 °C hasta que se retiró de la máquina de PCR.

5 Los productos de la reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% utilizando tampón TAE, en la cual se observó una banda del producto de PCR de 1541 pb lo cual confirma la inserción de la secuencia que codifica la endo- β -1,4-galactanasa de
10 *Ignisphaera aggregans* en pDaul09.

Se cultivó un transformante de *E. coli* que contenía el constructo GH53 de la endo- β -1,4-galactanasa de *Ignisphaera aggregans* en medio LB suplementado con 0.1 mg de ampicilina por mL y el plásmido se aisló con un kit QIAprep Spin
15 Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El plásmido se denominó pBETA-1,4-GALACTANASA.

Caracterización de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido GH53 de la endo- β -1,4-galactanasa de
20 *Ignisphaera aggregans*

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen de la endo- β -1,4-galactanasa de *Ignisphaera aggregans* se muestran en la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12, respectivamente. La secuencia codificante
25 tiene 1224 pb que incluyen el codón de parada. La proteína predicha codificada tiene 407 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 26 residuos. La proteína madura predicha contiene 381 aminoácidos con una

masa molecular predicha de 43 kDa y un pH isoeléctrico de 4.8.

Expresión de la endo- β -1,4-galactanasa GH53 de *Ignisphaera aggregans* (BETA-1,4-GALACTANASA)

5 El plásmido de expresión se transformó en MT3568 de *Aspergillus oryzae*. El MT3568 de *Aspergillus oryzae* es un derivado con la AMDS (acetamidasa) interrumpida de JaL355 (WO 02/40694) en el que se restauró la auxotrofia de pyrG en el proceso de inactivación del gen de la acetamidasa
10 (AMDS) de *Aspergillus oryzae*. Se preparan protoplastos de MT3568 de acuerdo con el método de la Patente Europea N.º 0238023, páginas 14-15, que se incorporan a la presente por referencia.

Los transformantes se purificaron en placas de
15 selección de sacarosa COVE mediante conidios de un único tipo antes de esporularlos en placas PDA. La producción del polipéptido GH53 de *Ignisphaera aggregans* por parte de los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo de cultivos estacionarios en 96 pocillos profundos
20 de 1 mL a 30 °C en medio YP+ 2% de glucosa. La expresión se verificó en un gel de 48 pocillos para SDS-PAGE al 8% E-Page (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) mediante tinción de Coomassie. Se seleccionó un transformante para los estudios posteriores y se denominó KHJN0032-3.

25 Para la producción a escala mayor, se esparcieron esporas de KHJN0032-3 sobre una placa PDA y se incubaron durante 5 días a 37 °C. La placa de esporas confluentes se lavó dos veces con 5 mL de TWEEN® 20 al 0.01% para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de
30 esporas se utilizó a continuación para inocular quince

matraces de 500 mL que contenían 150 mL de medio Dap-4C (documento WO 2012/103350). El cultivo se incubó a 30 °C con agitación constante a 100 rpm. El quinto día después de la inoculación, el caldo de cultivo se recogió por
5 filtración a través de un filtro PES de 0.2 µm MF75 Supor MachV superior de rosca (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda correspondiente a la proteína GH43 de aproximadamente 43 kDa.

10 Purificación de la endo-β-1,4-galactanasa GH53 de *Ignisphaera aggregans* (BETA-1,4-GALACTANASA)

El caldo filtrado se ajustó a pH 7.0 y se filtró sobre un filtro PES de 0.22 µm (Nalge Nunc International, Nalgene labware, # de catálogo 595-4520). A continuación, se añadió
15 sulfato de amonio 1.0 M al filtrado. El filtrado se cargó en una columna de flujo rápido Phenyl Sepharose™ 6 (alto nivel de sustitución) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada con sulfato de amonio 1.0 M, HEPES 25 mM pH 7.0. Las proteínas adheridas se eluyeron en tandas con
20 HEPES 25 mM pH 7.0 seguido de EtOH al 50%. Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones se combinaron y se aplicaron a una columna Sephadex™ G-25 (medio) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada en HEPES 25 mM pH 7.0. Las fracciones se
25 aplicaron a una columna SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada en HEPES 25 mM pH 7.0 y las proteínas adheridas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-500 mM. Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE.

30 **Ejemplo 6. Síntesis de sustratos de β-1,3-galactano**

Se utilizaron carbohidratos diferentes como sustratos para caracterizar las β -1,3-galactanasas:

a) Goma arábica

Comercializada (Merck). Polisacárido complejo compuesto por D-galactosa (44%); L-arabinosa (24%); ácido D-glucurónico (14.5%); L-ramnosa (13%); ácido 4-O-metil-D-glucurónico (1.5%). Las galactosas unidas por enlaces β -1,3 forman el esqueleto.

B) Goma arábica tratada con ácido

La goma arábica se trató con TFA 0.1 M durante 1 h a 90 °C. La reacción se detuvo ajustando el pH a 7 con NaOH 4 M. La muestra se redujo posteriormente con NaBH₄ (2 mg por mg de polisacárido) durante 3 h a temperatura ambiente y después se sometió a diálisis durante toda la noche. El sólido se recuperó mediante liofilización. La TLC confirmó la disminución de arabinosa en el polisacárido.

c) Goma arábica degradada de Smith

La goma arábica se degradó de acuerdo con el método de degradación de Smith descrito en la bibliografía (Tsumuraya *et al.*, *Carbohydrate Research*, 1984, 134, 215-228). Las cadenas laterales de la goma arábica (arabinosa y galactosas unidas por enlaces β -1,6) se escindieron primero con peryodato (el exceso fue destruido por etilenglicol), a continuación se redujeron con borohidruro sódico y se hidrolizaron con ácido diluido en condiciones suaves. El procedimiento se repitió 3 veces. La RMN confirmó la disminución de arabinosa y galactosas unidas por enlaces β -1,6 de las cadenas laterales. La oxidación de la goma arábica (hasta 5 g) con metaperyodato de sodio 50 mM (hasta 500 mL) se llevó a cabo en la oscuridad a 4 °C durante 48-

96 h. La reacción se detuvo mediante la adición de etilenglicol (hasta 4 mL) y se continuó agitando durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la diálisis durante toda la noche (PMNL de 3.5 kDa, agua destilada), se realizó una reducción del producto oxidado con NaBH₄ (2 mg por mg de polisacárido) durante 3 h. La reacción se detuvo ajustando el pH a 7 con AcOH al 10% y sometiéndola a diálisis durante toda la noche. Tras evaporar hasta un volumen pequeño, la muestra se hidrolizó con TFA diluido (0.5 M) en condiciones suaves durante 24 h a temperatura ambiente. Tras evaporar la mayor parte del ácido y ajustar el pH a 7 mediante la adición de NaOH 1 M, el sustrato se hizo precipitar en 3 volúmenes de etanol, y se recuperó mediante centrifugación y liofilización. El procedimiento se repitió 3 veces para producir goma arábica degradada de Smith triple.

Ejemplo 7: Ensayo de azúcares reductores (ensayo PAH-BAH) para cuantificar la actividad de β -1,3-galactanasa

La actividad de la β -1,3-galactanasa se determinó en dos pasos. El primer paso es un paso enzimático en el que se hidrolizan sustratos de tipo carbohidrato mediante la acción catalítica de la galactanasa. El segundo paso es un paso de detección no enzimático en el que el grupo aldehído de los mono- u oligosacáridos se reduce para formar un compuesto de color amarillo.

a) Ensayo de actividad - degradación de polisacáridos

• Se mezclaron 50 μ L de una solución enzimática de 0.08 g/L (agua MilliQ para la muestra utilizada como blanco) con 50 μ L de tampón para el ensayo de actividad (tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 5) y 50 μ L de

solución de sustrato (5-10 g/L disueltos en agua MilliQ) en una placa PCR-MTP de 96 pocillos

- La reacción se llevó a cabo a 40 °C durante 45 minutos en una máquina de PCR

5

- La reacción se detuvo aumentando la temperatura hasta 95 °C durante 10 minutos

b) Ensayo de actividad - detección de azúcares reductores (ensayo PAHBAH)

10

- Se diluyeron 25 µL de la muestra anterior con 100 µL de NaOH 1 M en una placa PCR-MTP de 96 pocillos nueva

- Se añadieron 75 µL de una solución de parada fresca en el pocillo (hidrazida del ácido 4-hidroxibenzoico disuelta en 15 g/L en 2% (p/v) NaOH y 5% (p/v) de K-Na-tartrato)

15

- La reacción se incubó 10 minutos a 70 °C

- Se midió la absorbancia del punto final a 405 nm

Cálculo de la actividad:

Se creó una curva estándar para azúcares reductores con diferentes concentraciones de galactosa comprendidas entre 0.05 g/L y 3 g/L siguiendo el procedimiento anterior. Se obtuvo la siguiente ecuación estándar: cantidad de azúcar liberado (medida como µg de equivalentes de galactosa): $m_{eq\ gal} = (A_{405} - 0.0061)/0.016$. La observancia observada del blanco se sustrajo siempre de la absorbancia obtenida para poder comparar todos los resultados. La cantidad de azúcares reductores liberados después de la reacción (45 minutos a 40 °C) se calculó de acuerdo con la curva estándar. La actividad enzimática (%) se calculó como el porcentaje de equivalentes de galactosa liberados en

25

comparación con la masa total del sustrato polisacarídico (Tabla 1).

Ejemplo: Para un ensayo con 5 g/L de goma arábica degradada de Smith, la cantidad total de polisacárido es de 250 μ g. Después de la reacción en dos pasos, una absorbancia de la muestra de 2.26 con una absorbancia del blanco de 0.16 corresponde a 131 μ g de equivalentes de galactosa para obtener una actividad observada de un 52%.

Tabla 1. Actividad relativa (% de equivalentes de extremo reductor de galactosa liberados por masa del sustrato) para degradar goma arábica y productos relacionados

Enzimas	Goma arábica degradada de Smith	Goma arábica tratada con ácido	Goma arábica
GALACTANASA1	52.7	9.2	2.6
GALACTANASA2	43.6	0.5	0.2
GALACTANASA3	46.2	9.3	2.7
GALACTANASA4	25.6	17.7	2.4

La disminución de las cadenas laterales en el sustrato incrementa la actividad de las galactanasas.

Ejemplo 8: Ensayo por TLC para detectar la actividad de β -1,3-galactanasa

La mezcla de reacción inactivada con calor (Ejemplo 7a) se analizó por TLC (gel de sílice 60 F254) para caracterizar las enzimas en lo que respecta a la actividad endo y exo. El eluyente fue butan-1-ol, etanol y agua (5/5/4 v/v). Los compuestos de referencia fueron arabinosa ($Rf_{ara} = 0.56$); galactosa ($Rf_{Gal} = 0.53$); β -1,4-galactobiosa ($Rf_{Gal2} = 0.50$) y β -1,6-galactotetraosa ($Rf_{Gal4} = 0.44$). El

producto de reacción esperado β -1,3-galactobiosa se esperaba que migrara con un *Rf* similar al de la β -1,4-galactobiosa, y la β -1,3-galactotetraosa se asumió que migraba con un *Rf* similar al de la β -1,6-galactotetraosa.

5 Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Actividad relativa (% de equivalentes de extremo reductor de galactosa liberados por masa de sustrato) y composición del producto para la degradación del β -1,3-galactano (goma arábica degradada de Smith
10 triple) por 4 galactanasas

Goma arábica degradada de Smith				
Enzimas	GALACTANAS A1	GALACTANAS A2	GALACTANAS A3	GALACTANAS A4
% de actividad	52.7	43.6	46.2	25.6
Arabinosa	-	-	-	-
Galactosa	++	++	++	+++
Galactobiosa	+++	+++	+++	+
Galactotetraosa	++	++	++	-

La liberación de arabinosa, galactosa, galactobioasa y galactotetraosa se detectó por TLC. (-) quiere decir que no hubo mancha en la placa y (+), (++) , (+++) indican una mancha con intensidad diferente (cuantas más +, más intensa es la mancha). La composición del producto justifica la
15 actividad fundamentalmente endo de la GALACTANASA1, GALACTANASA2 y GALACTANASA3, y la actividad exo de la GALACTANASA4.

20 **Ejemplo 9: pH óptimo y estabilidad frente al pH de las galactanasas**

La estabilidad frente al pH de la GALACTANASA1 y GALACTANASA4 (0.08 g/L) se evaluó determinando la actividad enzimática mediante el ensayo de azúcares reductores (Ejemplo 7) tras la incubación con una solución de sustrato (2.5 g/L de goma arábiga degradada de Smith o 15 g/L de goma arábiga tratada con ácido) durante 45 minutos a 40 °C a valores de pH seleccionados en el intervalo de 1.5-10. La actividad de las galactanasas se evaluó justo después de ajustar el pH (t0) o después de incubar la enzima a un pH determinado durante 24 h en el refrigerador antes de añadir el sustrato (24 h) (Tablas 3 y 4). Se midió el pH antes y después de la reacción para confirmar que el pH era constante durante la incubación.

Tabla 3: Composición del tampón para el ensayo de actividad, el pH se ajustó de acuerdo con el pH deseado

pH	Tampón empleado
1.5; 2; 2.5	KCl 60 mM/HCl
3; 3.6; 3.9; 4.3; 4.7; 5; 5.2; 5.7	Acetato de sodio 20 mM
6	Mes 50 mM
7 y 8	HEPES 50 mM
9 y 10	Tris HCl 50 mM

Tabla 4: Actividad observada (%) a valores de pH diferentes

Sustrato	Actividad de GALACTANASA1		Actividad de GALACTANASA4			
	Goma arábiga degradada de Smith	Goma arábiga tratada con ácido	Goma arábiga degradada de Smith	Goma arábiga tratada con ácido		
pH	t0	24 h	t0	t0	24 h	t0

1.5	0.9	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0
2	27.4	1.5	2.3	1.6	0.6	1.8
2.5	40.2	31.4	2.6	6.1	2.0	8.8
3	42.5	32.9	6.8	13.6	8.3	17.1
3.6	42.6	27.2	10.0	19.1	8.5	18.3
3.9	44.5	37.6	10.2	19.2	9.4	18.0
4.3	40.9	45.1	9.7	19.5	9.4	17.2
4.6	43.6	43.0	9.5	18.8	8.0	16.4
5.1	45.7	38.4	8.3	19.3	8.3	13.9
5.7	40.8	36.9	7.5	16.6	8.6	9.1
6	39.4	40.7	6.8	15.2	8.2	8.6
7	36.3	39.8	3.3	9.5	4.5	2.1
8	19.1	20.9	0.2	0.5	0.1	0.0
9	2.6	2.3	0.0	0.8	0.2	0.0
10	0.0	0.5	0.0	0.4	0.1	0.0

**Ejemplo 10: Termoestabilidad de las galactanasas
evaluada por DSC**

Se evaluaron las termoestabilidades de la GALACTANASA1, GALACTANASA2, GALACTANASA3 y GALACTANASA4 mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) en la solución tampón adecuada (acetato de sodio 20 mM pH 6.5). La temperatura correspondiente al ápice del pico en el termograma se anotó como el punto medio de transición térmica (T_m (°C)) para las enzimas.

10 Tabla 5: Temperaturas del punto medio

Enzima	Temperatura °C
GALACTANASA1	66.2
GALACTANASA2	58.0
GALACTANASA3	62.3
GALACTANASA4	43.1

Ejemplo 11: Termoestabilidad de las galactanasas evaluada mediante el ensayo de azúcares reductores a temperaturas diferentes

Se evaluaron las termoestabilidades de la GALACTANASA1 y GALACTANASA4 (0.04 g/L) determinando la actividad enzimática mediante el ensayo de azúcares reductores (Ejemplo 7) después de incubar con 2.5 g/L de solución de sustrato (goma arábiga degradada de Smith) durante 45 minutos a pH 5 a temperaturas seleccionadas en el intervalo de 20 °C-90 °C. La enzima se añadió al ensayo después de la mezcla (tampón y solución de sustrato) se calentó hasta la temperatura seleccionada. Se observaron temperaturas óptimas de 60 °C (GALACTANASA1) y 30 °C (GALACTANASA4) (Tabla 6).

Tabla 6: Actividad observada (%) a temperaturas diferentes

Temperatura (°C)	Actividad de GALACTANASA1	Actividad de GALACTANASA4
20	44.1	19.9
30	42.9	20.2
40	41.5	20.2
50	38.0	18.5
60	50.1	16.6
70	44.8	13.4
80	47.9	4.5
90	17.3	0.3

Ejemplo 12: Pretratamiento de material de café

Se añadieron 800 mL de agua hirviendo a 155 g de granos de café arábigo tostados y molidos con un tamaño de partícula de 0.5 mm. Tras incubar en un baño de agua a 95 °C

durante 30 min con mezcla manual cada 5 min, la suspensión se enfrió a temperatura ambiente. Tras un filtrado al vacío inicial a través de un filtro Whatman GF/D, Ø 150 mm, el café consumido insoluble sobre el filtro se lavó añadiendo
5 500 - 1000 mL de agua MilliQ. El café consumido se retiró del filtro y se esparció sobre una lámina grande y se dejó secar durante toda la noche. Esta fracción se denominó posos de café consumido y se utilizó en el Ejemplo 14.

Los posos de café consumido se desgrasaron aún más con
10 butanol saturado con agua. La fracción del butanol se separó por filtración y los posos de café consumido desgrasados se secaron al vacío antes de usarlos. Estos posos de café consumido desgrasados se utilizaron en el Ejemplo 13.

15 **Ejemplo 13: Hidrólisis catalizada por enzimas de posos de café consumido desgrasados**

a) Extracción enzimática

Se incubaron posos de café consumido desgrasados producidos de acuerdo con el Ejemplo 12 (10% en peso) con
20 agua y una enzima diluida de forma adecuada (para obtener una concentración de reacción final de 0.05 g/L para las galactanasas y un 0.2% en volumen para Mannaway® 25L a 40°C (para la GALACTANASA1-4) o a 80 °C (para la BETA-1,4-GALACTANASA). Se extrajeron muestras después de 2 y 24
25 horas, y la hidrólisis enzimática se detuvo de inmediato calentando las muestras a 100 °C durante 10 min. Tras centrifugar (10,000×g, 10 min) y filtrar a través de un filtro de 0.22 µm, los sobrenadantes se siguieron analizando para determinar su materia seca, composición de
30 carbohidratos y absorbancia. Los procedimientos se

realizaron por duplicado para todas las enzimas y un blanco (sin enzima).

b) Determinación de la materia seca

Se cuantificó el contenido de materia seca (MS) tras
 5 secar durante toda la noche a 110 °C los sobrenadantes de
 posos de café consumido tratados con enzima. El peso de la
 materia seca se dividió por el volumen añadido de
 sobrenadante y se calculó un valor de MS basado en los g/L.
 Las características del extracto basadas en la MS se
 10 resumen en la Tabla 7. El efecto sinérgico se calculó
 añadiendo la MS de los tratamientos enzimáticos
 individuales (tratamientos con β -1,3-galactanasa y
 mananasa) y sustrayendo un blanco, y a continuación
 dividiendo el valor observado por el valor teórico.

15 Tabla 7: Materia seca del extracto de posos de café
 consumido desgrasados después de diferentes tratamientos
 enzimáticos.

Tratamiento enzimático	Materia seca (g/L)		Efecto sinérgico (%)	
	2 h	24 h	2 h	24 h
	Sin enzima	1.5	2.4	-
Mannaway	3.0	7.0	-	-
GALACTANASA1	9.2	13.8	-	-
GALACTANASA2	3.6	7.2	-	-
GALACTANASA3	5.4	8.3	-	-
GALACTANASA4	5.2	7.7	-	-
Mannaway +				
GALACTANASA1	14.5	25.5	136	139
Mannaway +	7.9	15.9	154	135

GALACTANASA2				
Mannaway	+			
GALACTANASA3		10.6	18.3	153
Mannaway	+			142
GALACTANASA4		9.6	16.5	144
				134

El rendimiento de sólidos solubles fue sustancialmente superior cuando Mannaway se incubó junto con cualquiera de las β -1,3-galactanasas, en comparación con cuando las enzimas se incubaron solas. Con este sustrato y en las
5 condiciones investigadas, el efecto sinérgico varió entre un 134-154%.

Con el mismo montaje experimental pero con una temperatura superior (80°C), se incubó la BETA-1,4-GALACTANASA con posos consumidos desgrasados (Tabla 8). Sin
10 embargo, la adición de este tipo de galactanasa no ejerció ningún efecto significativo en las condiciones y dosis de enzimas aplicadas en el estudio de la presente.

Tabla 8: Materia seca del extracto de posos consumidos desgrasados después del tratamiento con una endo- β -1,4-galactanasa de *Ignisphaera aggregans*.
15

Tratamiento enzimático	Materia seca (g/L)	
	2 h	24 h
Sin enzima	1.5	4.1
BETA-1,4- GALACTANASA	2.4	3.8

c) Análisis de carbohidratos

La composición de azúcares se analizó midiendo los monosacáridos libres en los sobrenadantes mediante

cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Los azúcares totales se analizaron por HPAEC-PAD después de la hidrólisis ácida en ácido trifluoroacético 2 M durante 2 h a 95 °C. Las muestras hidrolizadas con ácido se neutralizaron mediante una dilución inicial en NaOH 0.2 M. Los monosacáridos se cuantificaron después de diluciones adecuadas frente a una curva estándar de 5 puntos de arabinosa (Ara), galactosa (Gal), glucosa (Glc) y manosa (Man) en concentraciones de 0.002-0.02 g/L. Los resultados se pueden observar en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9: Monosacáridos libres en el extracto de posos de café consumido desgrasados después del tratamiento enzimático.

Tratamiento enzimático	Monosacáridos libres/MS (%)			
	2 h		24 h	
	Gal	Man	Gal	Man
Sin enzima	0	0	0	0
Mannaway	0	1	0	1
GALACTANASA1	4	0	6	0
GALACTANASA2	1	0	2	0
GALACTANASA3	1	0	1	0
GALACTANASA4	18	0	16	0
Mannaway +				
GALACTANASA1	2	0	3	1
Mannaway +				
GALACTANASA2	1	1	1	1
Mannaway +				
GALACTANASA3	1	0	1	1

Mannaway		+				
GALACTANASA4	9	1	8	1		

Los extractos del tratamiento con las enzimas de acción endo (Mannaway y GALACTANASA1, GALACTANASA2, GALACTANASA3) contenían cantidades relativamente bajas de monosacáridos, en contraste con el tratamiento con la galactanasa de acción exo (GALACTANASA4).

Tabla 10: Composición de azúcar total en el extracto de posos de café consumido desgrasados después del tratamiento enzimático. Monosacáridos en el sobrenadante después de la hidrólisis ácida.

Tratamiento enzimático	Monosacáridos totales/MS (%)							
	2 h				24 h			
	Ara	Gal	Glc	Man	Ara	Gal	Glc	Man
Sin enzima	0	13	0	26	8	8	8	25
Mannaway	0	7	7	46	3	9	3	46
GALACTANASA1	13	72	0	4	10	55	1	6
GALACTANASA2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	44	3	11
GALACTANASA3	11	55	0	7	10	48	2	7
GALACTANASA4	8	54	4	8	10	52	3	8
Mannaway + GALACTANASA1	8	40	1	30	7	35	1	38
Mannaway + GALACTANASA2	8	33	3	30	6	28	1	33
Mannaway + GALACTANASA3	8	36	2	30	7	31	1	36
Mannaway + GALACTANASA4	6	35	2	31	6	29	1	30

10 n.d. No determinado

La diferencia entre la galactosa libre y total representa el contenido de galactooligosacáridos en el extracto, y asimismo para los otros monosacáridos.

Tabla 11: Porcentaje de los sacáridos presentes como monosacáridos basado en el peso de los azúcares totales como monosacáridos.

Tratamiento enzimático	Monosacáridos libres/azúcares totales (%)	
	2 h	24 h
Sin enzima	0	1
Mannaway	2	2
GALACTANASA1	5	8
GALACTANASA2	n.d.	2
GALACTANASA3	1	2
GALACTANASA4	24	23
Mannaway +		
GALACTANASA1	3	5
Mannaway +		
GALACTANASA2	2	3
Mannaway +		
GALACTANASA3	1	2
Mannaway +		
GALACTANASA4	13	13

n.d. No determinado

d) Absorbancia

La absorbancia a 361 nm de las muestras se midió después de diluciones adecuadas de sobrenadantes y la alcalinización mediante al menos una dilución 1:10 en

Na₂CO₃ 0.2 M. Al dividir la absorbancia entre la MS (g/L) se obtuvo una medida de la calidad relacionada con el color liberado por la MS (Tabla 12). La galactanasa liberó más color por MS que Mannaway lo cual indica una liberación mejor de componentes con sabor que un tratamiento con Mannaway. Esto podría deberse a la captura de estos compuestos dentro de la matriz de galactano o debido a su presencia en complejos melanoidínicos liberados en el sobrenadante por las beta-1,3-galactanasas. La diferencia en el color liberado por los diferentes tratamientos enzimáticos también fue claramente visible en los extractos de café, de fácil detección a simple vista.

Tabla 12: Calidad del extracto. Absorbancia del extracto después de la alcalinización a 361 nm por materia seca.

Tratamiento enzimático	Absorbancia (A ₃₆₁ *L/g)		Color en el sobrenadante
	2 h	24 h	24 h
Mannaway	0.64	0.50	+
GALACTANASA1	0.77	0.89	+++
GALACTANASA2	1.05	0.92	++
GALACTANASA3	0.92	0.77	++
GALACTANASA4	0.85	0.90	++
Mannaway +			+++
GALACTANASA1	0.70	0.71	
Mannaway +			+++
GALACTANASA2	0.72	0.72	
Mannaway +			+++
GALACTANASA3	0.77	0.78	

Mannaway	+		+++
GALACTANASA4		0.68	0.87

d) Distribución del peso molecular

La distribución del peso molecular de los extractos individuales se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaños con un detector del índice de refracción. Un
 5 extracto con una masa molecular media superior contribuiría más a la viscosidad y a la sensación bucal que un extracto con una masa molecular promedio inferior. Este parámetro se utilizó, por lo tanto, como parámetro de calidad (Tabla 13). Las masas se determinaron utilizando un estándar de
 10 pululano de 342-210 000 Da así como maltotriosa, maltopentaosa y maltoheptaosa.

Tabla 13: Distribución del peso molecular de los extractos de café. Los porcentajes se basan en el área bajo la curva en los respectivos rangos de masa molecular. GP es
 15 el grado de polimerización, es decir, >GP5 se refiere a la fracción de oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 5. Todos los extractos enzimáticos tuvieron un peso molecular máximo inferior a 10 kDa.

Tratamiento enzimático	2 h			24 h		
	>GP 5	GP3- GP5	GP1- GP3	>GP 5	GP3- GP5	GP1- GP3
Sin enzima*	0%	0%	0%	88%	5%	7%
Mannaway	29%	52%	19%	51%	21%	27%
GALACTANASA1	84%	7%	9%	80%	8%	12%
GALACTANASA2	85%	7%	8%	84%	7%	9%
GALACTANASA3	90%	5%	5%	88%	6%	6%
GALACTANASA4	58%	14%	28%	60%	13%	27%
Mannaway	+ 70%	14%	16%	63%	18%	19%

GALACTANASA1						
Mannaway	+					
GALACTANASA2		66%	15%	19%	63%	18%
Mannaway	+					
GALACTANASA3		73%	12%	15%	67%	16%
Mannaway	+					
GALACTANASA4		52%	18%	30%	52%	20%

*Teóricamente, ningún extracto debería ser soluble de los posos de café consumido desgrasados sin enzima. Esto se observa después de 2 horas, pero después de 24 horas algunos azúcares se siguen liberando

5 **Ejemplo 14. Hidrólisis catalizada por enzimas de posos de café consumido**

Se incubaron posos de café consumido producidos de acuerdo con el Ejemplo 12 en una concentración final de un 10% en peso de materia seca en agua con Mannaway 25 L o una
 10 β -1,3-galactanasa (GALACTANASA1) en una concentración final de un 0.2% en volumen para Mannaway 25 L y 0.05 g/L para la GALACTANASA1, durante 2 y 24 h. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 40 °C con mezcla constante y se inactivaron a 95 °C durante 10 min.

15 Se midieron la materia seca, composición de carbohidratos, absorción a 361 nm y la distribución del peso molecular de los extractos individuales de acuerdo con el Ejemplo 13. Las características de los extractos se resumen en las Tablas 14-17.

20 Tabla 14: Composición de carbohidratos de los extractos tratados con enzima de posos de café consumido. Monosacáridos libres y monosacáridos totales medidos después de la hidrólisis ácida (azúcar total).

	Monosacáridos						
	libres (g/L)		Azúcar total (g/L)				
	Gal	Man	Ara	Gal	Glc	Man	
2 h							
Sin enzima	0	0	0.1	0.2	0	0.4	
Mannaway	0	0.03	0.1	0.2	0	0.6	
GALACTANASA1	0.35	0	0.9	5.3	0	0.6	
Mannaway + GALACTANASA1	0.36	0.65	1.2	6.3	0.1	7.9	
24 h							
Sin enzima	0	0	0.1	0.2	0	0.5	
Mannaway	0	0.16	0.1	0.4	0.1	1.8	
GALACTANASA1	0.74	0	1.4	7.8	0.1	0.9	
Mannaway + GALACTANASA1	0.77	2.08	2	9.4	0.1	17	

Tabla 15: Características de los extractos. Los azúcares totales se calcularon por su peso después de la hidrólisis ácida. Concentración de posos consumidos iniciales de 100 g/L.

	MS	Azúcares	Monosacáridos	Monosacáridos
	(g/L)	totales	libres	libres/azúcares
		/MS (%)	/MS (%)	totales (%)
2 h				
Sin enzima	2.60	27	0.0	0.0
Mannaway	3.26	28	0.9	3.3
GALACTANASA1	9.68	70	3.6	5.1
Mannaway +				
GALACTANASA1	19.8 ^a	78	5.1	6.5
24 h				
Sin enzima	3.94	20	0.0	0.0
Mannaway	7.23	33	2.2	6.7

GALACTANAS1	13.4	76	5.5	7.3
Mannaway +				
GALACTANAS1	34.7 ^b	82	8.2	10.0

^{a,b} El efecto sinérgico de la combinación de Mannaway con Galactanasal es del 190% después de 2 h y del 200% después de 24 h.

Tabla 16: Calidad del extracto. Absorbancia del extracto después de la alcalinización a 361 nm por materia seca.

Tratamiento enzimático	Abs ₃₆₁ /MS (A ₃₆₁ *L/g)	
	2 h	24 h
	Mannaway	0.91
GALACTANAS1	1.06	1.45
Mannaway +		
GALACTANAS1	1.63	1.21

Tabla 17: Distribución del tamaño de los extractos de café. Los porcentajes se basan en el área bajo la curva en los respectivos rangos de masa molecular. Todos los extractos enzimáticos tuvieron un peso molecular máximo inferior a 10 kDa.

Tratamiento enzimático	2 h			24 h		
	>GP5	GP3-	GP1-	>GP5	GP3-	GP1-
		GP5	GP3		GP5	GP3
Sin enzima	85%	5%	11%	88%	7%	5%
Mannaway	52%	15%	33%	43%	20%	38%
GALACTANAS1	86%	7%	7%	82%	8%	10%
Mannaway +						
GALACTANAS1	60%	16%	23%	45%	16%	39%

Ejemplo 15. Características del café preparado a partir de granos tostados molidos y café soluble

El café se preparó a partir de granos "Mokka Blanding" recién molidos (Stellini Kaffe, Odense Dinamarca). El café soluble se preparó disolviendo 4 g de café soluble en polvo (Nescafe® Gold Blend®, tostado dorado) en 150 mL de agua hirviendo. Se centrifugaron muestras de café mixto durante 10 min a 10 000 g a 10 °C y se filtraron a través de un filtro de 0.22 µm antes de seguir analizándolas. La materia seca, la composición de sacáridos y la absorción a 361 nm se midió de acuerdo con el Ejemplo 13.

Tabla 18: Monosacáridos libres y composición de azúcar total de las muestras de café.

	Ara	Gal	Glc	Man	Total
Café					
			(g/L)		
Monosacáridos libres	0.01	0	0	0	0.01
Azúcar total	0.3	0.6	0.2	0.7	1.8
Café soluble					
Monosacáridos libres	0.18	0.14	0.03	0.2	0.55
Azúcar total	1	4.8	0.2	5.2	11.2

Tabla 19: Características de las muestras de café. Los azúcares totales se calcularon por su peso después de la hidrólisis ácida.

	Monosacáridos libres		
	Azúcares totales	Monosacáridos libres	libres /azúcares totales (%)
MS (g/L)	/MS (%)	/MS (%)	totales (%)

Café	9	20.0	0.1	0.6
Café soluble	25	44.8	2.2	4.9

Tabla 20: Calidad del extracto. Absorbancia del extracto después de la alcalinización a 361 nm por materia seca

	Abs₃₆₁	Abs₃₆₁/DM (Abs₃₆₁*L/g)
Café	61	6.7
Café soluble	99	3.9

Se hace constar que con relación a esta fecha, el
 5 mejor método conocido por la solicitante para llevar a la
 práctica la citada invención, es el que resulta claro de la
 presente descripción de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CAFÉ

<130> 12671-WO-PCT

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 771

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(768)

<400> 1

atg att tcc gtc gct ttg gtc cca ctc ttc atc gct gtg ctt gcc agc 48
Met Ile Ser Val Ala Leu Val Pro Leu Phe Ile Ala Val Leu Ala Ser
1 5 10 15

gcg acg tcg agc gtc gtc ctc ccg acg aac tcg ttc agc tcg tac agc 96
Ala Thr Ser Ser Val Val Leu Pro Thr Asn Ser Phe Ser Ser Tyr Ser
20 25 30

gcc ttt gag cag cac tgg aac tac ctc tac cct tgg ggc tcg gac cac 144
Ala Phe Glu Gln His Trp Asn Tyr Leu Tyr Pro Trp Gly Ser Asp His
35 40 45

aac ggc tcc ggg cgc atg gtg ggc agc tcg tcg aac cac acg tac atc 192
Asn Gly Ser Gly Arg Met Val Gly Ser Ser Ser Asn His Thr Tyr Ile
50 55 60

agc gtc gcg gac aac gtt ctc acg ctc acc tcg aag ccc gtc tcc ggg 240
Ser Val Ala Asp Asn Val Leu Thr Leu Thr Ser Lys Pro Val Ser Gly
65 70 75 80

cag cct ccg agc acc tcc aac ccg cac ccg gcc atc cat tac ttc tct 288
Gln Pro Pro Ser Thr Ser Asn Pro His Pro Ala Ile His Tyr Phe Ser

	85	90	95	
ggc act gtc cat gcg aag caa cag gtc aag gtc gac gga agt agc gtc				336
Gly Thr Val His Ala Lys Gln Gln Val Lys Val Asp Gly Ser Ser Val				
	100	105	110	
acg ggg ttc gac atc cag gga gag ttc att gct ccg act gca aaa ggc				384
Thr Gly Phe Asp Ile Gln Gly Glu Phe Ile Ala Pro Thr Ala Lys Gly				
	115	120	125	
acg tgg cct gcg ttc tgg ctt act gcg gtg aat gga tgg cct ccg gag				432
Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro Pro Glu				
	130	135	140	
agc gac att ggt gaa tgg aag ggc acc cag gaa aac tgg ttc aat acc				480
Ser Asp Ile Gly Glu Trp Lys Gly Thr Gln Glu Asn Trp Phe Asn Thr				
	145	150	155	160
ttc aac act tcc tca tca gtc gcg acg aag cgc gtc gcc tgg ccc acg				528
Phe Asn Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Lys Arg Val Ala Trp Pro Thr				
	165	170	175	
gac ggc cag ttc cat tcc ctg aag gcc gag ctg cgc acg atc tcg ggc				576
Asp Gly Gln Phe His Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Thr Ile Ser Gly				
	180	185	190	
aac acg aag gac ctc tcg atc aag tac tac ttc gac gga acg ctg cag				624
Asn Thr Lys Asp Leu Ser Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Gly Thr Leu Gln				
	195	200	205	
gcg act cac acg gca gct aac ttc cgc aac gcc gct atg tgg ttg att				672
Ala Thr His Thr Ala Ala Asn Phe Arg Asn Ala Ala Met Trp Leu Ile				
	210	215	220	
gtc gac ctt cag atg gag gga agc tcg ggc tct ccg ggc cca gct ggc				720
Val Asp Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly				
	225	230	235	240
ggc acg acg ttc caa atc agg aac gtc cag ttg acg aag tat acg ccg				768
Gly Thr Thr Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Leu Thr Lys Tyr Thr Pro				
	245	250	255	
tga				771

<210> 2
 <211> 256
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 2

Met Ile Ser Val Ala Leu Val Pro Leu Phe Ile Ala Val Leu Ala Ser
1 5 10 15

Ala Thr Ser Ser Val Val Leu Pro Thr Asn Ser Phe Ser Ser Tyr Ser
20 25 30

Ala Phe Glu Gln His Trp Asn Tyr Leu Tyr Pro Trp Gly Ser Asp His
35 40 45

Asn Gly Ser Gly Arg Met Val Gly Ser Ser Ser Asn His Thr Tyr Ile
50 55 60

Ser Val Ala Asp Asn Val Leu Thr Leu Thr Ser Lys Pro Val Ser Gly
65 70 75 80

Gln Pro Pro Ser Thr Ser Asn Pro His Pro Ala Ile His Tyr Phe Ser
85 90 95

Gly Thr Val His Ala Lys Gln Gln Val Lys Val Asp Gly Ser Ser Val
100 105 110

Thr Gly Phe Asp Ile Gln Gly Glu Phe Ile Ala Pro Thr Ala Lys Gly
115 120 125

Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro Pro Glu
130 135 140

Ser Asp Ile Gly Glu Trp Lys Gly Thr Gln Glu Asn Trp Phe Asn Thr
145 150 155 160

Phe Asn Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Lys Arg Val Ala Trp Pro Thr

165

170

175

Asp Gly Gln Phe His Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Thr Ile Ser Gly
180 185 190

Asn Thr Lys Asp Leu Ser Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Gly Thr Leu Gln
195 200 205

Ala Thr His Thr Ala Ala Asn Phe Arg Asn Ala Ala Met Trp Leu Ile
210 215 220

Val Asp Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly
225 230 235 240

Gly Thr Thr Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Leu Thr Lys Tyr Thr Pro
245 250 255

<210> 3

<211> 777

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<400> 3

atg ttt aat tct ata ccc cat ttc ctg cta atg acc tct ggg gtc gga 48
Met Phe Asn Ser Ile Pro His Phe Leu Leu Met Thr Ser Gly Val Gly
1 5 10 15

att gcg ttg atg cca caa gtg atg gca gtc agg acc atg ata cca tgc 96
Ile Ala Leu Met Pro Gln Val Met Ala Val Arg Thr Met Ile Pro Cys
20 25 30

acc agc ttc gac aac cag tcc aac ttc gac gca gac tgg aat tac aac 144
Thr Ser Phe Asp Asn Gln Ser Asn Phe Asp Ala Asp Trp Asn Tyr Asn
35 40 45

tac ccc tgg gga acc gac cac aac ggc gcc gcg cgt atg gat ggt gcc Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg Met Asp Gly Ala 50 55 60	192
aac gcg gtc cgg ttg gcg agc aga ggt gac cgt aca ctt gtc att act Asn Ala Val Arg Leu Ala Ser Arg Gly Asp Arg Thr Leu Val Ile Thr 65 70 75 80	240
gca cgc cgt gcc gaa ggc ctg ccg cct gcc act cac gga ggc cag cag Ala Arg Arg Ala Glu Gly Leu Pro Pro Ala Thr His Gly Gly Gln Gln 85 90 95	288
att cct atc agg tat ctg tct ggg gcc atc cac gcc aaa gaa cag ttt Ile Pro Ile Arg Tyr Leu Ser Gly Ala Ile His Ala Lys Glu Gln Phe 100 105 110	336
act gtc cgg cca aac ggc ggc tac gat ttc aca gga gag ttc aaa gcc Thr Val Arg Pro Asn Gly Gly Tyr Asp Phe Thr Gly Glu Phe Lys Ala 115 120 125	384
aca aca acc aag ggt acc tgg cca gcc ttc tgg ctc aca gga gtg gac Thr Thr Thr Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Gly Val Asp 130 135 140	432
agt tgg cca ccg gag att gac atg gca gaa tgg aaa ggt agc ggg aaa Ser Trp Pro Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys 145 150 155 160	480
atc agc ttc aac acg ttc aac acg tcg agc gaa gtc gtg tcg cga gac Ile Ser Phe Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Glu Val Val Ser Arg Asp 165 170 175	528
gtg gat tac cct gcg cct gac cag ttc cat agc atc aag tgc gaa gtg Val Asp Tyr Pro Ala Pro Asp Gln Phe His Ser Ile Lys Cys Glu Val 180 185 190	576
aga gac gaa ggg cag gat gtc cgc gcc aat ttc tat atg gat ggc aac Arg Asp Glu Gly Gln Asp Val Arg Ala Asn Phe Tyr Met Asp Gly Asn 195 200 205	624
ctg ctt acc act cag atc gga aaa gga tac gtc ggg aaa cca ctc ttc Leu Leu Thr Thr Gln Ile Gly Lys Gly Tyr Val Gly Lys Pro Leu Phe 210 215 220	672
ttg att atc aac ttg cag atg gag gga tct tcg ggc acc ccg ggc ccc Leu Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Pro 225 230 235 240	720

gag tca gat acc gaa tac gcc ata cga aac ctg gag gtt ctt tcc tat 768
Glu Ser Asp Thr Glu Tyr Ala Ile Arg Asn Leu Glu Val Leu Ser Tyr
245 250 255

aac ccg tga 777
Asn Pro

<210> 4
<211> 258
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 4

Met Phe Asn Ser Ile Pro His Phe Leu Leu Met Thr Ser Gly Val Gly
1 5 10 15

Ile Ala Leu Met Pro Gln Val Met Ala Val Arg Thr Met Ile Pro Cys
20 25 30

Thr Ser Phe Asp Asn Gln Ser Asn Phe Asp Ala Asp Trp Asn Tyr Asn
35 40 45

Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg Met Asp Gly Ala
50 55 60

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

Ala Arg Arg Ala Glu Gly Leu Pro Pro Ala Thr His Gly Gly Gln Gln
85 90 95

Ile Pro Ile Arg Tyr Leu Ser Gly Ala Ile His Ala Lys Glu Gln Phe
100 105 110

Thr Val Arg Pro Asn Gly Gly Tyr Asp Phe Thr Gly Glu Phe Lys Ala
115 120 125

Thr Thr Thr Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Gly Val Asp
130 135 140

Ser Trp Pro Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys
145 150 155 160

Ile Ser Phe Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Glu Val Val Ser Arg Asp
165 170 175

Val Asp Tyr Pro Ala Pro Asp Gln Phe His Ser Ile Lys Cys Glu Val
180 185 190

Arg Asp Glu Gly Gln Asp Val Arg Ala Asn Phe Tyr Met Asp Gly Asn
195 200 205

Leu Leu Thr Thr Gln Ile Gly Lys Gly Tyr Val Gly Lys Pro Leu Phe
210 215 220

Leu Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Pro
225 230 235 240

Glu Ser Asp Thr Glu Tyr Ala Ile Arg Asn Leu Glu Val Leu Ser Tyr
245 250 255

Asn Pro

<210> 5
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
acacaactgg ggatccacca tgaggaggtc cttccaacaa ccc 43

<210> 6
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
ccctctagat ctcgagtgga catcttgaag ggacaactcc t 41

<210> 7
<211> 1061
<212> ADN
<213> Neurospora crassa

<220>
<221> exon
<222> (1)..(710)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(710)

<220>
<221> Intron
<222> (711)..(840)

<220>
<221> exon
<222> (841)..(893)

<220>
<221> CDS
<222> (841)..(893)

<220>
<221> Intron
<222> (894)..(990)

<220>
<221> exon

<222> (991)..(1025)

<220>

<221> CDS

<222> (991)..(1022)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1026)..(1061)

<400> 7

atg agg agg tcc ttc caa caa ccc ctt ccc ctt ctc ctc caa acc atc 48
Met Arg Arg Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gln Thr Ile
1 5 10 15

acc atc ctc tgc ctc ttc cca tct acc ctc gcc tca tcc aag acc ctc 96
Thr Ile Leu Cys Leu Phe Pro Ser Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr Leu
20 25 30

cta atc cct tcc aca tcc ttc aac tcc acc acc acc ttc aac acc tac 144
Leu Ile Pro Ser Thr Ser Phe Asn Ser Thr Thr Thr Phe Asn Thr Tyr
35 40 45

tgg tcc ttc aat tac ccc tgg ggc acc gac cac aat ggc gcc gcg cgc 192
Trp Ser Phe Asn Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg
50 55 60

atg tcc cct tcc caa gtc tcc ata gcc ccc tct gct gac ggc acc tca 240
Met Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Ala Pro Ser Ala Asp Gly Thr Ser
65 70 75 80

agc acc ctc act cta acc gcc cac cgc gtc acc ggc caa aaa ccc gct 288
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ala His Arg Val Thr Gly Gln Lys Pro Ala
85 90 95

acc cac ggc ggc aaa cag atc ccc atc aag tac cta tcc ggc gcc atc 336
Thr His Gly Gly Lys Gln Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Ser Gly Ala Ile
100 105 110

cac gcc aag cag cac ttc acc att act tct tct tct tct ggt gct ggt 384
His Ala Lys Gln His Phe Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ala Gly
115 120 125

gca gtg tca ggc tac gat ttc tca gcc gag ttc cgc gcc ccc gtt gcg 432
Ala Val Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ala Glu Phe Arg Ala Pro Val Ala
130 135 140

aag ggg acc tgg cct gcg ttt tgg ttg acg gcc gtc aat ggg tgg ccg 480

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Arg Arg Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gln Thr Ile
1 5 10 15

Thr Ile Leu Cys Leu Phe Pro Ser Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr Leu
 20 25 30

Leu Ile Pro Ser Thr Ser Phe Asn Ser Thr Thr Thr Phe Asn Thr Tyr
 35 40 45

Trp Ser Phe Asn Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg
 50 55 60

Met Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Ala Pro Ser Ala Asp Gly Thr Ser
65 70 75 80

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ala His Arg Val Thr Gly Gln Lys Pro Ala
 85 90 95

Thr His Gly Gly Lys Gln Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Ser Gly Ala Ile
 100 105 110

His Ala Lys Gln His Phe Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ala Gly
 115 120 125

Ala Val Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ala Glu Phe Arg Ala Pro Val Ala
 130 135 140

Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro
145 150 155 160

Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys Ile Ser Phe
 165 170 175

Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Gln Val Met Ala Arg Asp Val Val Tyr
180 185 190

Gly Pro Asn Gly Ser Glu Lys Glu Trp His Arg Val Val Cys Glu Ile
195 200 205

Arg Arg Asp Gly Arg Asn Gly Gly Lys Asp Val Glu Val Arg Phe Arg
210 215 220

Met Asp Gly Gln Leu Val Val Thr Gln Trp Gly Lys Gly Ile Ile Asn
225 230 235 240

Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Glu Ala Val Arg
245 250 255

Asn Leu Glu Val Trp Ser Tyr Gly Asp
260 265

<210> 9
<211> 1347
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1344)

<400> 9
atg ttg tgg ttg cgc aag gtg atc cct gtt ttc ctc tct ctg gtc gtt 48
Met Leu Trp Leu Arg Lys Val Ile Pro Val Phe Leu Ser Leu Val Val
1 5 10 15

gcg gcc cgc gcc gag aca cag atc gtc tct ggt gct gct tgg aca gac 96
Ala Ala Arg Ala Glu Thr Gln Ile Val Ser Gly Ala Ala Trp Thr Asp
20 25 30

aca agc gga aac gtc att cag gcc cat ggc gct gga atc ttg aag gtc 144

Thr Ser Gly Asn Val Ile Gln Ala His Gly Ala Gly Ile Leu Lys Val
 35 40 45

gga agc acg ttt tac tgg ttc ggt gaa gac aag acg gag aac agt gcc 192
 Gly Ser Thr Phe Tyr Trp Phe Gly Glu Asp Lys Thr Glu Asn Ser Ala
 50 55 60

ttg ttc cac gca gtg tcg tgc tat aca tct acg gac ctg acg aac tgg 240
 Leu Phe His Ala Val Ser Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Leu Thr Asn Trp
 65 70 75 80

act cgt caa agc aat gcg ctt tct ccg gtc gcc aac acc atg att tcc 288
 Thr Arg Gln Ser Asn Ala Leu Ser Pro Val Ala Asn Thr Met Ile Ser
 85 90 95

tct aac aac atc gtt gag cgt ccc aaa gtt tta ttc aac aag aag aat 336
 Ser Asn Asn Ile Val Glu Arg Pro Lys Val Leu Phe Asn Lys Lys Asn
 100 105 110

caa gaa tac gtg atg tgg ttc cat tct gat agt tcc aac tat gga gct 384
 Gln Glu Tyr Val Met Trp Phe His Ser Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Ala
 115 120 125

gcc atg gtc ggt gtc gca act gcg aaa act ccc tgc ggc ccc tat aca 432
 Ala Met Val Gly Val Ala Thr Ala Lys Thr Pro Cys Gly Pro Tyr Thr
 130 135 140

ttc aaa ggc agc ttc aaa cct ctc ggc gca gat tct cgc gat gaa ggg 480
 Phe Lys Gly Ser Phe Lys Pro Leu Gly Ala Asp Ser Arg Asp Glu Gly
 145 150 155 160

ctg ttt cag gat gac gac tcc gca caa acc gcc tac ctt ctc tat gcc 528
 Leu Phe Gln Asp Asp Asp Ser Ala Gln Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ala
 165 170 175

tcc gat aac aac cag aac ttc aag ata tca agg ttg gat gac aac tat 576
 Ser Asp Asn Asn Gln Asn Phe Lys Ile Ser Arg Leu Asp Asp Asn Tyr
 180 185 190

tac aat gtg act gct cag gct agc gtt ttg acc ggt gcc aca ctt gaa 624
 Tyr Asn Val Thr Ala Gln Ala Ser Val Leu Thr Gly Ala Thr Leu Glu
 195 200 205

gca ccg ggc att gta aag cac agc gga aaa tac ttc cta atc gcc tcg 672
 Ala Pro Gly Ile Val Lys His Ser Gly Lys Tyr Phe Leu Ile Ala Ser
 210 215 220

cac acc agc gga tgg gct ccg aac cca aac aag ttc ttc tca gca tct 720

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

Pro Val Lys Val Asn Leu Asn Asn Gly Ala Asn Ser Ile Thr Phe Gly
420 425 430

tcc gga caa tcc aat tac gct gcc gac ctt gac aag att atc gtc tac 1344
Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ala Ala Asp Leu Asp Lys Ile Ile Val Tyr
435 440 445

tga 1347

<210> 10
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 10

Met Leu Trp Leu Arg Lys Val Ile Pro Val Phe Leu Ser Leu Val Val
1 5 10 15

Ala Ala Arg Ala Glu Thr Gln Ile Val Ser Gly Ala Ala Trp Thr Asp
20 25 30

Thr Ser Gly Asn Val Ile Gln Ala His Gly Ala Gly Ile Leu Lys Val
35 40 45

Gly Ser Thr Phe Tyr Trp Phe Gly Glu Asp Lys Thr Glu Asn Ser Ala
50 55 60

Leu Phe His Ala Val Ser Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Leu Thr Asn Trp
65 70 75 80

Thr Arg Gln Ser Asn Ala Leu Ser Pro Val Ala Asn Thr Met Ile Ser
85 90 95

Ser Asn Asn Ile Val Glu Arg Pro Lys Val Leu Phe Asn Lys Lys Asn
100 105 110

Gln Glu Tyr Val Met Trp Phe His Ser Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Ala
115 120 125

Ala Met Val Gly Val Ala Thr Ala Lys Thr Pro Cys Gly Pro Tyr Thr
130 135 140

Phe Lys Gly Ser Phe Lys Pro Leu Gly Ala Asp Ser Arg Asp Glu Gly
145 150 155 160

Leu Phe Gln Asp Asp Asp Ser Ala Gln Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ala
165 170 175

Ser Asp Asn Asn Gln Asn Phe Lys Ile Ser Arg Leu Asp Asp Asn Tyr
180 185 190

Tyr Asn Val Thr Ala Gln Ala Ser Val Leu Thr Gly Ala Thr Leu Glu
195 200 205

Ala Pro Gly Ile Val Lys His Ser Gly Lys Tyr Phe Leu Ile Ala Ser
210 215 220

His Thr Ser Gly Trp Ala Pro Asn Pro Asn Lys Phe Phe Ser Ala Ser
225 230 235 240

Ser Leu Ser Gly Pro Trp Ser Ser Gln Gln Asp Ile Thr Thr Ala Ser
245 250 255

Thr Arg Thr Trp Tyr Ser Gln Asn Ala Phe Asp Leu Pro Leu Gly Asn
260 265 270

Asn Ala Ile Tyr Met Gly Asp Arg Trp Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ser
275 280 285

Ser Arg Tyr Ile Trp Tyr Pro Ile Asp Phe Ser Ser Gly Ser Pro Gln
290 295 300

Leu Val His Ala Asp Val Trp Ser Val Asn Pro Ser Ala Gly Thr Tyr
305 310 315 320

Thr Val Ala Gln Gly Thr Thr Tyr Glu Ala Glu Lys Gly Thr Leu Gly
325 330 335

Gly Ser Ser Lys Leu Leu Ser Asn Ser Gly Phe Ser Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Val Gly Tyr Leu Gly His Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Asn Val Gln
355 360 365

Gly Asn Gly Gly Ala His Trp Val Ala Ile Tyr Phe Ala Asn Gly Asp
370 375 380

Ser Thr Tyr Arg Asn Val Thr Val Ser Val Asn Gly Gly Ser Ser Val
385 390 395 400

Leu Val Asp Gln Pro Asp Ser Gly Gly Gly Gly Val Val Ile Ser Val
405 410 415

Pro Val Lys Val Asn Leu Asn Asn Gly Ala Asn Ser Ile Thr Phe Gly
420 425 430

Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ala Ala Asp Leu Asp Lys Ile Ile Val Tyr
435 440 445

<210> 11
<211> 1224
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1224)

<400> 11
 atg agg ttg cag aag gat ttc gat cga gtc atg ggc att atc ttg atg 48
 Met Arg Leu Gln Lys Asp Phe Asp Arg Val Met Gly Ile Ile Leu Met
 1 5 10 15

 att ctc att ctc gca atc ccc tcc ttg cag atc tgt aac aag tcg tac 96
 Ile Leu Ile Leu Ala Ile Pro Ser Leu Gln Ile Cys Asn Lys Ser Tyr
 20 25 30

 act gag ggc gac ccg gtc atc atc aac ccg gtc cct ggc ctc ccc gtc 144
 Thr Glu Gly Asp Pro Val Ile Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Val
 35 40 45

 gac ttc att cga ggt gtg gat gca tcg gaa gca ccc tgg atc atc gag 192
 Asp Phe Ile Arg Gly Val Asp Ala Ser Glu Ala Pro Trp Ile Ile Glu
 50 55 60

 ttg ggt ggc aag tac tac gac gag aac gga gtc gag agg gat ctc ttg 240
 Leu Gly Gly Lys Tyr Tyr Asp Glu Asn Gly Val Glu Arg Asp Leu Leu
 65 70 75 80

 gac atc ttg aag gaa aac ggc gtg aac tgg atc agg ctc cga gtg tgg 288
 Asp Ile Leu Lys Glu Asn Gly Val Asn Trp Ile Arg Leu Arg Val Trp
 85 90 95

 aac gat cct tat gac gaa cag ggt agg cct tat gga gga ggc aac tgt 336
 Asn Asp Pro Tyr Asp Glu Gln Gly Arg Pro Tyr Gly Gly Gly Asn Cys
 100 105 110

 gat ctc cct cgc atg acc gac ttc gca gca aag gcg aag gcg aaa ggc 384
 Asp Leu Pro Arg Met Thr Asp Phe Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Gly
 115 120 125

 ttc gga gtg ttg att gat ttc cac tat tcg gat tgg tgg gca gac ccc 432
 Phe Gly Val Leu Ile Asp Phe His Tyr Ser Asp Trp Trp Ala Asp Pro
 130 135 140

 tcg aaa cag tcg aag ccc aag gcc tgg gcc aac ctc tcg tac ccc gag 480
 Ser Lys Gln Ser Lys Pro Lys Ala Trp Ala Asn Leu Ser Tyr Pro Glu
 145 150 155 160

 ctc gtg gaa gcg gtc tat aac tgg acc tac aac gcg ttg aag tac atg 528
 Leu Val Glu Ala Val Tyr Asn Trp Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Tyr Met
 165 170 175

 gcc gag cac aac gca ttg ccc gat atg gtg cag atc gga aac gag att 576
 Ala Glu His Asn Ala Leu Pro Asp Met Val Gln Ile Gly Asn Glu Ile

180	185	190	
aac aac ggc ttc ctc tgg cct gat ggc tcg gca gcc aac tgg aca cag			624
Asn Asn Gly Phe Leu Trp Pro Asp Gly Ser Ala Ala Asn Trp Thr Gln			
195	200	205	
ttc gtc ggt ttg ttg aaa gca gcc att tcg gca gtg aaa gac gtg aac			672
Phe Val Gly Leu Leu Lys Ala Ala Ile Ser Ala Val Lys Asp Val Asn			
210	215	220	
ccc aac atc aag att gtc atc cat ctc gca gga gtc aag gcg gat ttc			720
Pro Asn Ile Lys Ile Val Ile His Leu Ala Gly Val Lys Ala Asp Phe			
225	230	235	240
tac atc aac ttc att gac agg ttg atc aac tcc gga gtc tcc ttc gac			768
Tyr Ile Asn Phe Ile Asp Arg Leu Ile Asn Ser Gly Val Ser Phe Asp			
245	250	255	
gtc atc gca atc tcg ttc tat ccc tat tgg cat ggt acc atg gac gac			816
Val Ile Ala Ile Ser Phe Tyr Pro Tyr Trp His Gly Thr Met Asp Asp			
260	265	270	
ttc agg aac ttg gtg cgc act ctc gtg cag agg tac gat aag aag atc			864
Phe Arg Asn Leu Val Arg Thr Leu Val Gln Arg Tyr Asp Lys Lys Ile			
275	280	285	
ctc gtc gca gag acc gcg tac gcc tgg acc ctc gat gat tcc gat gga			912
Leu Val Ala Glu Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Leu Asp Asp Ser Asp Gly			
290	295	300	
cac ccg aac att ttc ggt tcg agg gac ctc gag gtc aag gga ggt tac			960
His Pro Asn Ile Phe Gly Ser Arg Asp Leu Glu Val Lys Gly Gly Tyr			
305	310	315	320
aaa gcc tcg atc cag gga cag gcc tcg ttc atc cgg gac ctc atc gca			1008
Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Ala Ser Phe Ile Arg Asp Leu Ile Ala			
325	330	335	
gca ctc tac gag gag ggt aag gat aaa gca ctc ggc atc ttc tac tgg			1056
Ala Leu Tyr Glu Glu Gly Lys Asp Lys Ala Leu Gly Ile Phe Tyr Trp			
340	345	350	
ggt gca acc tgg att cct tat cct ggt gcc gga tgg aag act ggc gaa			1104
Gly Ala Thr Trp Ile Pro Tyr Pro Gly Ala Gly Trp Lys Thr Gly Glu			
355	360	365	
gga aac ccc tgg gag aac cag gca ttg ttc gac ttc aac ggt agg gcc			1152
Gly Asn Pro Trp Glu Asn Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asn Gly Arg Ala			

Asp Leu Pro Arg Met Thr Asp Phe Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Gly
115 120 125

Phe Gly Val Leu Ile Asp Phe His Tyr Ser Asp Trp Trp Ala Asp Pro
130 135 140

Ser Lys Gln Ser Lys Pro Lys Ala Trp Ala Asn Leu Ser Tyr Pro Glu
145 150 155 160

Leu Val Glu Ala Val Tyr Asn Trp Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Tyr Met
165 170 175

Ala Glu His Asn Ala Leu Pro Asp Met Val Gln Ile Gly Asn Glu Ile
180 185 190

Asn Asn Gly Phe Leu Trp Pro Asp Gly Ser Ala Ala Asn Trp Thr Gln
195 200 205

Phe Val Gly Leu Leu Lys Ala Ala Ile Ser Ala Val Lys Asp Val Asn
210 215 220

Pro Asn Ile Lys Ile Val Ile His Leu Ala Gly Val Lys Ala Asp Phe
225 230 235 240

Tyr Ile Asn Phe Ile Asp Arg Leu Ile Asn Ser Gly Val Ser Phe Asp
245 250 255

Val Ile Ala Ile Ser Phe Tyr Pro Tyr Trp His Gly Thr Met Asp Asp
260 265 270

Phe Arg Asn Leu Val Arg Thr Leu Val Gln Arg Tyr Asp Lys Lys Ile
275 280 285

Leu Val Ala Glu Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Leu Asp Asp Ser Asp Gly
290 295 300

His Pro Asn Ile Phe Gly Ser Arg Asp Leu Glu Val Lys Gly Gly Tyr
305 310 315 320

Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Ala Ser Phe Ile Arg Asp Leu Ile Ala
 325 330 335

Ala Leu Tyr Glu Glu Gly Lys Asp Lys Ala Leu Gly Ile Phe Tyr Trp
 340 345 350

Gly Ala Thr Trp Ile Pro Tyr Pro Gly Ala Gly Trp Lys Thr Gly Glu
 355 360 365

Gly Asn Pro Trp Glu Asn Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asn Gly Arg Ala
 370 375 380

Leu Pro Ser Leu Lys Val Phe Arg Leu Val Tyr Glu Ala Gln Pro Val
385 390 395 400

Glu Ile Lys Pro Leu Glu Leu
 405

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13
ccctgtcga tgcatgtat c

21

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 14
atcctcaatt ccgtcggtcg a

21

<210> 15
<211> 309
<212> PRT
<213> Bacillus sp.

<400> 15

Ala Asn Ser Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Asn
1 5 10 15

Gly Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr
 20 25 30

Lys Asp Gln Ala Thr Thr Ala Ile Glu Gly Ile Ala Asn Thr Gly Ala
 35 40 45

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

Asp Ile His Thr Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Asp Asn His
65 70 75 80

Leu Val Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Tyr Asp Ser Ile
 85 90 95

Ala Ser Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Arg Ser Ala
 100 105 110

Leu Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp
 115 120 125

Phe Gly Ser Trp Glu Gly Asp Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala
 130 135 140

Ile Pro Arg Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Met Val Asp
145 150 155 160

Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Arg
 165 170 175

Glu Val Phe Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Ile His
 180 185 190

Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Gln Val Arg Thr Asn Ile
 195 200 205

Asp Arg Val Leu Asn Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly
 210 215 220

His Arg His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr
225 230 235 240

Ser Glu Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn
 245 250 255

Gly Pro Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ala Gly Asn
 260 265 270

Asn Leu Thr Ala Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Gly Pro Tyr Gly Leu
 275 280 285

Arg Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Gly Gly Gly Ser Asp
 290 295 300

Gly Gly Thr Ser Pro
305

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CAFÉ

<130> 12671-WO-PCT

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 771

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(768)

<400> 1

atg	att	tcc	gtc	gct	ttg	gtc	cca	ctc	ttc	atc	gct	gtg	ctt	gcc	agc	48
Met	Ile	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	
1		5		10		15										

gcg	acg	tcg	agc	gtc	gtc	ctc	ccg	acg	aac	tcg	ttc	agc	tcg	tac	agc	96
Ala	Thr	Ser	Ser	Val	Val	Leu	Pro	Thr	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ser
	20			25		30										

gcc	ttt	gag	cag	cac	tgg	aac	tac	ctc	tac	cct	tgg	ggc	tcg	gac	cac	144
Ala	Phe	Glu	Gln	His	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Trp	Gly	Ser	Asp	His	
	35			40		45										

aac	ggc	tcc	ggg	cgc	atg	gtg	ggc	agc	tcg	tcg	aac	cac	acg	tac	atc	192
Asn	Gly	Ser	Gly	Arg	Met	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	His	Thr	Tyr	Ile	
	50			55		60										

agc	gtc	gcg	gac	aac	gtt	ctc	acg	ctc	acc	tcg	aag	ccc	gtc	tcc	ggg	240
Ser	Val	Ala	Asp	Asn	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Ser	Lys	Pro	Val	Ser	Gly	
65		70		75		80										

cag	cct	ccg	agc	acc	tcc	aac	ccg	cac	ccg	gcc	atc	cat	tac	ttc	tct	288
Gln	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Asn	Pro	His	Pro	Ala	Ile	His	Tyr	Phe	Ser	

	85	90	95	
ggc act gtc cat gcg aag caa cag gtc aag gtc gac gga agt agc gtc				336
Gly Thr Val His Ala Lys Gln Gln Val Lys Val Asp Gly Ser Ser Val				
	100	105	110	
acg ggg ttc gac atc cag gga gag ttc att gct ccg act gca aaa ggc				384
Thr Gly Phe Asp Ile Gln Gly Glu Phe Ile Ala Pro Thr Ala Lys Gly				
	115	120	125	
acg tgg cct gcg ttc tgg ctt act gcg gtg aat gga tgg cct ccg gag				432
Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro Pro Glu				
	130	135	140	
agc gac att ggt gaa tgg aag ggc acc cag gaa aac tgg ttc aat acc				480
Ser Asp Ile Gly Glu Trp Lys Gly Thr Gln Glu Asn Trp Phe Asn Thr				
	145	150	155	160
ttc aac act tcc tca tca gtc gcg acg aag cgc gtc gcc tgg ccc acg				528
Phe Asn Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Lys Arg Val Ala Trp Pro Thr				
	165	170	175	
gac ggc cag ttc cat tcc ctg aag gcc gag ctg cgc acg atc tcg ggc				576
Asp Gly Gln Phe His Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Thr Ile Ser Gly				
	180	185	190	
aac acg aag gac ctc tcg atc aag tac tac ttc gac gga acg ctg cag				624
Asn Thr Lys Asp Leu Ser Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Gly Thr Leu Gln				
	195	200	205	
gcg act cac acg gca gct aac ttc cgc aac gcc gct atg tgg ttg att				672
Ala Thr His Thr Ala Ala Asn Phe Arg Asn Ala Ala Met Trp Leu Ile				
	210	215	220	
gtc gac ctt cag atg gag gga agc tcg ggc tct ccg ggc cca gct ggc				720
Val Asp Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly				
	225	230	235	240
ggc acg acg ttc caa atc agg aac gtc cag ttg acg aag tat acg ccg				768
Gly Thr Thr Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Leu Thr Lys Tyr Thr Pro				
	245	250	255	
tga				771

<210> 2
 <211> 256
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 2

Met Ile Ser Val Ala Leu Val Pro Leu Phe Ile Ala Val Leu Ala Ser
1 5 10 15

Ala Thr Ser Ser Val Val Leu Pro Thr Asn Ser Phe Ser Ser Tyr Ser
20 25 30

Ala Phe Glu Gln His Trp Asn Tyr Leu Tyr Pro Trp Gly Ser Asp His
35 40 45

Asn Gly Ser Gly Arg Met Val Gly Ser Ser Ser Asn His Thr Tyr Ile
50 55 60

Ser Val Ala Asp Asn Val Leu Thr Leu Thr Ser Lys Pro Val Ser Gly
65 70 75 80

Gln Pro Pro Ser Thr Ser Asn Pro His Pro Ala Ile His Tyr Phe Ser
85 90 95

Gly Thr Val His Ala Lys Gln Gln Val Lys Val Asp Gly Ser Ser Val
100 105 110

Thr Gly Phe Asp Ile Gln Gly Glu Phe Ile Ala Pro Thr Ala Lys Gly
115 120 125

Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro Pro Glu
130 135 140

Ser Asp Ile Gly Glu Trp Lys Gly Thr Gln Glu Asn Trp Phe Asn Thr
145 150 155 160

Phe Asn Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Lys Arg Val Ala Trp Pro Thr

165

170

175

Asp Gly Gln Phe His Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Thr Ile Ser Gly
180 185 190

Asn Thr Lys Asp Leu Ser Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Gly Thr Leu Gln
195 200 205

Ala Thr His Thr Ala Ala Asn Phe Arg Asn Ala Ala Met Trp Leu Ile
210 215 220

Val Asp Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly
225 230 235 240

Gly Thr Thr Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Leu Thr Lys Tyr Thr Pro
245 250 255

<210> 3
<211> 777
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 3
atg ttt aat tct ata ccc cat ttc ctg cta atg acc tct ggg gtc gga 48
Met Phe Asn Ser Ile Pro His Phe Leu Leu Met Thr Ser Gly Val Gly
1 5 10 15

att gcg ttg atg cca caa gtg atg gca gtc agg acc atg ata cca tgc 96
Ile Ala Leu Met Pro Gln Val Met Ala Val Arg Thr Met Ile Pro Cys
20 25 30

acc agc ttc gac aac cag tcc aac ttc gac gca gac tgg aat tac aac 144
Thr Ser Phe Asp Asn Gln Ser Asn Phe Asp Ala Asp Trp Asn Tyr Asn
35 40 45

tac ccc tgg gga acc gac cac aac ggc gcc gcg cgt atg gat ggt gcc Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg Met Asp Gly Ala 50 55 60	192
aac gcg gtc cgg ttg gcg agc aga ggt gac cgt aca ctt gtc att act Asn Ala Val Arg Leu Ala Ser Arg Gly Asp Arg Thr Leu Val Ile Thr 65 70 75 80	240
gca cgc cgt gcc gaa ggc ctg ccg cct gcc act cac gga ggc cag cag Ala Arg Arg Ala Glu Gly Leu Pro Pro Ala Thr His Gly Gly Gln Gln 85 90 95	288
att cct atc agg tat ctg tct ggg gcc atc cac gcc aaa gaa cag ttt Ile Pro Ile Arg Tyr Leu Ser Gly Ala Ile His Ala Lys Glu Gln Phe 100 105 110	336
act gtc cgg cca aac ggc ggc tac gat ttc aca gga gag ttc aaa gcc Thr Val Arg Pro Asn Gly Gly Tyr Asp Phe Thr Gly Glu Phe Lys Ala 115 120 125	384
aca aca acc aag ggt acc tgg cca gcc ttc tgg ctc aca gga gtg gac Thr Thr Thr Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Gly Val Asp 130 135 140	432
agt tgg cca ccg gag att gac atg gca gaa tgg aaa ggt agc ggg aaa Ser Trp Pro Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys 145 150 155 160	480
atc agc ttc aac acg ttc aac acg tcg agc gaa gtc gtg tcg cga gac Ile Ser Phe Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Glu Val Val Ser Arg Asp 165 170 175	528
gtg gat tac cct gcg cct gac cag ttc cat agc atc aag tgc gaa gtg Val Asp Tyr Pro Ala Pro Asp Gln Phe His Ser Ile Lys Cys Glu Val 180 185 190	576
aga gac gaa ggg cag gat gtc cgc gcc aat ttc tat atg gat ggc aac Arg Asp Glu Gly Gln Asp Val Arg Ala Asn Phe Tyr Met Asp Gly Asn 195 200 205	624
ctg ctt acc act cag atc gga aaa gga tac gtc ggg aaa cca ctc ttc Leu Leu Thr Thr Gln Ile Gly Lys Gly Tyr Val Gly Lys Pro Leu Phe 210 215 220	672
ttg att atc aac ttg cag atg gag gga tct tcg ggc acc ccg ggc ccc Leu Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Pro 225 230 235 240	720

gag tca gat acc gaa tac gcc ata cga aac ctg gag gtt ctt tcc tat 768
Glu Ser Asp Thr Glu Tyr Ala Ile Arg Asn Leu Glu Val Leu Ser Tyr
245 250 255

aac ccg tga 777
Asn Pro

<210> 4
<211> 258
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 4

Met Phe Asn Ser Ile Pro His Phe Leu Leu Met Thr Ser Gly Val Gly
1 5 10 15

Ile Ala Leu Met Pro Gln Val Met Ala Val Arg Thr Met Ile Pro Cys
20 25 30

Thr Ser Phe Asp Asn Gln Ser Asn Phe Asp Ala Asp Trp Asn Tyr Asn
35 40 45

Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg Met Asp Gly Ala
50 55 60

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

Ala Arg Arg Ala Glu Gly Leu Pro Pro Ala Thr His Gly Gly Gln Gln
85 90 95

Ile Pro Ile Arg Tyr Leu Ser Gly Ala Ile His Ala Lys Glu Gln Phe
100 105 110

Thr Val Arg Pro Asn Gly Gly Tyr Asp Phe Thr Gly Glu Phe Lys Ala
115 120 125

Thr Thr Thr Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Gly Val Asp
130 135 140

Ser Trp Pro Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys
145 150 155 160

Ile Ser Phe Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Glu Val Val Ser Arg Asp
165 170 175

Val Asp Tyr Pro Ala Pro Asp Gln Phe His Ser Ile Lys Cys Glu Val
180 185 190

Arg Asp Glu Gly Gln Asp Val Arg Ala Asn Phe Tyr Met Asp Gly Asn
195 200 205

Leu Leu Thr Thr Gln Ile Gly Lys Gly Tyr Val Gly Lys Pro Leu Phe
210 215 220

Leu Ile Ile Asn Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Pro
225 230 235 240

Glu Ser Asp Thr Glu Tyr Ala Ile Arg Asn Leu Glu Val Leu Ser Tyr
245 250 255

Asn Pro

<210> 5
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
acacaactgg ggatccacca tgaggaggtc cttccaacaa ccc 43

<210> 6
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
ccctctagat ctcgagtgga catcttgaag ggacaactcc t 41

<210> 7
<211> 1061
<212> ADN
<213> Neurospora crassa

<220>
<221> exon
<222> (1)..(710)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(710)

<220>
<221> Intron
<222> (711)..(840)

<220>
<221> exon
<222> (841)..(893)

<220>
<221> CDS
<222> (841)..(893)

<220>
<221> Intron
<222> (894)..(990)

<220>
<221> exon

<222> (991)..(1025)

<220>

<221> CDS

<222> (991)..(1022)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1026)..(1061)

<400> 7

atg agg agg tcc ttc caa caa ccc ctt ccc ctt ctc ctc caa acc atc 48
Met Arg Arg Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gln Thr Ile
1 5 10 15

acc atc ctc tgc ctc ttc cca tct acc ctc gcc tca tcc aag acc ctc 96
Thr Ile Leu Cys Leu Phe Pro Ser Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr Leu
20 25 30

cta atc cct tcc aca tcc ttc aac tcc acc acc acc ttc aac acc tac 144
Leu Ile Pro Ser Thr Ser Phe Asn Ser Thr Thr Thr Phe Asn Thr Tyr
35 40 45

tgg tcc ttc aat tac ccc tgg ggc acc gac cac aat ggc gcc gcg cgc 192
Trp Ser Phe Asn Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg
50 55 60

atg tcc cct tcc caa gtc tcc ata gcc ccc tct gct gac ggc acc tca 240
Met Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Ala Pro Ser Ala Asp Gly Thr Ser
65 70 75 80

agc acc ctc act cta acc gcc cac cgc gtc acc ggc caa aaa ccc gct 288
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ala His Arg Val Thr Gly Gln Lys Pro Ala
85 90 95

acc cac ggc ggc aaa cag atc ccc atc aag tac cta tcc ggc gcc atc 336
Thr His Gly Gly Lys Gln Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Ser Gly Ala Ile
100 105 110

cac gcc aag cag cac ttc acc att act tct tct tct tct ggt gct ggt 384
His Ala Lys Gln His Phe Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ala Gly
115 120 125

gca gtg tca ggc tac gat ttc tca gcc gag ttc cgc gcc ccc gtt gcg 432
Ala Val Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ala Glu Phe Arg Ala Pro Val Ala
130 135 140

aag ggg acc tgg cct gcg ttt tgg ttg acg gcc gtc aat ggg tgg ccg 480

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Arg Arg Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gln Thr Ile
1 5 10 15

Thr Ile Leu Cys Leu Phe Pro Ser Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr Leu
 20 25 30

Leu Ile Pro Ser Thr Ser Phe Asn Ser Thr Thr Thr Phe Asn Thr Tyr
 35 40 45

Trp Ser Phe Asn Tyr Pro Trp Gly Thr Asp His Asn Gly Ala Ala Arg
 50 55 60

Met Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Ala Pro Ser Ala Asp Gly Thr Ser
65 70 75 80

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ala His Arg Val Thr Gly Gln Lys Pro Ala
 85 90 95

Thr His Gly Gly Lys Gln Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Ser Gly Ala Ile
 100 105 110

His Ala Lys Gln His Phe Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ala Gly
 115 120 125

Ala Val Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ala Glu Phe Arg Ala Pro Val Ala
 130 135 140

Lys Gly Thr Trp Pro Ala Phe Trp Leu Thr Ala Val Asn Gly Trp Pro
145 150 155 160

Pro Glu Ile Asp Met Ala Glu Trp Lys Gly Ser Gly Lys Ile Ser Phe
 165 170 175

Asn Thr Phe Asn Thr Ser Ser Gln Val Met Ala Arg Asp Val Val Tyr
180 185 190

Gly Pro Asn Gly Ser Glu Lys Glu Trp His Arg Val Val Cys Glu Ile
195 200 205

Arg Arg Asp Gly Arg Asn Gly Gly Lys Asp Val Glu Val Arg Phe Arg
210 215 220

Met Asp Gly Gln Leu Val Val Thr Gln Trp Gly Lys Gly Ile Ile Asn
225 230 235 240

Leu Gln Met Glu Gly Ser Ser Gly Ser Pro Gly Pro Glu Ala Val Arg
245 250 255

Asn Leu Glu Val Trp Ser Tyr Gly Asp
260 265

<210> 9
<211> 1347
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1344)

<400> 9
atg ttg tgg ttg cgc aag gtg atc cct gtt ttc ctc tct ctg gtc gtt 48
Met Leu Trp Leu Arg Lys Val Ile Pro Val Phe Leu Ser Leu Val Val
1 5 10 15

gcg gcc cgc gcc gag aca cag atc gtc tct ggt gct gct tgg aca gac 96
Ala Ala Arg Ala Glu Thr Gln Ile Val Ser Gly Ala Ala Trp Thr Asp
20 25 30

aca agc gga aac gtc att cag gcc cat ggc gct gga atc ttg aag gtc 144

Thr Ser Gly Asn Val Ile Gln Ala His Gly Ala Gly Ile Leu Lys Val
 35 40 45

gga agc acg ttt tac tgg ttc ggt gaa gac aag acg gag aac agt gcc 192
 Gly Ser Thr Phe Tyr Trp Phe Gly Glu Asp Lys Thr Glu Asn Ser Ala
 50 55 60

ttg ttc cac gca gtg tcg tgc tat aca tct acg gac ctg acg aac tgg 240
 Leu Phe His Ala Val Ser Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Leu Thr Asn Trp
 65 70 75 80

act cgt caa agc aat gcg ctt tct ccg gtc gcc aac acc atg att tcc 288
 Thr Arg Gln Ser Asn Ala Leu Ser Pro Val Ala Asn Thr Met Ile Ser
 85 90 95

tct aac aac atc gtt gag cgt ccc aaa gtt tta ttc aac aag aag aat 336
 Ser Asn Asn Ile Val Glu Arg Pro Lys Val Leu Phe Asn Lys Lys Asn
 100 105 110

caa gaa tac gtg atg tgg ttc cat tct gat agt tcc aac tat gga gct 384
 Gln Glu Tyr Val Met Trp Phe His Ser Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Ala
 115 120 125

gcc atg gtc ggt gtc gca act gcg aaa act ccc tgc ggc ccc tat aca 432
 Ala Met Val Gly Val Ala Thr Ala Lys Thr Pro Cys Gly Pro Tyr Thr
 130 135 140

ttc aaa ggc agc ttc aaa cct ctc ggc gca gat tct cgc gat gaa ggg 480
 Phe Lys Gly Ser Phe Lys Pro Leu Gly Ala Asp Ser Arg Asp Glu Gly
 145 150 155 160

ctg ttt cag gat gac gac tcc gca caa acc gcc tac ctt ctc tat gcc 528
 Leu Phe Gln Asp Asp Asp Ser Ala Gln Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ala
 165 170 175

tcc gat aac aac cag aac ttc aag ata tca agg ttg gat gac aac tat 576
 Ser Asp Asn Asn Gln Asn Phe Lys Ile Ser Arg Leu Asp Asp Asn Tyr
 180 185 190

tac aat gtg act gct cag gct agc gtt ttg acc ggt gcc aca ctt gaa 624
 Tyr Asn Val Thr Ala Gln Ala Ser Val Leu Thr Gly Ala Thr Leu Glu
 195 200 205

gca ccg ggc att gta aag cac agc gga aaa tac ttc cta atc gcc tcg 672
 Ala Pro Gly Ile Val Lys His Ser Gly Lys Tyr Phe Leu Ile Ala Ser
 210 215 220

cac acc agc gga tgg gct ccg aac cca aac aag ttc ttc tca gca tct 720

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

Pro Val Lys Val Asn Leu Asn Asn Gly Ala Asn Ser Ile Thr Phe Gly
420 425 430

tcc gga caa tcc aat tac gct gcc gac ctt gac aag att atc gtc tac 1344
Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ala Ala Asp Leu Asp Lys Ile Ile Val Tyr
435 440 445

tga 1347

<210> 10
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 10

Met Leu Trp Leu Arg Lys Val Ile Pro Val Phe Leu Ser Leu Val Val
1 5 10 15

Ala Ala Arg Ala Glu Thr Gln Ile Val Ser Gly Ala Ala Trp Thr Asp
20 25 30

Thr Ser Gly Asn Val Ile Gln Ala His Gly Ala Gly Ile Leu Lys Val
35 40 45

Gly Ser Thr Phe Tyr Trp Phe Gly Glu Asp Lys Thr Glu Asn Ser Ala
50 55 60

Leu Phe His Ala Val Ser Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Leu Thr Asn Trp
65 70 75 80

Thr Arg Gln Ser Asn Ala Leu Ser Pro Val Ala Asn Thr Met Ile Ser
85 90 95

Ser Asn Asn Ile Val Glu Arg Pro Lys Val Leu Phe Asn Lys Lys Asn
100 105 110

Gln Glu Tyr Val Met Trp Phe His Ser Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Ala
115 120 125

Ala Met Val Gly Val Ala Thr Ala Lys Thr Pro Cys Gly Pro Tyr Thr
130 135 140

Phe Lys Gly Ser Phe Lys Pro Leu Gly Ala Asp Ser Arg Asp Glu Gly
145 150 155 160

Leu Phe Gln Asp Asp Asp Ser Ala Gln Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ala
165 170 175

Ser Asp Asn Asn Gln Asn Phe Lys Ile Ser Arg Leu Asp Asp Asn Tyr
180 185 190

Tyr Asn Val Thr Ala Gln Ala Ser Val Leu Thr Gly Ala Thr Leu Glu
195 200 205

Ala Pro Gly Ile Val Lys His Ser Gly Lys Tyr Phe Leu Ile Ala Ser
210 215 220

His Thr Ser Gly Trp Ala Pro Asn Pro Asn Lys Phe Phe Ser Ala Ser
225 230 235 240

Ser Leu Ser Gly Pro Trp Ser Ser Gln Gln Asp Ile Thr Thr Ala Ser
245 250 255

Thr Arg Thr Trp Tyr Ser Gln Asn Ala Phe Asp Leu Pro Leu Gly Asn
260 265 270

Asn Ala Ile Tyr Met Gly Asp Arg Trp Arg Pro Ser Leu Leu Gly Ser
275 280 285

Ser Arg Tyr Ile Trp Tyr Pro Ile Asp Phe Ser Ser Gly Ser Pro Gln
290 295 300

Leu Val His Ala Asp Val Trp Ser Val Asn Pro Ser Ala Gly Thr Tyr
305 310 315 320

Thr Val Ala Gln Gly Thr Thr Tyr Glu Ala Glu Lys Gly Thr Leu Gly
325 330 335

Gly Ser Ser Lys Leu Leu Ser Asn Ser Gly Phe Ser Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Val Gly Tyr Leu Gly His Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Asn Val Gln
355 360 365

Gly Asn Gly Gly Ala His Trp Val Ala Ile Tyr Phe Ala Asn Gly Asp
370 375 380

Ser Thr Tyr Arg Asn Val Thr Val Ser Val Asn Gly Gly Ser Ser Val
385 390 395 400

Leu Val Asp Gln Pro Asp Ser Gly Gly Gly Gly Val Val Ile Ser Val
405 410 415

Pro Val Lys Val Asn Leu Asn Asn Gly Ala Asn Ser Ile Thr Phe Gly
420 425 430

Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ala Ala Asp Leu Asp Lys Ile Ile Val Tyr
435 440 445

<210> 11
<211> 1224
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1224)

<400> 11
 atg agg ttg cag aag gat ttc gat cga gtc atg ggc att atc ttg atg 48
 Met Arg Leu Gln Lys Asp Phe Asp Arg Val Met Gly Ile Ile Leu Met
 1 5 10 15

 att ctc att ctc gca atc ccc tcc ttg cag atc tgt aac aag tcg tac 96
 Ile Leu Ile Leu Ala Ile Pro Ser Leu Gln Ile Cys Asn Lys Ser Tyr
 20 25 30

 act gag ggc gac ccg gtc atc atc aac ccg gtc cct ggc ctc ccc gtc 144
 Thr Glu Gly Asp Pro Val Ile Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Val
 35 40 45

 gac ttc att cga ggt gtg gat gca tcg gaa gca ccc tgg atc atc gag 192
 Asp Phe Ile Arg Gly Val Asp Ala Ser Glu Ala Pro Trp Ile Ile Glu
 50 55 60

 ttg ggt ggc aag tac tac gac gag aac gga gtc gag agg gat ctc ttg 240
 Leu Gly Gly Lys Tyr Tyr Asp Glu Asn Gly Val Glu Arg Asp Leu Leu
 65 70 75 80

 gac atc ttg aag gaa aac ggc gtg aac tgg atc agg ctc cga gtg tgg 288
 Asp Ile Leu Lys Glu Asn Gly Val Asn Trp Ile Arg Leu Arg Val Trp
 85 90 95

 aac gat cct tat gac gaa cag ggt agg cct tat gga gga ggc aac tgt 336
 Asn Asp Pro Tyr Asp Glu Gln Gly Arg Pro Tyr Gly Gly Gly Asn Cys
 100 105 110

 gat ctc cct cgc atg acc gac ttc gca gca aag gcg aag gcg aaa ggc 384
 Asp Leu Pro Arg Met Thr Asp Phe Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Gly
 115 120 125

 ttc gga gtg ttg att gat ttc cac tat tcg gat tgg tgg gca gac ccc 432
 Phe Gly Val Leu Ile Asp Phe His Tyr Ser Asp Trp Trp Ala Asp Pro
 130 135 140

 tcg aaa cag tcg aag ccc aag gcc tgg gcc aac ctc tcg tac ccc gag 480
 Ser Lys Gln Ser Lys Pro Lys Ala Trp Ala Asn Leu Ser Tyr Pro Glu
 145 150 155 160

 ctc gtg gaa gcg gtc tat aac tgg acc tac aac gcg ttg aag tac atg 528
 Leu Val Glu Ala Val Tyr Asn Trp Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Tyr Met
 165 170 175

 gcc gag cac aac gca ttg ccc gat atg gtg cag atc gga aac gag att 576
 Ala Glu His Asn Ala Leu Pro Asp Met Val Gln Ile Gly Asn Glu Ile

180	185	190	
aac aac ggc ttc ctc tgg cct gat ggc tcg gca gcc aac tgg aca cag			624
Asn Asn Gly Phe Leu Trp Pro Asp Gly Ser Ala Ala Asn Trp Thr Gln			
195	200	205	
ttc gtc ggt ttg ttg aaa gca gcc att tcg gca gtg aaa gac gtg aac			672
Phe Val Gly Leu Leu Lys Ala Ala Ile Ser Ala Val Lys Asp Val Asn			
210	215	220	
ccc aac atc aag att gtc atc cat ctc gca gga gtc aag gcg gat ttc			720
Pro Asn Ile Lys Ile Val Ile His Leu Ala Gly Val Lys Ala Asp Phe			
225	230	235	240
tac atc aac ttc att gac agg ttg atc aac tcc gga gtc tcc ttc gac			768
Tyr Ile Asn Phe Ile Asp Arg Leu Ile Asn Ser Gly Val Ser Phe Asp			
245	250	255	
gtc atc gca atc tcg ttc tat ccc tat tgg cat ggt acc atg gac gac			816
Val Ile Ala Ile Ser Phe Tyr Pro Tyr Trp His Gly Thr Met Asp Asp			
260	265	270	
ttc agg aac ttg gtg cgc act ctc gtg cag agg tac gat aag aag atc			864
Phe Arg Asn Leu Val Arg Thr Leu Val Gln Arg Tyr Asp Lys Lys Ile			
275	280	285	
ctc gtc gca gag acc gcg tac gcc tgg acc ctc gat gat tcc gat gga			912
Leu Val Ala Glu Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Leu Asp Asp Ser Asp Gly			
290	295	300	
cac ccg aac att ttc ggt tcg agg gac ctc gag gtc aag gga ggt tac			960
His Pro Asn Ile Phe Gly Ser Arg Asp Leu Glu Val Lys Gly Gly Tyr			
305	310	315	320
aaa gcc tcg atc cag gga cag gcc tcg ttc atc cgg gac ctc atc gca			1008
Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Ala Ser Phe Ile Arg Asp Leu Ile Ala			
325	330	335	
gca ctc tac gag gag ggt aag gat aaa gca ctc ggc atc ttc tac tgg			1056
Ala Leu Tyr Glu Glu Gly Lys Asp Lys Ala Leu Gly Ile Phe Tyr Trp			
340	345	350	
ggt gca acc tgg att cct tat cct ggt gcc gga tgg aag act ggc gaa			1104
Gly Ala Thr Trp Ile Pro Tyr Pro Gly Ala Gly Trp Lys Thr Gly Glu			
355	360	365	
gga aac ccc tgg gag aac cag gca ttg ttc gac ttc aac ggt agg gcc			1152
Gly Asn Pro Trp Glu Asn Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asn Gly Arg Ala			

Asp Leu Pro Arg Met Thr Asp Phe Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Gly
115 120 125

Phe Gly Val Leu Ile Asp Phe His Tyr Ser Asp Trp Trp Ala Asp Pro
130 135 140

Ser Lys Gln Ser Lys Pro Lys Ala Trp Ala Asn Leu Ser Tyr Pro Glu
145 150 155 160

Leu Val Glu Ala Val Tyr Asn Trp Thr Tyr Asn Ala Leu Lys Tyr Met
165 170 175

Ala Glu His Asn Ala Leu Pro Asp Met Val Gln Ile Gly Asn Glu Ile
180 185 190

Asn Asn Gly Phe Leu Trp Pro Asp Gly Ser Ala Ala Asn Trp Thr Gln
195 200 205

Phe Val Gly Leu Leu Lys Ala Ala Ile Ser Ala Val Lys Asp Val Asn
210 215 220

Pro Asn Ile Lys Ile Val Ile His Leu Ala Gly Val Lys Ala Asp Phe
225 230 235 240

Tyr Ile Asn Phe Ile Asp Arg Leu Ile Asn Ser Gly Val Ser Phe Asp
245 250 255

Val Ile Ala Ile Ser Phe Tyr Pro Tyr Trp His Gly Thr Met Asp Asp
260 265 270

Phe Arg Asn Leu Val Arg Thr Leu Val Gln Arg Tyr Asp Lys Lys Ile
275 280 285

Leu Val Ala Glu Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Leu Asp Asp Ser Asp Gly
290 295 300

His Pro Asn Ile Phe Gly Ser Arg Asp Leu Glu Val Lys Gly Gly Tyr
305 310 315 320

Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Ala Ser Phe Ile Arg Asp Leu Ile Ala
 325 330 335

Ala Leu Tyr Glu Glu Gly Lys Asp Lys Ala Leu Gly Ile Phe Tyr Trp
 340 345 350

Gly Ala Thr Trp Ile Pro Tyr Pro Gly Ala Gly Trp Lys Thr Gly Glu
 355 360 365

Gly Asn Pro Trp Glu Asn Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asn Gly Arg Ala
 370 375 380

Leu Pro Ser Leu Lys Val Phe Arg Leu Val Tyr Glu Ala Gln Pro Val
385 390 395 400

Glu Ile Lys Pro Leu Glu Leu
 405

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13
ccctgtcga tgcatgtat c

21

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 14
atcctcaatt ccgtcggtcg a

21

<210> 15
<211> 309
<212> PRT
<213> Bacillus sp.

<400> 15

Ala Asn Ser Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Asn
1 5 10 15

Gly Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr
 20 25 30

Lys Asp Gln Ala Thr Thr Ala Ile Glu Gly Ile Ala Asn Thr Gly Ala
 35 40 45

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

Asp Ile His Thr Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Asp Asn His
65 70 75 80

Leu Val Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Tyr Asp Ser Ile
 85 90 95

Ala Ser Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Arg Ser Ala
 100 105 110

Leu Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp
 115 120 125

Phe Gly Ser Trp Glu Gly Asp Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala
 130 135 140

Ile Pro Arg Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Met Val Asp
145 150 155 160

Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Arg
 165 170 175

Glu Val Phe Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Ile His
 180 185 190

Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Gln Val Arg Thr Asn Ile
 195 200 205

Asp Arg Val Leu Asn Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly
 210 215 220

His Arg His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr
225 230 235 240

Ser Glu Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn
 245 250 255

Gly Pro Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ala Gly Asn
 260 265 270

Asn Leu Thr Ala Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Gly Pro Tyr Gly Leu
 275 280 285

Arg Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Gly Gly Gly Ser Asp
 290 295 300

Gly Gly Thr Ser Pro
305

RESUMEN

La presente invención se refiere a un método para producir un extracto de café que comprende utilizar una enzima con actividad de β -1,3-galactanasa y a un extracto de café que comprende al menos un 20% basado en el peso total de sólidos de café solubles de galactosa total.