



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Caracterización bioquímica de una endo-
 β –mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari)
(Coleoptera:Scolytinae)**

Carolina Aguilera Gálvez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2012

**Caracterización bioquímica de una endo-
β –mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari)
(Coleoptera:Scolytinae)**

Carolina Aguilera Gálvez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias - Biotecnología

Director:

Ph.D Ricardo Acuña Zornosa

Codirector:

Ph.D Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez

Línea de Investigación:

Mejoramiento Genético

Grupo de Investigación:

Mejoramiento genético - Cenicafé

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2012

A mis padres Alberto Aguilera García y Beatriz Gálvez de Aguilera, por ser mi mayor fuente de inspiración, mi principal orgullo y mi ejemplo a seguir. A ellos les debo todo lo que soy.

A mis hermanos por su cariño y apoyo incondicional.

A Fernando A. García Bastidas por caminar a mi lado y alcanzar este sueño conmigo.

Agradecimientos

Mis agradecimientos van dirigidos a todas las personas y entidades que de forma directa o indirecta hicieron posible la realización exitosa de esta investigación:

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (contrato #074/2007) por la financiación del proyecto que permitió la consecución de reactivos y materiales necesarios para el desarrollo de este trabajo. Al grupo de Mejoramiento Genético del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), por permitirme hacer parte de él y por facilitar mi formación como investigadora.

A mi director de tesis, el Dr. Ricardo Acuña Zornosa, por su apoyo incondicional, por su asesoría, y por todo el conocimiento brindado durante estos años.

A los Drs. Edison Osorio Durango y Carlos Muskus López, por su dedicación y por su contribución a mi formación científica.

A mis compañeros de trabajo y amigos de la vida: Beatriz E. Padilla Hurtado, Claudia P. Flórez Ramos, Claudia Valencia Vera y Jefferson Medina Olaya, Karent E. Bravo Muñoz, Eliana P. Velásquez y Nevar A. García Bastidas, por sus valiosos aportes en el desarrollo de la investigación y su grata amistad.

Principalmente a mis padres Alberto Aguilera y Beatriz Gálvez, a ellos les dedico todos mis triunfos. Gracias por su apoyo incondicional, por ser mi mayor fuente de inspiración y mi fortaleza. A mis hermanos y familiares que siempre han estado conmigo apoyando cada uno de mis pasos.

A Fernando A. García Bastidas, por caminar a mi lado, por compartir conmigo los buenos momentos, por apoyarme en las situaciones difíciles y por alcanzar este gran sueño conmigo.

Resumen

La broca del café *Hypothenemus hampei*, es el insecto más perjudicial para las plantaciones de café en el mundo. Se reproduce y alimenta exclusivamente la semilla de café, compuesta por carbohidratos que se encuentran disponibles en forma de polisacáridos o azúcares libres. El componente polisacárido está representado por galactomananos (25%), arabinogalactanos (17%), y celulosa (8%). Para poder asimilar estas moléculas complejas la broca requiere de un sistema hidrolítico que le permite transformarlas en moléculas simples que le aportan la energía necesaria para llevar a cabo su ciclo biológico. La enzima endo-1,4- β -mananasa identificada en el tracto digestivo del insecto, se encarga de la hidrólisis del galactomanano. La inhibición específica de esta enzima inhabilita al insecto para degradar este polisacárido y causa importantes efectos en la nutrición. En este trabajo se propuso la caracterización bioquímica de esta enzima y la evaluación de cinco compuestos, potencialmente inhibidores de la enzima. Los resultados obtenidos son un acercamiento importante para el control de este perjudicial insecto.

Palabras clave: Broca del café, *Hypothenemus hampei*, endo- β -mananasa, glicosil hidrolasas.

Abstract

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is the most important pest afflicting coffee crops worldwide. Reproduces and feeds exclusively on the mature endosperm of the coffee seed, consisting of carbohydrates available in the form of polysaccharides or sugars. The polysaccharide component is represented by galactomannans (25%), arabinogalactans (17%) and cellulose (8%). In order to assimilate these complex molecules the insect requires a hydrolytic system that allows transform them into simple molecules that provide the energy necessary to carry out their life cycle. The enzyme endo-1,4- β -mannanase identified in the insect's mid gut is responsible for the hydrolysis of galactomannan. The specific inhibition of this enzyme disables the insect to degrade this polysaccharide and causes a major impact on nutrition. This paper proposed the biochemical characterization of this enzyme and evaluation of five compounds, potential inhibitors of the enzyme. The results are an important approach for controlling the harmful insect.

X

Caracterización bioquímica de una endo- β –mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Keywords: Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, endo- β -mannanase, glycoside hydrolase.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 Generalidades del cultivo del café	5
1.2 Composición química del grano de café	6
1.2.1 Los galactomananos de grano de café.....	7
1.2.2 Enzimas responsables de la degradación del galactomanano del café	8
1.3 Generalidades de la broca del café <i>Hypothenemus hampei</i>	10
1.4 Endo-1,4- β -mananasa de la broca de café	11
1.5 Alternativas de control de insectos inhibidores enzimáticos	13
1.6 Inhibidores de glicosil hidrolasas.....	14
2. Artículo 1	19
3. Artículo 2	39
4. Conclusiones y recomendaciones	57
4.1 Conclusiones	57
4.2 Recomendaciones.....	58
A. Anexo: secuencia de nucleótidos del gen la endo-1,4-β-mananasa de la broca del café <i>hypothenemus hampei</i> (HhMan).no accesión: gv661326.1	59
B. Anexo: secuencia de aminoácidos de la proteína endo-1,4-β-mananasa de la broca del café <i>Hypothenemus hampei</i> (HhMan) no accesión: ADF22325.1 producto de amplificación del gen <i>HhMan</i>.	61
C. Anexo: Producto de amplificación del gen <i>HhMan</i>.	63
D. Anexo: PCR de colonias transformadas con pPiczaA- HhMan empleando los primers aox1.	65
E. Anexo: Análisis De Restricción De La Construcción Ppiczaa/Hhman.	67

Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Bibliografía69

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Esquema de la acción enzimática de las diferentes enzimas involucradas en la hidrólisis del galactomanano. Las flechas representan los enlaces glicosídicos reconocidos por las enzimas β - mananasa (GH5) y α - galactosidasa (GH27) (van Zyl et al., 2010).....	9
Figura 1-2: Clasificación de secuencias por función putativa de la librería de trectos digestivos de larvas L2 de <i>Hypothenemus hampei</i> . Endo-1,4- β -mananasa de la broca del café.....	11
Figura 1-3: Análisis filogenético del gen de la endo- β -mananasa de la broca HhMan1 (rojo) comparada con homólogos de organismos: bacterias (negro), hongos (azul), animales (violeta) y plantas (verde). Los números de accesoión del GenBank se encuentran adyacentes a cada gen y los valores de bootstrap se encuentran en las ramas claves (Acuña et al., 2012).....	12
Figura 1-3: Estructuras más habituales de los glicomimeticos sintetizados	15
Figura 1-5: Estructura química del primer alcaloide polihidroxiado de origen natural.	16
Figura 1-6: Estructura de 1-deoximanojirimicina, análogo estructural de D- manosa.....	16
Figura 1-7: Glicomiméticos postulados como potenciales inhibidores de β -mananasa.....	16
Figura 2-1: Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la endo-1,4-β-mananasa de <i>Hypothenemus hampei</i> con otras mananasas GH5. Los residuos de aminoácidos idénticos o similares se señalan en negro o gris respectivamente. Los residuos acido glutámico y los residuos del sitio activo altamente conservados se indican en asterisco (*) debajo del alineamiento. Las regiones de la proteína HhMan con estructura secundaria tipo α -hélices o laminas β -plegadas de muestran sobre del alineamiento.....	30
Figura 1-7: A) SDS-PAGE de la proteína pura rHhMan. M: Marcador de peso molecular. C: Control, medio extracelular de <i>Pichia pastoris</i> con el vector pPICZ α A (sin inserto), I: Medio extracelular de <i>Pichia pastoris</i> con el vector pPICZ α A-HhMan (con inserto), NR: Fracción no retenida en la matriz, L1: lavado 1, L2: lavado 2, e1: Eluido 1 rHhMan purificada. B) Gel no desnaturalizante o PAGE y zimograma de la rHhMan purificada. Tres concentraciones de rHhMan (1, 1.5 y 2 μ g) se cargaron en geles nativos (12%). Panel izquierdo corresponde al gel en ausencia de sustrato goma guar y teñido con Azul de Coomassie R-250 para visualizar la banda	

correspondiente a la mananasa (35.5 kDa). Panel derecho corresponde al gel en presencia de sustrato goma guar al 1%, y teñido con rojo congo para verificar la actividad de la enzima.31

Figura 1-7: Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de rHhMan. (A) Efecto del pH en la actividad rHhMan. (B) Efecto de la temperatura en la actividad rHhMan. Las evaluaciones se realizaron por triplicado empleando como sustrato goma guar al 1% en buffer citrato de sodio 1M, pH 5.5.32

Figura 1-7: Cromatografía en capa fina (CCF) de los productos de hidrólisis generados por acción de la rHhMan sobre mananos y mano-oligosacáridos. Las reacciones conteniendo los respectivos sustratos disueltos en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5) y 0,4 μ g de rHhMan se incubaron a 30°C durante 24 h y 2 μ l de cada reacción se analizaron en los platos de CCF. Los sustratos fueron: A) Goma Guar, B) Goma de algarrobo y C) Mano-oligosacáridos: Manobiosa, manotriosa y manotetraosa. D) Mano-oligosacárido: Manopentosa. Se indican los tiempos de incubación (minutos o horas). Como estándar se utilizó una mezcla de manosa a manopentosa donde M1 corresponde a manosa, M2, manobiosa; M3, manotriosa; M4, manotetraosa y M5 manopentosa.33

Figura 1-7: Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk de rHhMan. A) Grafica de Michaelis-Menten con para el sustrato goma guar. B) Grafica de Lineweaver-Burk para el sustrato goma guar. Las evaluaciones se realizaron bajo el ensayo de actividad enzimática estándar en condiciones óptimas de pH y temperatura obtenidos del experimento mostrado en la figura 3.34

Figura 3-1: Estructura química de los compuestos empleados en los ensayos de inhibición de rHhMan. **Compuesto 1:** 4-nitrofenil- β -D-manopiranosido, **compuesto 2:** 4-metillumberiferil- β -D-manopiranosido, **compuesto 3:** 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido, **compuesto 4:** 1, 3, 4, 6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosido, **compuesto 5:** 1-deoximanojirimicina hidrocloreuro.....49

Figura 3-2: Evaluación de la inhibición de rHhMan por cromatografía en capa fina. a) Compuesto 1 b) Compuesto 2, c) Compuesto 4, d) Compuesto 5, e) Compuesto 3. En cada placa se incluyen una mezcla de mano oligosacáridos (manosa-manopentosa) (st), diferentes concentraciones de compuesto evaluado **1:**0.25 mM **2:** 0.5 mM. **3:**1 mM. Cada reacción enzimática se realizó en presencia de 0.05 μ g de rHhMan pura y 25 mM de manopentosa disuelto en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5).50

Figura 3-3: Representación esquemática del mecanismo catalítico propuesto para HhMan Mecanismo de retención de la enzima, en la cual el oxígeno glicosídico es protonado por Glu147 (donador de protones) y el carbono anomérico es atacado por Glu242 (Nucleófilo). El intermediario resultante manosil-mananasa es hidrolizado por una molécula de agua, generando un producto con la misma configuración anomérica del sustrato. Modificado de (Hilge et al., 1998).51

Figura 3-4: Vista comparativa de a) Estructura de HhMan modelada por homología. b) Estructura de la endo-1,4- β -mananasa de *Bacillus sp.* (PDBID:3JUG) obtenida por cristalografía de rayos X. Se señalan ocho residuos estrictamente conservados en proteínas de la familia GH5..... 51

Figura 3-5: Resultado del docking molecular. Se presentan las conformaciones de unión de: a) El sustrato manopentosa, b) compuesto 1, c) compuesto 2, d) compuesto 3, e) compuesto 4, f) compuesto 5, interactuando con los residuos del sitio activo de la estructura modelada de HhMan 52

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Variedades de Café cultivadas en Colombia.....	6
Tabla 1-2: Composición del grano de café (Fischer et al., 2001).	7

Introducción

El café (*Coffea sp.*) es uno de los productos primarios más valiosos como fuente de divisas para los países en desarrollo después del petróleo. El cultivo, procesamiento, transporte y comercialización del café proporciona empleo a millones de personas en todo el mundo. Este producto tiene una importancia crucial para la economía y la política de muchos países en desarrollo. Para muchos de los países menos adelantados, las exportaciones de café representan una parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80% (ICO, 2012).

Colombia es uno de los principales países productores de café con exportaciones de alrededor de siete millones y medio de sacos anuales, según el último reporte generado desde Marzo de 2011 a Febrero del 2012 por la Organización Internacional del café (ICO, 2012). Adicionalmente, el cultivo de café proporciona sustento para 450.000 familias cafeteras colombianas, representa más de un tercio del empleo rural y una quinta parte del producto agrícola (Duque et al., 2003). Por esta razón, cualquier problema que afecte el cultivo del café es de especial significancia para la economía colombiana (Bustillo, 2008).

El cultivo del café en Colombia se había mantenido libre de problemas de insectos a través de toda su historia como explotación comercial. Solamente se habían registrado ataques esporádicos de algunos insectos y ácaros (Bustillo, 2008) que no se han convertido en plagas de importancia, debido a que el ecosistema cafetero es bastante estable y biodiverso, lo cual favorece el desarrollo de fauna benéfica, que contribuye al mantenimiento del equilibrio de las plagas presentes. Esta situación de equilibrio se ha visto afectada por la aparición de la broca del café *Hypothenemus hampei*. La broca es una plaga exótica originaria de la zona ecuatorial del África probablemente de Etiopía, e introducida accidentalmente al continente americano (Brasil) en 1913 (Bergamin, 1943). Este insecto, al llegar a un lugar con condiciones favorables, desarrolla todo su potencial biótico sin ninguna restricción, alcanzando altos niveles de población debido principalmente a la carencia de agentes de control. El daño que ocasiona consiste en perforaciones a los frutos y a una caída prematura cuando el ataque se realiza sobre cerezas jóvenes. Cuando ataca frutos de dos meses de edad, más del 50 % de los frutos atacados se caen y muchos de ellos toman un color característico

de madurez; pero si el ataque ocurre después de los tres meses de edad, la caída de frutos es menor al 23,5 % (Jaramillo et al., 2006).

La pérdida de peso del café pergamino seco por causa de la broca es de 18,1% en promedio y los frutos que son atacados tempranamente se maduran antes de tiempo, lo cual repercute en un manchado del pergamino de los granos sanos (Bustillo, 2008). Sin embargo, la disminución del valor comercial del producto no es debida únicamente a la pérdida de peso del grano, sino también a la disminución de su calidad que afecta el sabor de la bebida.

El uso de insecticidas para el control de *H. hampei* como única medida de manejo no es recomendable. Esta práctica ampliamente usada en otros países de América que sufren de ataques de este insecto tiene muchos inconvenientes; uno de ellos consiste en que la broca, una vez en el interior de los frutos, no es afectada por insecticidas, por tanto, estos deben usarse sólo cuando los adultos se encuentren entrando en nuevos frutos (Damon, 2000). El control químico se dificulta aún más, debido a que en Colombia el café presenta múltiples floraciones como respuesta a las condiciones climáticas en zonas como el eje cafetero, lo que implica un incremento considerable en la frecuencia de las aspersiones con insecticidas. Por si fuera poco, esta situación se hace más compleja debido a que el caficultor no tiene tradición sobre el uso de insecticidas y a que en las zonas cafeteras los hogares de alrededor de 500.000 familias se encuentran entre los cafetales, y por lo tanto expuestos a estas aspersiones.

Finalmente, se ha demostrado el caso de resistencia de la broca a insecticidas organoclorados. *H. hampei* contiene una mutación en el gen *Rdl* que codifica para una subunidad del receptor del ácido γ -aminobutírico (neurotransmisor GABA) el cual es responsable de activar los canales de cloro durante la sinapsis. Esta mutación le confiere resistencia al insecticida endosulfán y se encuentra en la broca que ha invadido Colombia, en donde se ha descrito parcialmente esta resistencia (Navarro et al., 2010)

Todo lo anterior hace que el impacto de la broca sea catalogado como el problema fitosanitario número uno en Colombia, no sólo por la extensión del área afectada y la importancia del cultivo, sino por los hábitos mismos de la plaga que hacen difícil su control. Como consecuencia de lo anterior es necesario utilizar todas las herramientas que permitan el control de este insecto y para ello, en el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé), se ha desarrollado un programa para el manejo integrado de la broca (MIB) que incluye una serie de medidas de control

(culturales, biológicas y químicas) y prácticas agronómicas que tienen como objetivo la reducción de las poblaciones de la broca en los cafetales a niveles que no generen un impacto económico importante y que permitan la producción de café tipo exportación en forma competitiva. Sin embargo, y a pesar de la disponibilidad de este programa, la broca del café continua siendo un grave problema para la caficultura y por esta razón existe la necesidad de buscar estrategias novedosas de control. Una de estas estrategias se relaciona con la identificación y caracterización de genes involucrados en procesos de importancia para el ciclo de vida del insecto que puedan ser utilizados como blancos específicos de inhibición..

1. Marco teórico

1.1 Generalidades del cultivo del café

El café es un cultivo nativo de Etiopía, que pertenece a la Clase Angiosperma, Orden Rubiales, Familia Rubiaceae, Tribu Coffeae y Género *Coffea*. *Coffea* es el género más importante de las Rubiáceas y agrupa 103 especies (Davis et al., 2006). *Coffea arabica* (*Arabica*) y *Coffea canephora* (*Robusta*) son las especies de café más importantes, ya que representan el 70% y 30% del café comercial respectivamente.

Todas las variedades de *Coffea arabica* cultivadas en el mundo se derivan de las variedades introducidas *Coffea arabica* var. *Arabica* (sinónimo var. *Typica*) y *Coffea arabica* var. *Bourbón* (Mondego et al., 2011).

América, es la primera región productora mundial de café. En Sudamérica, se producen cafés de muchas variedades. Los principales países productores en esta región son: Brasil, el cual es el principal exportador mundial con una producción de *Coffea arabica* (*Arabica*) del 80% y *Coffea canephora* del 20%, por lo tanto tiene todos los tipos de café; Colombia produce como monocultivo variedades exclusivamente de la especie *Coffea arabica*, que se caracterizan por ser cafés suaves, con bajo contenido de cafeína, con mucho cuerpo, acidez moderada y ligero sabor a cacahuete (Bertrand et al., 2008). La primera variedad cultivada en Colombia hace 170 años fue la variedad *Típica* y a finales de la década de los 20 se introdujo la variedad *Bourbon* por su alto rendimiento de producción. Después de 1952 se introdujo la variedad *Caturra* desde Brasil y a mediados de la década de los 80 se inició con el cultivo de la variedad *Colombia*, desarrollada en Cenicafé, proveniente de la variedad *Caturra* y el *Híbrido de Timor*. Este material presenta porte bajo, resistencia a la roya del cafeto, así como la variedad *Tabi* que es una variedad de porte alto a diferencia de la variedad *Colombia*. Posteriormente en el año 2005 Cenicafé liberó la variedad

Castillo® y las variedades *Castillo*® regionales, siendo estas una variedad mejorada de la variedad *Colombia* (Alvarado et al., 2005). En la tabla 1 se indican las principales variedades de café introducidas en Colombia y sus principales características.

Tabla 1-1: Variedades de Café cultivadas en Colombia

Variedad	Características
<i>Típica</i>	Es susceptible a la roya. Se siembran hasta 2.500 árboles por hectárea.
<i>Bourbon</i>	Es un árbol que produce 30% más que una <i>Típica</i> , e igualmente es susceptible a la roya.
<i>Tabi</i>	Es una variedad de grano grande, de excelente calidad e ideal para la obtención de cafés especiales. Se siembran hasta 3.000 plantas por hectárea.
<i>Caturra</i>	Es susceptible a la roya.
<i>Colombia</i>	Gracias a su variedad genética, posee una resistencia durable al ataque de la roya.

1.2 Composición química del grano de café

El café es considerado como uno de los productos de consumo más complejos desde el punto de vista de su química. No solamente por la gran cantidad de compuestos químicos contenidos en los granos de café, sino también porque estos compuestos reaccionan e interactúan en todas las etapas del procesamiento para la obtención de una taza de café con una gran diversidad y complejidad de estructuras (Bertrand et al., 2008).

El grano de café está constituido principalmente por carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos orgánicos (Tabla 2). Los carbohidratos son compuestos de gran importancia en el grano, debido no solo a su alta concentración sino también porque participan como precursores del aroma, mejoran la calidad organoléptica de la bebida de café contribuyendo a su viscosidad y espesor, y participan en la formación de sedimentos de la viscosidad del extracto durante la fabricación del café soluble; además experimentan complejos cambios en el proceso de tostación que favorecen la formación de las características organolépticas de la bebida (Arya et al., 2007).

En el grano de café, los carbohidratos están disponibles en forma de polisacáridos que hacen parte de la pared celular de la semilla (50%), o como azúcares de bajo peso molecular dentro de los

cuales se encuentran los trisacáridos, disacáridos y monosacáridos. La sacarosa es el principal carbohidrato de bajo peso molecular (5-10%).

El componente polisacárido está representado por mananos o galactomananos (25%), arabinogalactanos (17%) y celulosa (8%); de los tres, la fracción de mananos es la más insoluble en agua confiriéndole al grano de café maduro su dureza característica (Redgwell et al., 2006).

El manano se encuentra como polímero de almacenamiento de carbohidratos en las semillas de leguminosas y coníferas y desempeña un papel estructural (Fischer et al., 2001; Liepman et al., 2007).

Tabla 1-2: Composición del grano de café (Fischer et al., 2001).

Componente	% de Materia seca
Carbohidratos simples y complejos	50 – 60
Proteínas y aminoácidos	12 – 15
Lípidos	13
Ácidos	8
Cafeína	1

1.2.1 Los galactomananos de grano de café

Los galactomananos son polisacáridos que están presentes en las paredes celulares de los tejidos de almacenamiento de las semillas (como el endosperma, cotiledones) y hacen parte del grupo de polisacáridos de almacenamiento. En el grano de café verde, funcionan como un polisacáridos de almacenamiento, pues su estructura lineal y su bajo peso molecular, permite cerrar el paquete y generar la alta densidad de las paredes celulares del grano (Redgwell et al., 2006). Están formados por una cadena principal de manosas unidas entre sí por enlaces β -(1,4) glicosídicos. En la mayoría de los casos con ramificaciones de unidades de galactosa unidas a las manosas por un enlaces α -(1,6) glicosídicos (Parvathy et al., 2005) (Figura.1).

El contenido de galactosa es variable en los diferentes galactomananos distribuidos en la naturaleza. En el grano de café verde y tostado se han reportado relaciones galactosa/manosa entre 1:130 y 1:30 (Fischer et al., 2001), y se ha demostrado que el grado de sustituciones de galactosa tiene importantes consecuencias en la solubilidad del polímero (McCleary et al., 1981). Muestra de ello son la goma guar y la goma de algarrobo, en donde se refleja que un mayor contenido de

ramificaciones galactosa en el esqueleto principal del galactomanano incrementa la solubilidad de la goma. De esta manera la goma guar posee una relación galactosa/manosa de 1:2 y es más soluble que la goma de algarrobo que posee una relación galactosa/manosa de 1:4.

1.2.2 Enzimas responsables de la degradación del galactomanano del café

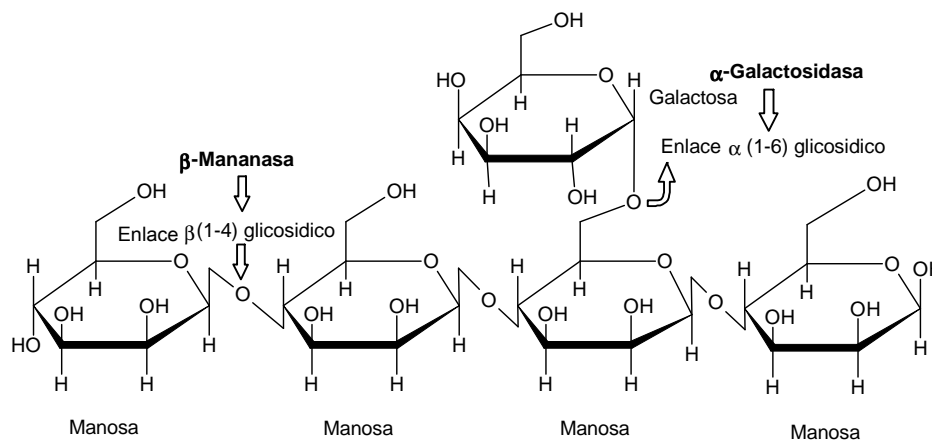
Los mananos son polisacáridos hemicelulósicos muy extendidos en las paredes celulares de las plantas, y pueden tener un papel estructural importante. Las principales enzimas responsables de la degradación de los galactomananos presentes en el endospermo de las plantas son la β -mananasa (EC 3.2.1.78), la β -manosidasa (EC 3.2.1.25) y la α -galactosidasa (EC 3.2.1.22). La primera es una enzima de tipo endo-hidrolasa responsable de la hidrólisis interna y aleatoria de la estructura principal de los mananos. Por el contrario, la β -manosidasa y la α -galactosidasa son enzimas del tipo exo-hidrolasa y actúan en los extremos (generalmente no reducidos) de la cadena de polisacáridos sobre los enlaces β -1,4-glicosídicos y α -1,6-glicosídico respectivamente (van Zyl et al., 2010).

Con base en la similaridad en su secuencia, las enzimas que degradan estructuras del tipo manano, se agrupan en las familias 5 (β -mananasa y β -manosidasa) y 27 (α -galactosidasa) de las glicosil hidrolasas (GHs) (Cantarel et al., 2009). Son familias que comprenden enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y una molécula que no sea carbohidrato. En la Figura 1, se esquematiza la acción de dos de estas enzimas sobre la estructura del galactomanano.

En muchas especies de plantas, incluyendo el café, se ha detectado actividad mananasa en el endospermo de las semillas durante el proceso de germinación, debido a que estas semillas hidrolizan el manano durante la germinación de la semilla, facilitando la emergencia de la radícula y liberando pequeñas cantidades de oligosacáridos que serán usados posteriormente como fuente de energía para el crecimiento de la plántula. (Iglesias-Fernández et al., 2011). Igualmente enzimas con actividad mananasa capaces de degradar el manano presente en la naturaleza se han aislado a partir de una amplia variedad de microorganismos como bacterias y hongos. En las bacterias, la degradación está concentrada en las especies Gram-positivas, que incluyen los géneros *Bacillus* y

Clostridium y algunas pocas Gram-negativas tales como *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Bacterioides*. También se registra que bacterias actinomicetes del grupo de las estreptomicetes son capaces de degradar estas estructuras. En los hongos, las mananasas más activas se encuentran en los géneros *Aspergillus*, *Agaricus*, *Trichoderma*, *Sclerotium* (Dhawan et al., 2007).

Figura 1-1: Esquema de la acción enzimática de las diferentes enzimas involucradas en la hidrólisis del galactomanano. Las flechas representan los enlaces glicosídicos reconocidos por las enzimas β - mananasa (GH5) y α - galactosidasa (GH27) (van Zyl et al., 2010)



En los últimos años se ha incrementado el número de enzimas del tipo mananasa identificadas en plantas (Lin et al., 2011) y en animales superiores (Xu et al., 2002; Zahura et al., 2011)

El potencial de las mananasas en la industria radica en su capacidad para hidrolizar los polisacáridos de la biomasa vegetal, brindando de esta manera un mecanismo para recuperar los azúcares solubles de estos biopolímeros (Moreira et al., 2008). Las mananasas se utilizan en el tratamiento de frutas y vegetales para su manufactura y clarificación de jugos o para la extracción de aceites (Jørgensen et al., 2010); facilitan el blanqueamiento en la industria de la pulpa y el papel (van Zyl et al., 2010); y el procesamiento de fibras industriales (Palackal et al., 2007).

En la industria de café soluble, la mananasa también se puede utilizar para reducir la viscosidad del extracto en la producción de café instantáneo, mejorando la eficacia del proceso de la concentración y reduciendo los costos del secado (Delgado et al., 2008).

1.3 Generalidades de la broca del café *Hypothenemus hampei*

La broca del café es un coleóptero negro de tamaño aproximado de 2 mm de largo (Jaramillo et al., 2006). Es la principal plaga de café y se encuentra presente en casi todas las regiones cafeteras del mundo. Su amplia distribución local, regional e intercontinental puede explicarse por medio de una activa migración (vuelo de hembras), de una pasiva extensión (transporte de animales adultos a través del viento) y desplazamiento a través del hombre.

Es una plaga monófaga cuyos únicos hospederos pertenecen al género *Coffea*. Se alimenta y permanece en el interior del fruto durante un ciclo de vida que puede oscilar entre 24 y 45 días e incluye un estado de huevo, varios estadios larvales, un estado de pupa y uno de adulto. Estos hábitos impiden el control del insecto a través de insecticidas o con el uso de enemigos naturales, causando daños no solo relacionados con la pérdida de frutos, sino también con la disminución del valor comercial del producto por reducción de peso del grano y con la disminución de la calidad que afecta el sabor del café (Damon, 2000; Jaramillo et al., 2006).

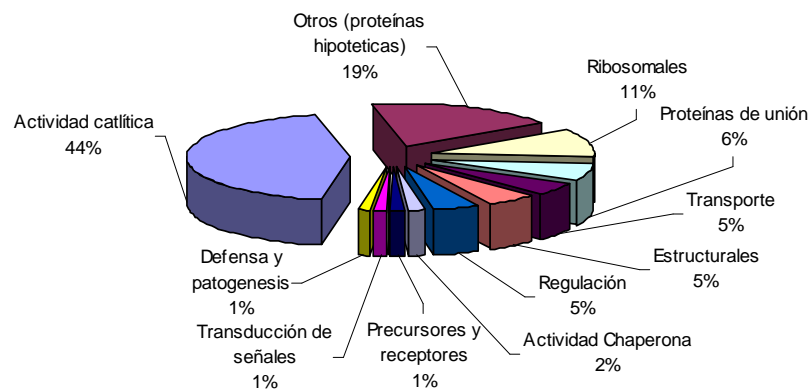
La búsqueda de sistemas vulnerables en la fisiología del insecto puede ser el centro para el desarrollo de alternativas tecnológicas tendientes al control de las poblaciones de broca. En la actualidad no hay registros acerca de la identificación y caracterización de genes asociados con los procesos digestivos de la broca. Las etiquetas de secuencias expresadas (ESTs, por su sigla en inglés) ha revolucionado el descubrimiento de genes en diferentes especies (Adams et al., 1991) y la secuenciación de un número representativo de ESTs en el tracto digestivo de la broca, permitió la identificación de los principales genes que codifican las enzimas encargadas de la digestión del grano de café. Siendo esta información de vital importancia para el desarrollo de nuevas estrategias de control de insectos plaga teniendo como blancos específicos la fisiología digestiva del insecto (Haq et al., 2004).

En un trabajo realizado en Cenicafé (Flórez et al., 2005), se identificaron y caracterizaron las principales enzimas digestivas de la broca del café mediante librerías de ADN complementario (ADNc) de los genes expresados en el tracto digestivo del insecto, basados en los sitios catalíticos enzimáticos predichos y en análisis de similitud. A las secuencias con identidad significativa se les

asignó una función putativa, el 44% de las secuencias presentaron actividad catalítica destacando de este grupo 124 secuencias que posiblemente participan en los procesos digestivos y de detoxificación de los componentes del grano de café.

Las Glicosidasas de la familia 5, 10, 14, 15, 21, 24, 28, 31, 78 y 91 son secuencias predominantes en el tracto digestivo de la broca y todas se relacionan con la digestión de los carbohidratos presentes en el grano de café (Flórez et al., 2005). También se encontraron proteasas de las familias cisteína proteasa y serina proteasa, enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. En la semilla de café el contenido de proteínas (12%) no es tan alto como en otras dicotiledóneas, como las leguminosas, pero es una fuente importante de aminoácidos para la dieta del insecto. Las otras secuencias se clasificaron en los siguientes grupos: proteínas hipotéticas, de unión al ADN, ribosomales, de transporte, estructurales, de regulación, con actividad chaperona, de defensa y de patogénesis (Figura. 2).

Figura 1-2: Clasificación de secuencias por función putativa de la librería de tractos digestivos de larvas L2 de *Hypothenemus hampei*. Endo-1,4- β -mananasa de la broca del café



1.4 Endo-1,4- β -mananasa de la broca de café

Con base en los resultados del análisis de la librería de tractos digestivos de broca, se identificó por primera vez en el genoma de un insecto un gen de 966 pares de bases que codifica para una enzima del tipo endo-1,4- β -mananasa (Numero de patente 7678556).

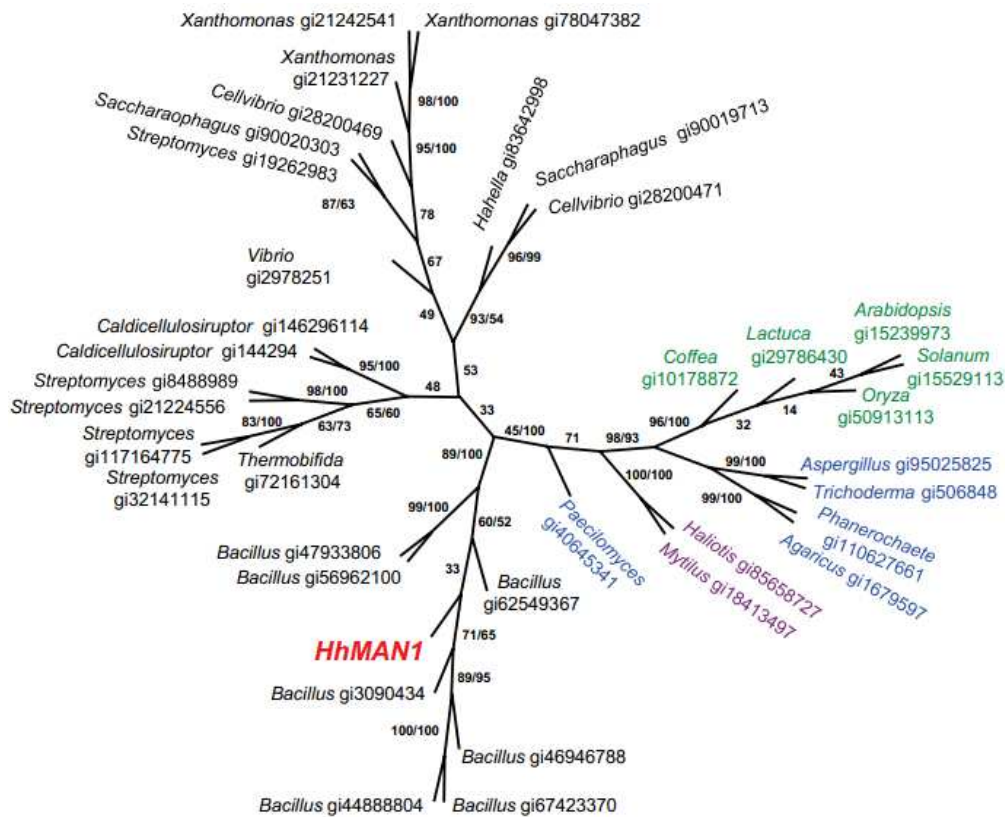
Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Mediante un análisis filogenético se confirmó la cercanía del gen de la mananasa de *H. hampei* con homólogos de origen bacteriano, específicamente con el género *Bacillus* y no como se podría esperarse con genes de este tipo de origen eucariótico superior (Figura. 3). Esta es la primera mananasa identificada en el genoma de un insecto, con actividad hidrolítica frente a los principales polisacáridos del grano de café. Los ancestros de la broca debieron tener contacto simbiótico con una bacteria capaz de digerir el manano del café y de esta relación algunos individuos incorporaron en su genoma el gen responsable de la degradación de este carbohidrato necesario para su nutrición. Es el resultado de una transferencia horizontal de genes entre una bacteria y un insecto, que le otorga una ventaja adaptativa que le permite al insecto digerir directamente el manano presente en su único hospedero (el grano de café) sin necesidad de mantener a otro organismo. (Acuña et al., 2012).

La enzima HhMan, cataliza la hidrólisis de los enlaces β -(1,4)-glicosídicos de la estructura del galactomanano, principal polisacárido del grano de café y único alimento de la broca. Por medio de esta hidrólisis se libera manosa, la cual es absorbida y utilizada por el insecto en procesos de crecimiento y desarrollo.

Partiendo de todo lo anterior es válido pensar que la inhibición de la actividad catalítica de esta enzima podría limitar la nutrición del insecto, tal y como sucede con la inhibición de otras enzimas hidrolíticas que degradan polisacáridos importantes de la pared celular como es el caso de las α -amilasas. Los inhibidores de α -amilasa interfieren con las enzimas digestivas de los insectos, y por lo tanto hacen la digestión menos eficiente, pudiendo interferir de esta manera con el crecimiento y desarrollo de los insectos (de Azevedo Pereira et al., 2006; Viktorinova et al., 2011).

Figura 1-3: Análisis filogenético del gen de la endo- β -mananasa de la broca HhMan1 (rojo) comparada con homólogos de organismos: bacterias (negro), hongos (azul), animales (violeta) y plantas (verde). Los números de accesoión del GenBank se encuentran adyacentes a cada gen y los valores de bootstrap se encuentran en las ramas claves (Acuña et al., 2012)



1.5 Alternativas de control de insectos inhibidores enzimaticos

Todas las plantas poseen un grado de resistencia a insectos fitófagos. Esta resistencia inherente se basa en diferentes mecanismos de defensa que incluyen un amplio rango de metabolitos secundarios producidos por la planta y que resultan nocivos para los insectos. Cada planta de cada género e incluso de cada especie posee un nivel de resistencia individual y estas características particulares son utilizadas en el mejoramiento genético de plantas para obtener cultivos con variedades resistentes a las insectos.

Hoy, los transgenes con resistencia a insectos, de una planta, una bacteria o de cualquier otro origen pueden introducirse a las plantas para aumentar el nivel de resistencia. Esta técnica se ha convertido en una alternativa moderna y atractiva que ofrece algunas ventajas frente a los insecticidas químicos utilizados como estrategia de control de insectos plaga. Los transgenes introducidos por transformación genética son biodegradados más fácilmente que los insecticidas químicos, son más selectivos frente a insectos específicos, reducen la exposición del operador a las toxinas y pueden reducir el daño ecológico causado por los insecticidas.

Los primeros resultados relevantes obtenidos con ingeniería genética de plantas se obtuvieron empleando una proteína parasporal o cuerpo de inclusión (cristal) producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que a su vez contiene uno o mas tipos de pro d-endotoxinas con amplio espectro de actividad (Coleópteros, Lepidópteros). Estas toxinas han sido transferidas al menos a 26 especies diferentes de plantas (Héma et al., 2009).

Una alternativa en aumento diferente a *Bt* es la transformación genética con genes que codifican para inhibidores enzimáticos y la mayoría de estos tienen como blanco específico enzimas del sistema digestivo del insecto (proteinasas e inhibidores de amilasa). Por esta razón la búsqueda de inhibidores enzimáticos con diferentes modos de acción y potencia, se convierte en una estrategia usada por los investigadores para identificar nuevos genes que puedan mejorar las estrategias de control disponibles (Barbosa et al., 2010).

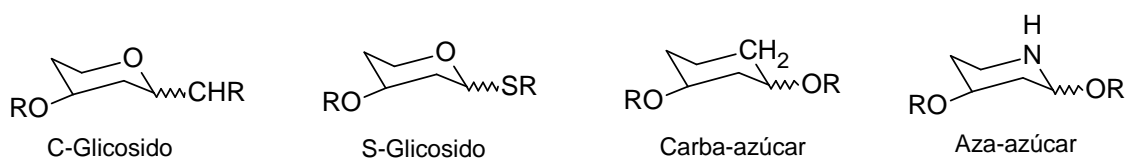
Los inhibidores enzimáticos son compuestos que se unen a las enzimas disminuyendo su actividad. Se denominan análogos del estado de transición ya que la mayoría de estos compuestos imitan la configuración del estado transicional (Ts) de los sustratos naturales y como consecuencia, los inhibidores se unen al enzima más fuertemente que el sustrato natural, con afinidades de 10^2 y 10^5 veces superior. El estado de transición representa a los reactivos en su estado activo, cuando se ha superado una barrera de energía potencial para que los reactivos puedan convertirse en productos.

1.6 Inhibidores de glicosil hidrolasas

Los inhibidores de glicosil hidrolasas (GHs) son compuestos muy atractivos para la síntesis química, no sólo porque sirven como herramienta para el estudio de las funciones biológicas de los oligosacáridos, sino también por su potencial como fármacos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades en las que intervienen los carbohidratos. Principalmente los inhibidores de las GHs son análogos de sus sustratos naturales y tienen la capacidad de mimetizar el comportamiento de dichos sustratos. Este tipo de compuestos fueron denominados glicomiméticos y se pretende que sean moléculas que no cambien su afinidad por el centro activo de las enzimas. En su síntesis la mayoría de las modificaciones han sido realizadas sobre la funcionalidad acetálica del carbono anomérico de los carbohidratos, de forma que se obtiene una mayor estabilidad frente a la ruptura de este enlace, pero sin modificar su afinidad por el centro activo de la enzima.

Así, podemos encontrar compuestos con una sustitución de los oxígenos endo ó exo-cíclicos del azúcar tanto por un átomo de carbono como por un heteroátomo, siendo las estructuras más habituales los C-glicósidos, los S-glicósidos, los carba-azúcares y los aza-azúcares o iminoazúcares (Figura. 4).

Figura 1-4: Estructuras más habituales de los glicomimeticos sintetizados



Los C-glicosidos y los S-glicosidos son compuestos en los que el oxígeno exocíclico ha sido reemplazado por un átomo de carbono o azufre respectivamente. Como consecuencia, estos compuestos presentan una mayor resistencia a la hidrólisis ácida y enzimática, pero una actividad biológica similar, e incluso en algunos casos superior a sus oligosacáridos correspondientes. Por ello se han desarrollado numerosas síntesis de C-glicósidos y S-glicósidos para su empleo como inhibidores enzimáticos y agentes terapéuticos.

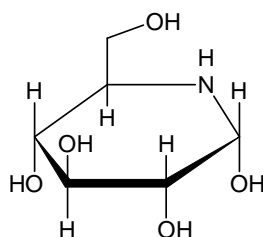
En los aza-azúcares o iminoazúcares el oxígeno endo-cíclico ha sido reemplazado por un átomo de nitrógeno, e igualmente actúan como inhibidores de este tipo de enzimas. Se ha desarrollado un gran número de síntesis de estos compuestos bien a partir de carbohidratos o a partir de sustratos diferentes.

Por último, los carba-azúcares, también llamados pseudo-azúcares, son sustratos en los que se ha reemplazado el átomo de oxígeno endocíclico por un grupo metileno. Son altamente resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática (Elbein et al., 2010).

El primer iminoazúcar aislado y caracterizado, fue el alcaloide polihidroxiado nojirimicina, cuya estructura resulta del cambio formal del átomo de oxígeno C5 de la glucosa por un átomo de nitrógeno (Figura. 5). Este nitrógeno heterocíclico puede ser mono o bicíclico y puede estar representado por anillos de pirrolidina, piperidina, pirrolizidina e indolizina.

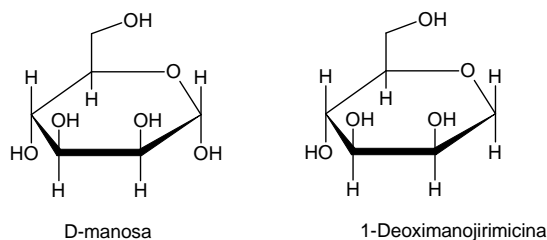
Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Figura 1-5: Estructura química del primer alcaloide polihidroxlado de origen natural.



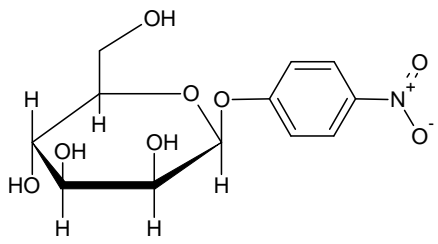
En 1968 se sintetizó el compuesto 1-deoxynojirimicina, con una remoción del hidroxilo anomérico de nojirimicina. Este compuesto fue más estable que nojirimicina y por esta razón se convirtió en un modelo de alcaloide inhibidor de glicosidasa. El alcaloide polihidroxlado 1-deoximanojirimicina, es un análogo de la D-manosa y que por estas características puede postularse como un potencial inhibidor de β -mananasa (Figura. 6).

Figura 1-6: Estructura de 1-deoximanojirimicina, análogo estructural de D- manosa.

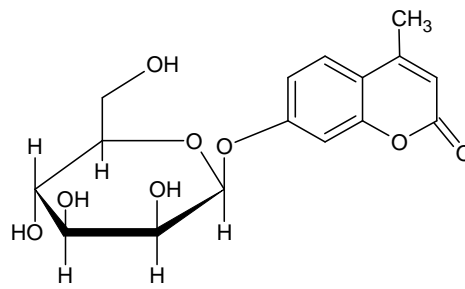


Adicionalmente a 1-deoximanojirimicina se proponen otros compuestos como potenciales inhibidores de β -mananasa. Estos compuestos son análogos estructurales de la D-manosa que representa el sustrato natural de esta enzima. Presentan sustituciones en la función acetálica de este monosacárido por lo que pueden considerarse como compuestos glicomiméticos que conservan las características ya mencionadas (Figura. 7).

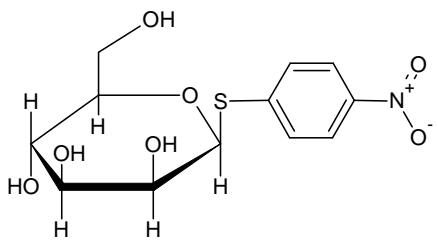
Figura 1-7: Glicomiméticos postulados como potenciales inhibidores de β -mananasa



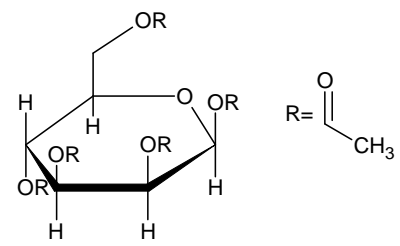
4-nitrofenil- β -D-manopiranosido



4-metilumbelliferil- β -D-manopiranosido



4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido



1,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosido

2. Artículo 1

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA ENDO-1,4- β - MANANASA DE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei*

CLONING AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AN ENDO-1,4- β - MANNANASE FROM THE COFFEE BERRY BORER *Hypothenemus hampei*

Carolina Aguilera-Gálvez¹, Juan J. Vásquez-Ospina², Pablo A. Gutiérrez- Sanchez³, Ricardo Acuña-Zornosa^{4§}

¹c.M.Sc. Disciplina de Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE).Caldas, Colombia. Carolina.Aguilera@cafedecolombia.com.

² Biólogo. Disciplina de Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE). Caldas, Colombia. jj.vasquez914@uniandes.edu.co.

³Ph.D. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Medellín, Colombia. paguties@unal.edu.co.

⁴ Ph.D. Disciplina de Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), Caldas, Colombia. Ricardo.Acuna@cafedecolombia.com.

§Autor para correspondencia: Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales, Chinchiná, Colombia. Tel.: +57 68506550, fax: +57 68504723.

RESUMEN

Una endo-1,4- β -mananasa del tracto digestivo del insecto *Hypothenemus hampei* se clonó y expresó como proteína recombinante en el sistema *Pichia pastoris*. La enzima exhibe un porcentaje de identidad del 56% con la secuencia de una endo- β -mananasa de *Bacillus circulans* perteneciente a la familia glicosil hidrolasa 5 (GH5). La proteína recombinante purificada (rHhMan) mostró un banda única con un peso molecular de 35.5 kDa en SDS-PAGE y su actividad

Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

se confirmó por el análisis de zimograma. rHhMan presenta una actividad optima a pH 5.5 y 30°C, y puede hidrolizar galactomananos con diferentes relaciones manosa:galactosa, lo cual sugiere que la actividad enzimática es independiente de la presencia de cadenas laterales como residuos de galactosa. La enzima no puede hidrolizar los mano-oligosacáridos manobiosa y manotriosa, sin embargo, puede degradar manotetraosa a través de una probable reacción de transglicosilación. Los valores de K_m y k_{cat} para la enzima sobre goma guar fueron de 2,074 mg ml⁻¹ y 50,87s⁻¹ respectivamente, similar a otras mananasas. Este trabajo es el primer estudio de una endo-1,4- β -mananasa de un insecto en este sistema de expresión. Debido a su importancia en los procesos digestivos en la broca del café, su estudio se convierte en un acercamiento al diseño de inhibidores de esta enzima que puedan disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por esta plaga.

PALABRAS CLAVE: β -mananasa, Broca del café, *Hypothenemus hampei*, glicosil hidrolasas.

ABSTRACT

An endo-1,4- β -mannanase from the digestive tract of the insect *Hypothenemus hampei*, was cloned and expressed as a recombinant protein in a *Pichia pastoris* system. The enzyme exhibits 56% sequence identity with an endo- β -mannanase from *Bacillus circulans* belonging to glycosyl hydrolase family 5 (GH5). The purified recombinant protein (rHhMan) showed a single band with a molecular weight of 35.5 kDa in SDS-PAGE and its activity was confirmed by zymogram analysis. rHhMan showed maximal activity at pH 5.5 and 30°C, and can hydrolyse galactomannans with different relationships mannose: galactose, suggesting that the enzymatic activity is independent of the presence of side chains as galactose residues. The enzyme was unable to hydrolyze the manno-oligosaccharides mannobiose and mannotriose, however it cleave manotetraosa through a probable transglycosylation reaction. The values of K_m and k_{cat} for the enzyme on guar gum were 2,074 mg ml⁻¹ and 50,87s⁻¹, respectively, similar to other mannanases. This work is the first study of an endo-1,4- β -mannanase from an insect in this expression system. Given its importance in the coffee berry borer digestive processes, its study becomes an approach to the design of inhibitors of this enzyme that could reduce economic losses caused by this pest.

KEY WORDS: β -mannanase, Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, glycosyl hydrolase

INTRODUCCIÓN

Los mananos son un grupo de polisacáridos que se dividen en cuatro tipos: mananos lineales, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos (Moreira et al., 2008). Estos polisacáridos son componentes estructurales de las paredes celulares y matrices intracelulares en las plantas terrestres y marinas. En el grano de café (*Coffea sp.*), un cultivo que en Colombia proporciona sustento para aproximadamente medio millón de familias cafeteras, los galactomananos constituyen el 25% de los polisacáridos totales, que a su vez representan el 50% de su peso seco (Arya et al., 2007).

Esta semilla es el único alimento de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), el insecto más perjudicial para la caficultura alrededor del mundo (Jaramillo et al., 2006). Durante todo su ciclo de vida la broca permanece en el interior del fruto, lo que dificulta su control con el uso de insecticidas o de enemigos naturales. La búsqueda de mecanismos que interfirieran en la fisiología del insecto puede ser la base para el desarrollo de alternativas biotecnológicas tendientes al control de las poblaciones de esta plaga.

Este insecto es capaz de degradar los polisacáridos del grano utilizando diferentes enzimas glicosil hidrolasas (GHs) secretadas en su sistema digestivo dentro de las que está la endo-1,4- β -mananasa (EC 3.2.1.78). Ésta enzima juega un papel importante en la hidrólisis interna y aleatoria de enlaces β -manosídicos en la estructura principal de los mananos, liberando pequeños mano-oligosacáridos (MOS) que son absorbidos y utilizados por la broca en los procesos de desarrollo y crecimiento. Por esta razón se considera a la mananasa como un blanco de inhibición importante en el diseño de estrategias de control de la broca del café.

Estudios previos se han enfocado en endo-1,4- β -mananasas de bacterias (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2008), hongos (Naganagouda et al., 2009; Yang et al., 2009; Zhao et al., 2011), plantas superiores (Lin et al., 2011; Marraccini et al., 2001; Yuan et al., 2007) y moluscos (Zahura et al., 2011). En este artículo se describe por primera vez la clonación y caracterización bioquímica de una endo-1,4- β -mananasa recombinante (rHhMan) del insecto *H. hampei* en el sistema de *Pichia pastoris*. Adicionalmente, el estudio de sus propiedades hidrolíticas permite inferir características

asociadas al mecanismo de acción de la enzima y al diseño de inhibidores que puedan ser utilizados en futuras estrategias de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de la secuencia de la endo- β -1,4-mananasa (HhMan)

La secuencia de aminoácidos de HhMan disponible en el GenBank (No Acceso: ADF22325.1), se analizó por comparación y alineamiento múltiple a través de las herramientas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y CLUSTALW respectivamente (Altschul et al., 1990; Thompson et al., 1997). La predicción de la estructura secundaria se realizó en el servidor PSIPRED (Buchan et al., 2010) y la búsqueda de información sobre la familia y dominios de la proteína se realizó en la base de datos Pfam (Finn et al., 2006).

Clonación y expresión del gen de la endo- β -1,4-mananasa (HhMan)

Se extrajo ADN genómico de tractos digestivos de adultos de la broca con el Kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). El gen *HhMan* se amplificó sin su secuencia señal nativa con los primers Pp_Man_Fw 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGTACCCGGAT TCACGGTTTC-3' y Pp_Man_Rv 5'-TGCTCTAGACCATTGAATATTGAACAGAT TG-3', diseñados a partir de la secuencia publicada del gen (No. Acceso ADF22325.1). Pp_Man_Fw incluye el sitio de restricción *XhoI* y Pp_Man_Rv el sitio *XbaI* (subrayados). La PCR se realizó con el sistema Advantage GC 2 PCR (Clontech, Mountain View, CA, USA), bajo las siguientes condiciones: 94° C por 3 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg y 68°C por 3 min; y una extensión final a 68° C por 10 min.

El producto de PCR ligado en el vector pPICZ α A (Invitrogen Corp., USA) se usó para transformar células *E. coli* DH5 α . Uno de los clones recombinantes obtenidos seleccionado con Zeocina (25 μ g/ml, Invitrogen Corp., USA) se confirmó por análisis de restricción y secuenciación (Macrogen Inc., Korea). El constructo linearizado con *SacI* se utilizó para transformar por electroporación la cepa GS115 de *P. pastoris* según indica el fabricante (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Los transformantes fueron seleccionados en agar YPDS (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa, 1 M sorbitol, 2% de agar, y 100 (μ g/ml) de zeocina). La integración del gen

HhMan en el genoma de *P. pastoris* se confirmó por PCR de colonias empleando los primers 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') los cuales flanquean el sitio múltiple de clonaje de pPICZ α A. Los transformantes de *P. pastoris* se inocularon en 10 ml de medio BMGY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100mM de buffer fosfato de potasio (pH 6.0), 1.34% de YNB, 0.0004% de Biotina y 1% (v/v) de glicerol) a 30°C y 250 rpm, hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 3 y 6. Para inducir la producción de la proteína en *P. pastoris* los pellets celulares se resuspendieron en medio BMMY (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100mM de buffer fosfato de potasio (pH 6.0), 1.34% de YNB, 0.0004% de Biotina y 0.5% de Metanol) hasta alcanzar una OD₆₀₀ aproximadamente de 1 y se incubaron a 30°C y se agitaron a 250 rpm. Como inductor de la expresión de la proteína se adicionó metanol absoluto a una concentración final de 0.5%, cada 24 horas durante 5 días. La cepa no recombinante GS115 de *P. pastoris* transformada con el vector pPICZ α A (sin inserto), se trató de forma similar y se analizó como control negativo.

Purificación de la proteína recombinante rHhMan

La cromatografía de afinidad por el ion metálico inmovilizado (IMAC) se utilizó para la purificación de la proteína rHhMan utilizando cola de histidinas N-terminal y la resina Ni-NTA agarosa de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante (Qiagen, Valencia, CA). El sobrenadante se cargó en la columna pre-equilibrada con buffer HEPES 100 mM e imidazol 10 mM (pH 7.5). Se realizaron tres lavados con el mismo buffer incluyendo 20 mM de imidazol y finalmente la enzima se eluyó con buffer HEPES 100 mM e imidazol 500 mM (pH 7.5). Las fracciones correspondientes a los eluidos se concentraron por ultrafiltración empleando un Amicon ultra-0.5, 3kDa® (Millipore, Bedford, MA).

Electroforesis en gel acrilamida y análisis de zimograma

Para verificar la calidad y estimar el tamaño esperado, una fracción de la proteína recombinante purificada se corrió bajo condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12% (w/v) con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo al método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las bandas se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie R-250. Se utilizó un marcador de peso molecular para SDS-PAGE de bajo rango. (Biorad, Hercules, CA).

Otra fracción proteica se empleó en ensayos de actividad en electroforesis no desnaturalizantes o nativa (PAGE) a la cual se le incorporó goma guar (Sigma, St Louis, MO) al 1% (w/v) como sustrato y se evaluó la actividad de 1, 1.5 y 2 μ g de rHhMan. La electroforesis se llevó a cabo a

Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae)

4°C. Para evaluar la actividad de la enzima, el gel se incubó en buffer citrato de sodio 0,1 M (pH 5.5) durante 20 minutos a 30°C. La actividad enzimática se visualizó por tinción con rojo congo (0.25% w/v) durante 15 minutos, seguido de tres lavados con NaCl 1 M. Para intensificar el color, el gel se introdujo en ácido acético al 5%. Las bandas de actividad se observaron en halos correspondientes a la degradación del sustrato por la acción de la enzima (Naganagouda et al., 2009).

Ensayo enzimático

La actividad de la enzima rHhMan se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Peter, 1955). El sustrato, goma guar (1%) disuelto en 500 μ l de buffer citrato de sodio 0.1 M (pH 5.5), se incubó con 0.05 μ g de enzima rHhMan a 30°C por 30 minutos. La cantidad de azúcares reductores liberados en la reacción, se midió mezclando 5 μ l de la reacción enzimática y 5 μ l de la solución DNS, seguido de un calentamiento a 100°C durante 5 minutos y una dilución con 50 μ l de agua desionizada previa a la lectura de absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad endo-1,4- β -mananasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones experimentales descritas (empleando D-manosa como estándar).

Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática

El pH óptimo de actividad de rHhMan se determinó en un rango de pH comprendido entre 3.5 a 8.0, bajo las condiciones de ensayo estándar y empleando dos sistemas buffer: citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0 – 6.0) y fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.0- 8.0).

El efecto de la temperatura en la actividad de rHhMan se midió incubando 0,05 μ g de enzima con sustrato goma guar (1%) en buffer citrato 0.1M (pH 5.5) a diferentes temperaturas entre 10 a 60°C. La actividad enzimática se evaluó bajo las condiciones de ensayo estándar.

Propiedades hidrolíticas

Se adicionaron 0.4 μg de rHhMan a soluciones de goma guar y goma de algarrobo (Sigma, St Louis, MO) preparadas al 0.5% en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5). Las reacciones se incubaron a 30°C durante 24 h. Se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 15 y 30 minutos y 12 y 24 horas, las cuales se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. Los productos de la hidrólisis se separaron en platos de sílica 60F 254 (Merck, Darmstadt, Germany) por cromatografía en capa fina (CCF) usando el sistema de solventes cloroformo: acetato de etilo: n-propanol: agua (0.2: 1: 1.5: 0.5 v/v) y se detectaron por aspersion de ácido sulfúrico en etanol al 5%, seguido con calentamiento a 100 °C durante 5 minutos.

Para determinar el modo de acción de la enzima, 0.4 μg de rHhMan se adicionaron a soluciones de 25 mM de los mano-oligosacáridos manobiosa, manotriosa, manotetraosa y manopentosa, en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5). Las reacciones se incubaron a 30°C por 24 h y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, las cuales se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Los productos de la hidrólisis se separaron en platos de sílica por CCF como se describe anteriormente. Una mezcla de los mano-oligosacáridos: manosa, manobiosa, manotriosa, manotetraosa y manopentosa (Megazyme, Co. Wicklow, Ireland) se utilizó como estándar.

Parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , se empleó el sustrato goma guar en un rango de concentración entre 2,5 – 35 mg ml^{-1} en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5) La velocidad de la reacción fue determinada por triplicado para cada concentración de sustrato. Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal para la ecuación de Michaelis – Menten utilizando el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de secuencia de HhMan

El análisis Pfam (E-value $1.4e^{-34}$) evidenció que la enzima pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas GH5, un amplio grupo de enzimas que catalizan enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos (Bien-Cuong et al., 2009; Cantarel et al., 2009). Estos resultados se comprobaron mediante el alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos con otras mananases de distintos orígenes agrupadas en esta familia: *Bacillus circulans* (GenBank: AAX87003.1),

Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Paenibacillus polymyxa (GenBank: ADO54643.1), *Cellvibrio japonicus* (GenBank: AA031760.1), *Clostridium butyricum* (GenBank: EEP53331.1) y *Vibrio furnissii* (GenBank: EEX39836.1), con las cuales se encontró una identidad del 56, 57, 39, 52 y 39% respectivamente. En la figura 1, se observa que todas las mananasas incluidas en el análisis presentan características comunes a la familia GH5, principalmente dos residuos glutamato estrictamente conservados, importantes en la actividad catalítica (Glu147 y Glu242) que actúan como nucleófilos ó catalizadores generales acido/base y seis residuos catalíticos del sitio activo (Arg72, His108 e His212, Asn146, Tyr214 y Trp272).(Baird et al., 1990; Gilbert et al., 2008; Guiseppi et al., 1988; Macarron et al., 1993).

Clonación y expresión del gen *HhMan*

El gen *HhMan* se amplificó por PCR con los primers diseñados según la secuencia disponible en el GenBank (ADF22325.1) y se clonó en el vector pPICZ α A. La secuencia codificante corresponde a un marco de lectura abierto de 900 nucleótidos que codifican para una proteína de 300 aminoácidos, que no incluyen la secuencia señal nativa.

La rHhMan se expresó como una proteína extracelular en *Pichia pastoris*. El contenido proteico del sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad en la resina Ni-NTA agarosa, empleando un protocolo de purificación de un solo paso. El análisis de SDS-PAGE indica que se obtuvo una proteína con una aparente homogeneidad y un peso molecular aproximado de 35.5 kDa correspondiente a 33 kDa de la secuencia de aminoácidos de la proteína sin la secuencia señal nativa y 2.5 kDa de la cola de histidinas N-terminal (Fig. 2A). Se han reportado pesos moleculares para otras mananasas que se encuentran dentro del rango obtenido para rHhMan (35 a 40 kDa), como es el caso de la mananasa de *Solanum lycopersicon* (39 kDa) (Schröder et al., 2006), *Bacillus subtilis* (39.6 kDa) (Jiang et al., 2006), *Aplysia kurodai* (40 kDa) (Zahura et al., 2010) y *Cryptopygus antarcticus* (40 kDa) (Song et al., 2008).

En los ensayos de expresión se obtuvieron 6 mg de proteína pura por litro de medio de cultivo con una actividad específica sobre goma guar de 1075,3 U/ mg bajo las condiciones estándar del ensayo.

En el análisis de zimograma se evaluó la actividad enzimática de rHhMan frente al sustrato goma guar al 1%. Se comprobó que la actividad es directamente proporcional a la concentración de enzima. En la Figura 2B se observa que la mayor actividad se obtiene cuando se emplean 2 μ g de enzima, correspondiente a la mayor concentración evaluada. Lo contrario sucede cuando se emplea una menor concentración equivalente a 1 μ g.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

La actividad óptima de rHhMan se da a pH de 5.5. El 95% de actividad se observó a pH de 5.0 y el 75% a pHs de 4.5, 6, 6.5 y 7 respectivamente. Gradualmente la actividad disminuyó a 50 % en 7.5 y 8 y a pH de 4.0 no se detectó actividad enzimática (Fig. 3A). Estos resultados indican que rHhMan es estable a pH ácido y coincide con el pH fisiológico del tracto digestivo de *H. hampei*, el cual se encuentra alrededor de 4.5 y 5.2 (Valencia et al., 2000). Similarmente el pH del intestino de otros coleópteros esta entre 4.5 y 5.5 (Silva et al., 2009). Otras mananases de diferentes hongos exhiben óptima actividad a pH ácido, así las mananases de *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* y *A. oryzae* son óptimamente activas a pHs de 5.5, 4.5 y 4.5 respectivamente (Naganagouda et al., 2009; Puchart et al., 2004; Regalado et al., 2000a; Regalado et al., 2000b).

La máxima actividad de rHhMan se presentó a 30 °C y entre 10 y 20 °C se mantuvo aproximadamente el 70% de la actividad. Con altas temperaturas la actividad disminuye notablemente. A 40°C se conservó el 60% de la actividad mientras que a 50 °C se observó un 30% de actividad (Fig. 3B). Coincide con la reportada para las enzimas en el tracto digestivo de insectos, que son activas entre los 30 y 40°C. Por encima de estas condiciones se observa una rápida disminución de la actividad máxima (Silva et al., 2009).

Propiedades hidrolíticas

La proteína purificada rHhMan puede hidrolizar polisacáridos de alto peso molecular con enlaces β -1,4-glicosídicos en su estructura. En la figura 4A-B se observa que los principales productos de la hidrólisis de goma guar y goma de algarrobo corresponden a mano-oligosacáridos de diferentes tamaños que se obtienen luego de 15 minutos de reacción (manosa, manobiosa, manotriosa y manotetraosa). Similarmente otras mananases de *Bacillus sp.* hidrolizan diferentes sustratos con las mismas características estructurales de los anteriores galactomananos (Jiang et al., 2006). En estas reacciones se obtienen productos de hidrólisis que pueden ser utilizados como aditivos de

alimentos debido a los efectos prebióticos y anti-obesidad que los MOS presentan en diferentes regiones del tracto (Smith et al., 2010).

El modo de acción de rHhMan se analizó por CCF para diferentes mano-oligosacáridos (Fig 4C). La enzima no puede hidrolizar manobiosa y manotriosa luego de 24 horas de incubación. Sin embargo, la hidrólisis de manotetraosa produce manosa, manobiosa y manotriosa. Similarmente la hidrólisis de manopentosa es completa a los pocos minutos de la reacción, produciendo mano-oligosacáridos de una, dos, tres, y cuatro unidades. Este proceso puede explicarse a través de una reacción de transglicosilación que le permite a la enzima hidrolizar estos mano-oligosacáridos (Puchart et al., 2004; Xu et al., 2002). Se ha observado que en este tipo de enzimas para lograr una significativa hidrólisis, se requiere que los mananos presenten un cierto grado de polimerización de al menos 4 unidades, como ocurre con manotetraosa y manopentosa. (Ademark et al., 1998).

Parámetros cinéticos

El sustrato goma guar presentó un comportamiento micaeliano, como puede observarse en la figura 5. La estructura de este polisacárido presenta una relación manosa: galactosa de 1,6:1, y por lo tanto posee mayor contenido de galactosa que otros polisacáridos que presentan sustituciones de este monosacárido en la cadena lateral, como goma de algarrobo (4:1) y goma carob (3,76:1). Los resultados indican que la afinidad de rHhMan por el sustrato goma guar ($K_m = 2,074 \text{ mg ml}^{-1}$), es similar a la reportada en otras mananasas para los sustratos goma de algarrobo ($K_m = 2,0 \text{ mg ml}^{-1}$) y goma carob ($K_m = 2,2 \text{ mg ml}^{-1}$). Estos datos sugieren que la actividad de la enzima no es afectada por la presencia de cadenas laterales como residuos de galactosa. Adicionalmente rHhMan presenta mayor afinidad por goma guar que la afinidad de las mananasa de *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* WY34 ($K_m = 7,7 \text{ mg ml}^{-1}$ y $27,4 \text{ mg ml}^{-1}$ respectivamente) (Bien-Cuong et al., 2009; Jiang et al., 2006).

El valor de k_{cat} para rHhMan es $50,87 \text{ s}^{-1}$ superior al descrito para la mananasa de *Bacillus licheniformis*, que presenta un poder catalítico inferior para los sustratos glucomanano ($k_{cat} = 21,00 \text{ s}^{-1}$), goma de algarrobo ($k_{cat} = 31,20 \text{ s}^{-1}$) y D- manano ($k_{cat} = 18,2 \text{ s}^{-1}$) (Songsiriritthigul et al., 2010).

CONCLUSIÓN

Este estudio es el primer reporte de una endo-1,4- β -mananasa de un insecto expresada en el sistema de *Pichia pastoris*. Esta enzima sin su secuencia señal nativa tiene un peso molecular de 35.5 kDa. Hace parte de la familia de glicosil hidrolasas GH5 y contiene ocho residuos estrictamente conservados en las proteínas de esta familia. La enzima exhibe actividad óptima en condiciones similares a las presentes fisiológicamente el tracto digestivo de la broca. rHhMan tiene la capacidad de hidrolizar diferentes galactomananos y mano-oligosacáridos que pueden ser utilizados en las industrias farmacéuticas y de alimentos, debido a que exhiben efectos benéficos sobre la salud de los humanos. El rol que desempeña esta enzima en los procesos asimilación del principal polisacárido del grano de Café (Galactomanano, único alimento de la broca, hace que los resultados obtenidos sean una buena aproximación al diseño de inhibidores de rHhMan que puedan ser utilizados como estrategias biotecnológicas de control que permitan reducir las pérdidas económicas ocasionadas por esta plaga.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (Contrato # 074/2007). Los autores agradecen a Beatriz E. Padilla Hurtado y Jefferson Medina Olaya del programa de Mejoramiento Genético de CENICAFE por sus aportes en el desarrollo de la investigación. A Edison Osorio Durango Ph.D y Carlos Muskus López Ph.D por la revisión y valiosos aportes en el desarrollo del manuscrito.

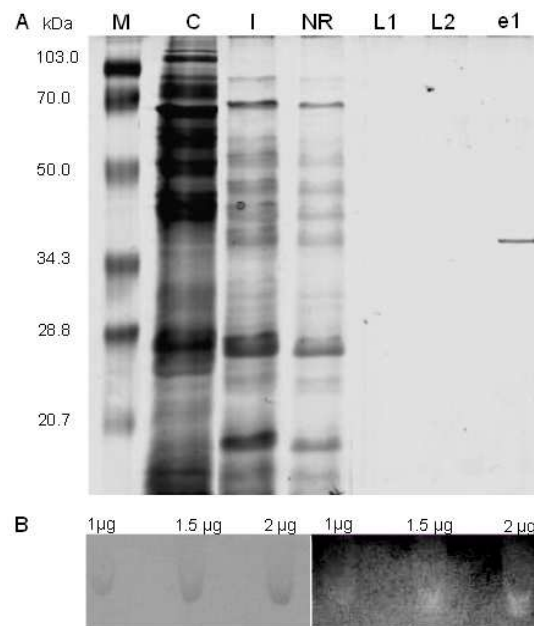
Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

FIGURAS

Figura 2-1: Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la endo-1,4- β -mananasa de *Hypothenemus hampei* con otras mananasas GH5. Los residuos de aminoácidos idénticos o similares se señalan en negro o gris respectivamente. Los residuos ácido glutámico y los residuos del sitio activo altamente conservados se indican en asterisco (*) debajo del alineamiento. Las regiones de la proteína HhMan con estructura secundaria tipo α -hélices o laminas β -plegadas de muestran sobre del alineamiento.

<i>H. hampei</i>	1	MTA-----DFTLRALLLLLLLR-----AAAAVPGFTVSGTRILDANGQEFMIRGVSHAAHTWYKDDI
<i>B. circulans</i>	1	MAKLQK-----GILTLTVIALMFVI-LGSAAP-----KAAAATGFVVMGGRLYDSTGKPFVWRGINHGSHWFRMDL
<i>P. polymyxa</i>	1	HWALLR-----KALLSGLAGLLIMHGLGGFFS-----KACQASGFVVSGETNLYDSTGKPFVWRGVNHAHTWYKNDL
<i>C. japonicus</i>	1	MSLFTPLSEINVRSHINTSSVFCRRIKTLVAGLTALGLMLAAVSAAGFYVSGKCLREGNGMFMWRGVMLPHAWFPDRT
<i>C. butyricum</i>	1	MCKIFK-----TFKKALIGAVVMAQTIAFMMPITAYLAASSNGFVVSGETRLYDANGKEFVWRGINHAHAWYRQGE
<i>V. fumissii</i>	1	MKYFN-----FC-----IVTL-LFLFSNTVFAGLVVSQSVLFEYNGTPEKIRGINHAHAWYADRL
<i>H. hampei</i>	60	NGAITSAAAGANTVRIVLSNGGQOUTKDNLDVGNLISLCEESHKLIAMLEVHVDATGND---SOETLENAVNYWKELRDLI
<i>B. circulans</i>	66	NTAIPAIARTGANTVRIVLSNGTCTTKDDLNSVKNIINVVNANKHIAVLEVHVDATGKD---DFNSLDAVNYWISIREAL
<i>P. polymyxa</i>	67	YTAIPAIARTGANTVRIVLSNGMCTTKDDLNSVKNIISLVSNHKMIAVLEVHVDATGKD---DYBSLDAVNYWISIKDAL
<i>C. japonicus</i>	81	NQALADHSATGANSVRVWLSNGRLSRTPESQVASTIISQAKARCLITVLEVHDTTGYG-EQTAAITSEAVDYWIAIRNAL
<i>C. butyricum</i>	73	STAIPAIARTGANTVRVWALGDQDQGYDINIVKNIISLCEKNMLVAVLEIHDATGSD---DYSKLDNAVNYWISIKDAL
<i>V. fumissii</i>	55	ETALQGSLSLTCANTVRIVLSNGHRUMKTSAAEEVGNITCLAKSYMLIAVLEVHDTTGYGESSADLNSAADYWIETIKEL
<i>H. hampei</i>	137	IGKEDRVIINIANEVFGTWD-TAGWADGYKVVIPELRNAGLEHLLVVDIAGYGOYFCAIF-EKGEVFTQDLARTVFSI
<i>B. circulans</i>	143	IGKEDRVIINIANEVYGTWN-GSAMADGYKRAIPKLRDAGIKNTLIVDAAGWGOYPOSIV-DYGVSVFAADSCKNTAFSI
<i>P. polymyxa</i>	144	IGKEDRVIINIANEVYGSWN-GGGWADGYKCAIPKLRNAGIKNTLIVDAGWGOYPOSIN-DYGVSVFAADSCKNTVFSI
<i>C. japonicus</i>	160	IGQEDYVLIINIGNEPFGNGOSASTLNLHRDAINRLRNAGFTHTLMVDAANWGDWEMIMRNASSLPMEDPRRWVIFSV
<i>C. butyricum</i>	150	RGRESTVILNINWNEVYGTWD-EKQWAEYERAIPLRAAGIDNTIMVDSAGWGOYKETA-DYGRAVFNSDPDKNTVFSI
<i>V. fumissii</i>	135	IGEDNYVLIINLGNPEFGNGIISSEIIVKAKKDAINRLRSEGMNHWIMVDAFNWGDWQNMMLDNATSIILSDPLHMIIFSV
<i>H. hampei</i>	215	HMYEYATDVTMIRGNIDSEALNTGTEVLIIGFEGDRKPESOHVDIDTIMSWTREKSVGWLAWSWYGMGNDESILDDLWGPS
<i>B. circulans</i>	221	HMYEYACKDAATVKSMMENVLNKGALIIIGFEGGYHTNG-DVDEYAIMRYGLEKGVGWLAWSWYGNSSGLNYLDDLATGPN
<i>P. polymyxa</i>	222	HMYEYACKDVQTVRTNIDNWLTCGLPLIIGFEGGYHCGA-DVDETEIMRYGKSKSVGWLAWSWYGNSSMLNYLDDLVTGPN
<i>C. japonicus</i>	240	HMYEYVP-NDTAVMNYHSAFNEMHLLPLVVGEEFLANHFSS-YVDAGSIMARACQYGFYLGWSWGSNSSLSDLDVWTFW
<i>C. butyricum</i>	228	HMYEYAGGDANTVKTNINSVINONLALCIIGFEGIRHTNG-DVDEETIMRYCQEKSVGYIGSWYGNGTDWIYLDIANDWS
<i>V. fumissii</i>	215	HMYEYVYC-DYSTVNNYHSSFVNRGLSLVVGEEFAATHRGS-NVDESATMERTETLSLGYIGWSWGSNDDSTADLDIVNMM
		* * * * *
<i>H. hampei</i>	295	GDYSLTNVGSQINDSENGIRKTSITCSIFN-----
<i>B. circulans</i>	300	GS--LTSYGNVWVNDTYGIRKNTSKAGIF-----
<i>P. polymyxa</i>	301	GN--LTDWGRVWVEGANGIKETSKKAGIF-----
<i>C. japonicus</i>	318	AGS-LTTWGNLLINNTNGIRNTSRKATIFGG-----SGSSSSSAGSCGTAPNGYPCCNASS-ATMNGCWEMNRS
<i>C. butyricum</i>	307	GSS-LTDWGNKLLNRYRNGIKNTSKICSVFNGSTGSDQGTSGNKITVEAEDGYLNGVQKSTERSGYSGSYVTCFDMNSD
<i>V. fumissii</i>	293	NDS-YTRWGNLITNGENGIKTSQIATVPE-----TCKDDCSGESTQYPCSSSSLDLDPDGDGWCWEMEQS

Figura 2-2: A) SDS-PAGE de la proteína pura rHhMan. M: Marcador de peso molecular. C: Control, medio extracelular de *Pichia pastoris* con el vector pPICZαA (sin inserto), I: Medio extracelular de *Pichia pastoris* con el vector pPICZαA-HhMan (con inserto), NR: Fracción no retenida en la matriz, L1: lavado 1, L2: lavado 2, e1: Eluido 1 rHhMan purificada. B) Gel no desnaturalizante o PAGE y zimograma de la rHhMan purificada. Tres concentraciones de rHhMan (1, 1.5 y 2 μg) se cargaron en geles nativos (12%). Panel izquierdo corresponde al gel en ausencia de sustrato goma guar y teñido con Azul de Coomassie R-250 para visualizar la banda correspondiente a la mananasa (35.5 kDa). Panel derecho corresponde al gel en presencia de sustrato goma guar al 1%, y teñido con rojo congo para verificar la actividad de la enzima.



Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Figura 2-3: Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de rHhMan. (A) Efecto del pH en la actividad rHhMan. **(B)** Efecto de la temperatura en la actividad rHhMan. Las evaluaciones se realizaron por triplicado empleando como sustrato goma guar al 1% en buffer citrato de sodio 1M, pH 5.5.

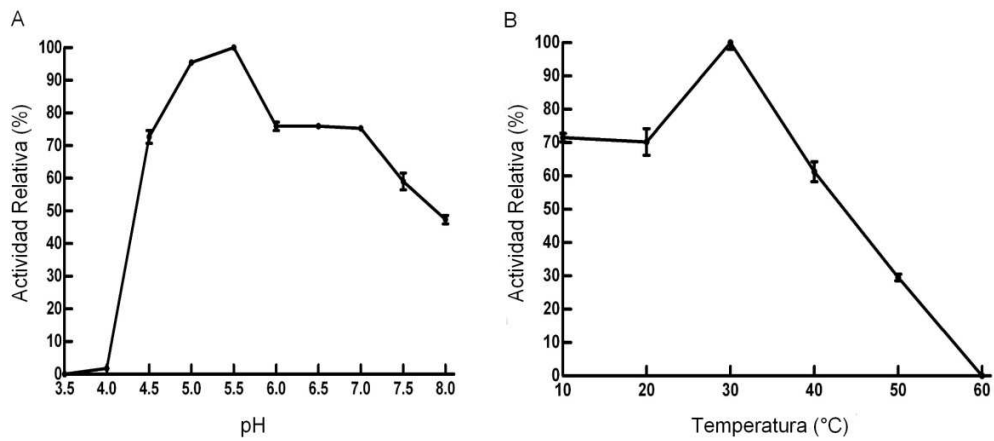
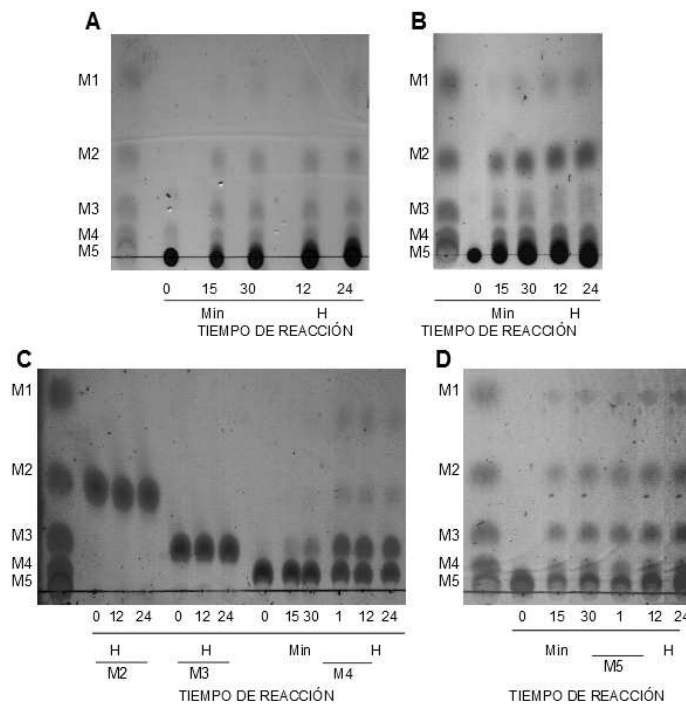
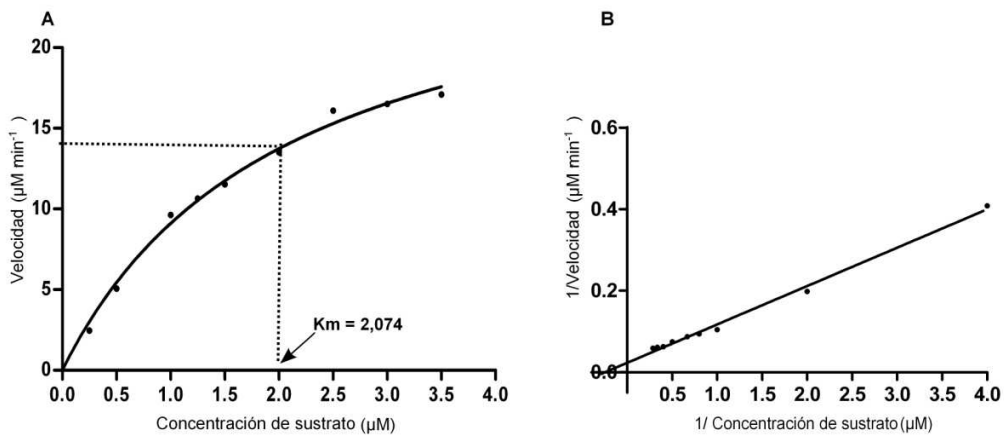


Figura 2-4: Cromatografía en capa fina (CCF) de los productos de hidrólisis generados por acción de la rHhMan sobre mananos y mano-oligosacáridos. Las reacciones conteniendo los respectivos sustratos disueltos en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5) y 0,4 µg de rHhMan se incubaron a 30°C durante 24 h y 2 µl de cada reacción se analizaron en los platos de CCF. Los sustratos fueron: A) Goma Guar, B) Goma de algarrobo y C) Mano-oligosacáridos: Manobiosa, manotriosa y manotetraosa. D) Mano-oligosacárido: Manopentosa. Se indican los tiempos de incubación (minutos o horas). Como estándar se utilizó una mezcla de manosa a manopentosa donde M1 corresponde a manosa, M2, manobiosa; M3, manotriosa; M4, manotetraosa y M5 manopentosa.



Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Figura 2-5: Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk de rHhMan. A) Grafica de Michaelis-Menten con para el sustrato goma guar. B) Grafica de Lineweaver-Burk para el sustrato goma guar. Las evaluaciones se realizaron bajo el ensayo de actividad enzimática estándar en condiciones óptimas de pH y temperatura obtenidos del experimento mostrado en la figura 3.



BIBLIOGRAFIA

- ADEMARK P, VARGA A, MEDVE J, HARJUNPÄÄ V, TORBJÖRN D, TJERNELD F, et al. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase. *Journal of Biotechnology*. 1998;63(3):199-210.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-410.
- ARYA M, RAO LJM. An Impression of coffee carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(1):51-67.
- BAIRD SD, HEFFORD MA, JOHNSON DA, SUNG WL, YAGUCHI M, SELIGY VL. The Glu residue in the conserved ASN-Glu-Pro sequence of two highly divergent endo- β -1,4-glucanases is essential for enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;169(3):1035-1039.
- BIEN-CUONG D, THI-THU D, BERRIN J-G, HALTRICH D, KIM-ANH T, SIGOILLOT J-C, et al. Cloning, expression in *Pichia pastoris* and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microbial Cell Factories*. 2009;8(1):1-12.
- BUCHAN DWA, WARD SM, LOBLEY AE, NUGENT TCO, BRYSON K, JONES DT. Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Research*. 2010;38(suppl 2):W563-W568.
- CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(suppl 1):D233-D238.
- FINN RD, MISTRY J, SCHUSTER-BÖCKLER B, GRIFFITHS-JONES S, HOLLICH V, LASSMANN T, et al. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(suppl 1):D247-D251.
- GILBERT HJ, STÅLBRAND H, BRUMER H. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008;11(3):338-348.
- GUISEPPI A, CAMI B, AYMERIC JL, BALL G, CREUZET N. Homology between endoglucanase Z of *Erwinia chrysanthemi* and endoglucanases of *Bacillus subtilis* and alkalophilic *Bacillus*. *Molecular Microbiology*. 1988;2(1):159-164.
- JARAMILLO J, BORGEMEISTER C, BAKER P. *Coffee berry borer Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research*. 2006;96(03):223-233.
- JIANG Z, WEI Y, LI D, LI L, CHAI P, KUSAKABE I. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*. 2006;66(1):88-96.

Caracterización bioquímica de una endo- β -mannanasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.

LIN J, PANTALONE VR, LI G, CHEN F. Molecular cloning and biochemical characterization of an endo- β -mannanase gene from soybean for soybean Meal Improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(9):4622-4628.

MACARRON R, VAN BEEUMEN J, HENRISSAT B, DE LA MATA I, CLAEYSENS M. Identification of an essential glutamate residue in the active site of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters*. 1993;316(2):137-140.

MARRACCINI P, ROGERS WJ, ALLARD C, ANDRÉ M-L, CAILLET V, LACOSTE N, et al. Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta*. 2001;213(2):296-308.

MOREIRA L, FILHO E. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79(2):165-178.

NAGANAGOUDA K, SALIMATH PV, MULIMANI VH. Purification and characterization of endo-beta-1,4 Mannanase from *Aspergillus niger* gr for application in food processing industry. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(10):1184-1190.

PETER B. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1955. 149-158.

PUCHART V, VRŠANSKÁ M, SVOBODA P, POHL J, ÖGEL ZB, BIELY P. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2004;1674(3):239-250.

REGALADO C, GARCÍA-ALMENDÁREZ BE, VENEGAS-BARRERA LM, TÉLLEZ-JURADO A, RODRÍGUEZ-SERRANO G, HUERTA-OCHOA S, et al. Production, partial purification and properties of β -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of science of food and agriculture*. 2000a;80(9):1343-1350.

REGALADO C, GARCIA-ALMENDAREZ BE, VENEGAS-BARRERA LM, TELLUZ-JURADO A, RODRIGUEZ-SERRANO G, HUERTA-OCHOA S, et al. Production, partial purification and properties of beta-mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of the science of food and agriculture*. 2000b;80(9):

SCHRÖDER R, WEGRZYN T, SHARMA N, ATKINSON R. LeMAN4 endo- β -mannanase from ripe tomato fruit can act as a mannan transglycosylase or hydrolase. *Planta*. 2006;224(5):1091-1102.

SILVA EM, VALENCIA A, GROSSI-DE-SÁ MF, ROCHA TL, FREIRE É, DE PAULA JE, et al. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2009;95(3):141-146.

SMITH DL, NAGY TR, WILSON LS, DONG S, BARNES S, ALLISON DB. The Effect of Mannan Oligosaccharide Supplementation on Body Weight Gain and Fat Accrual in C57Bl/6J Mice. *Obesity*. 2010;18(5):995-999.

SONG JM, NAM K-W, KANG SG, KIM C-G, KWON S-T, LEE Y-H. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active β -1,4-d-mannanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2008;151(1):32-40.

SONGSIRIRITTHIGUL C, BURANABANYAT B, HALTRICH D, YAMABHAI M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2010;9(1):20.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(24):4876-4882.

VALENCIA A, BUSTILLO AE, OSSA GE, CHRISPEELS MJ. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2000;30(3):207-213.

XU B, HÄGGLUND P, STÅLBRAND H, JANSON J-C. endo- β -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. *Journal of Biotechnology*. 2002;92(3):267-277.

YANG P, LI Y, WANG Y, MENG K, LUO H, YUAN T, et al. A Novel β -mannanase with High Specific Activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: Gene Cloning, Expression and Enzymatic Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009;159(1):85-94.

YUAN J, YANG X, LAI J, LIN H, CHENG Z-M, NONOGAKI H, et al. The Endo- β -Mannanase gene families in *Arabidopsis*, rice, and poplar. *Functional & Integrative Genomics*. 2007;7(1):1-16.

ZAHURA UA, RAHMAN MM, INOUE A, TANAKA H, OJIMA T. An endo- β -1,4-mannanase, AkMan, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;157(1):137-143.

ZAHURA UA, RAHMAN MM, INOUE A, TANAKA H, OJIMA T. cDNA cloning and bacterial expression of an endo- β -1,4-mannanase, AkMan, from *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;159(4):227-235.

ZHANG M, JIANG Z, LI L, KATROLIA P. Biochemical characterization of a recombinant thermostable β -mannosidase from *Thermotoga maritima* with transglycosidase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009;60(3-4):119-124.

ZHANG Y, JU J, PENG H, GAO F, ZHOU C, ZENG Y, et al. Biochemical and Structural Characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(46):31551-31558.

ZHAO W, ZHENG J, ZHOU H-B. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*. 2011;102(16):7538-7547.

3. Artículo 2

DOCKING Y EVALUACIÓN DE POTENCIALES INHIBIDORES DE LA ENDO-1,4- β - MANANASA DE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei*

DOCKING AND EVALUATION OF POTENTIAL INHIBITORS OF THE ENDO-1,4- β - MANNANASE FROM THE COFFEE BERRY BORER *Hypothenemus hampei*

Carolina Aguilera-Gálvez¹, Pablo A. Gutiérrez- Sanchez², Ricardo Acuña-Zornosa^{3§}

¹c.M.Sc. Disciplina de Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), Caldas, Colombia. Carolina.Aguilera@cafedecolombia.com.

²Ph.D. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Medellín, Colombia. paguties@unal.edu.co.

³ Ph.D. Disciplina de Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), Caldas, Colombia. Ricardo.Acuna@cafedecolombia.com.

§Autor para correspondencia: Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales, Chinchiná, Colombia. Tel.: +57 68506550, fax: +57 68504723.

RESUMEN

La búsqueda de inhibidores de la enzima endo-1,4- β -mananasa (HhMan) de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), constituye una alternativa promisorio para control del insecto. En este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de cinco compuestos análogos estructurales al sustrato natural de la enzima. En la evaluación cualitativa por cromatografía de capa fina se identificó por primera vez al compuesto 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido como inhibidor de la actividad enzimática. Este resultado se confirmó en la evaluación cuantitativa por el método del ácido 3,5-

dinitrosalicílico. Una concentración de 1mM del compuesto mostró un efecto inhibitorio del 93%. La IC_{50} calculada para este compuesto fue de 0.12 mM. El análisis de modelamiento y docking reveló la función de los residuos catalíticos Glu147 y Glu242 y sus interacciones hidrofílicas con la estructura del sustrato en el mecanismo hidrolítico propuesto para HhMan. Se propone que en el mecanismo de inhibición existe una interacción importante entre el residuo Tyr214 y el sustituyente nitro del inhibidor. Estas características estructurales revelan las probables interacciones del inhibidor con los residuos del sitio activo de HhMan, lo cual representa el punto de partida para el desarrollo de nuevas moléculas que puedan utilizarse en estrategias de control de la broca del café.

PALABRAS CLAVE: β -mananasa, Broca del café, *Hypothenemus hampei*, inhibidores, docking.

ABSTRACT

Searching for inhibitors of the endo-1,4- β -mannanase (HhMan) from the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) is a promising alternative to the insect control. In this study the inhibitory activity of five structural analogues to the natural substrate of HhMan was evaluated. Qualitatively, thin layer chromatography assay showed, by first time, that 4-nitrophenyl-thio- β -D-mannopyranoside acted as an inhibitor of the enzyme activity. This result was confirmed in a quantitative assay using 3,5-dinitrosalicylic method. A concentration of 1mM of the compound showed an inhibitory effect of 93%. The calculated IC_{50} for this compound was 0.12 mM. The docking and modeling analysis revealed the function of the catalytic residues Glu147 and Glu242, and their hydrophilic interactions with the substrate structure in the proposed hydrolytic mechanism for HhMan. Here it is proposed that Tyr214 is involved in the inhibition mechanism, because it apparently interacts with the nitrophenyl ring of the compound. These structural features reveal the probably inhibitory compound interaction with the active site of HhMan, and represent the starting point for the development of new molecules than could be used in coffee berry borer control strategies.

KEY WORDS: β -mannanase, Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, Inhibitors, docking.

INTRODUCCIÓN

La broca del café (*Hypothenemus hampei*), es el insecto plaga más perjudicial para las plantaciones de café alrededor del mundo. En Colombia es la causa de un grave problema fitosanitario que afecta el patrimonio de más de medio millón de familias cafeteras, debido a las pérdidas económicas que ocasiona (Bustillo Pardey, 2006; Pava-Ripoll et al., 2008). Los métodos disponibles tendientes a reducir los niveles de infestación del insecto en los cafetales se basan en el control biológico, control cultural y predominantemente el control químico. Se ha extendido el uso de los insecticidas Endosulfan y Clorpirifos, sin embargo, debido a los problemas ambientales que ocasionan y a la reciente resistencia del insecto al Endosulfan (Jaramillo et al., 2006; Navarro et al., 2010) es necesario identificar nuevas alternativas que contribuyan al control.

La Biotecnología ofrece herramientas promisorias en este sentido, permite el uso de genes que codifican para toxinas insecticidas, para inhibidores enzimáticos de enzimas digestivas, de quitinasas y lectinas (Barbosa et al., 2010).

La enzima glicohidrolítica endo-1,4- β -mananasa (EC 3.2.1.78) es responsable de la hidrólisis del galactomanano, principal polisacárido del grano de café y permite la liberación de pequeños mono-oligosacáridos que son absorbidos por el insecto en el tracto digestivo. Por esta razón, se considera un blanco importante de inhibición debido a que desempeña un papel fundamental en los procesos digestivos de la broca del café. Su inhibición selectiva ofrece una promisoriosa alternativa de control de este insecto, sin embargo la disponibilidad de inhibidores es limitada.

La cadena lateral de manosas de la estructura del galactomano, constituye el sustrato natural de la enzima. En este trabajo se propone la evaluación de cinco compuestos análogos a este sustrato, que pueden mimetizar su comportamiento y por lo tanto actuar como inhibidores de la endo-1,4- β -mananasa de la broca del café. Se describe por primera vez al compuesto 4-nitrofenil-tio- β -d-manopiranosido como inhibidor de la enzima, siendo el punto de partida para el desarrollo de nuevas moléculas que puedan utilizarse en estrategias de control de la plaga encaminadas a la disminución del grave daño que ocasiona al cultivo de café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

La proteína endo-1,4- β -mananasa recombinante de la broca del café (rHhMan) previamente expresada en el sistema de *Pichia pastoris*, se obtuvo en el laboratorio de Biotecnología

(Disciplina de Mejoramiento genético, del Centro Nacional de Investigaciones de Café-Cenicafé). Los compuestos 1: 4-nitrofenil- β -D-manopiranosido, 2: 4-metillumberiferil- β -D-manopiranosido, 3: 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido, 4: 1, 3, 4, 6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosido y 5:1-deoximanojirimicina hidrocloreuro, empleados en los ensayos de inhibición enzimática fueron obtenidos a través del fabricante Carbomer (Carbomer, Inc., San Diego, CA, USA). Los mano-oligosacáridos: manosa, manobiosa, manotriosa, manotetraosa y manopentosa, y el sustrato goma guar se adquirieron en Megazyme (Megazyme, Co. Wicklow, Ireland) y Sigma respectivamente (Sigma, St Louis, MO). En la evaluación cuantitativa de inhibición se emplearon platos de sílica 60F 254 (Merck, Darmstadt, Germany)

Ensayo de inhibición de la actividad enzimática de rHhMan

Evaluación cualitativa: Por cromatografía en capa fina (CCF) se evaluaron tres concentraciones de cada compuesto (0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM), las cuales se incorporaron en reacciones enzimáticas de 500 μ l. Cada reacción incluye 0.05 μ g de rHhMan pura y 25mM de manopentosa disuelto en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5). La reacción que no incluye compuesto corresponde al control negativo del ensayo. Cada reacción se incubó a 30°C durante 30 minutos y posteriormente los productos de hidrólisis se separaron en platos de sílica, empleando el sistema de solventes cloroformo: acetato de etilo: n-propanol: agua (0.2: 1: 1.5: 0.5 v/v). La detección se realizó por aspersion de ácido sulfúrico en etanol al 5%, seguido con calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. La ausencia de productos de hidrólisis indicó inhibición de la enzima. Como estándar se utilizó una mezcla de mano-oligosacáridos: manosa, manobiosa, manotriosa, manotetraosa y manopentosa.

Evaluación cuantitativa: Por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Peter, 1955) se evaluó una concentración de 1mM de cada compuesto. Se incorporaron a reacciones enzimáticas igual que en la evaluación cualitativa sustituyendo el sustrato manopentosa por goma guar (1%). Cada reacción se incubó a 30°C durante 30 minutos. Posteriormente se midió la cantidad de azúcares reductores liberados en la reacción, mezclando 5 μ l de la reacción enzimática y 5 μ l de la solución DNS, seguido de un calentamiento a 100°C durante 5 minutos y una dilución con 50 μ l de agua desionizada previa a la lectura de absorbancia a 540 nm. Se prepararon blancos individuales para corregir la línea base de absorbancia, en donde la enzima se reemplazó por buffer. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times (\Delta A_{\text{Control}} - \Delta A_{\text{Reacción con inhibidor}}) / \Delta A_{\text{Control}}$$

$$\Delta A_{\text{Control}} = A_{\text{Control}} - A_{\text{Blanco}}$$

$$\Delta A_{\text{Reacción con inhibidor}} = A_{\text{Reacción con inhibidor}} - A_{\text{Blanco}}$$

Determinación de la IC₅₀ de los compuestos

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀ ± IC 95%) se calculó para los compuestos con mayor actividad inhibitoria (porcentaje de inhibición superior al 50%) en condiciones de pH y temperaturas descritas en los ensayos de inhibición. Se empleó un modelo de regresión logística no lineal y se asumió una curva sigmoidea dosis respuesta con pendiente de Hill (pendiente variable) usando el programa GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos fueron analizados y graficados usando el mismo software.

Análisis de la secuencia de la endo-1,4-β-mananasa (HhMan)

La secuencia de aminoácidos de HhMan disponible en el GenBank (No Accesion: ADF22325.1), se analizó por comparación a través de las herramientas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con HhMan y mananasas de diferentes orígenes con CLUSTALW. (Altschul et al., 1990; Thompson et al., 1997). La búsqueda de información sobre la familia y dominios de la proteína se realizó en la base de datos Pfam (Finn et al., 2006).

Modelamiento por homología: generación estructura 3D

Mediante CLUSTALW (Thompson et al., 1997) se realizó el alineamiento entre HhMan y la proteína seleccionada con base al porcentaje de identidad entre las secuencias y la disponibilidad de estructuras 3D en la base de datos (Protein data Bank PDB). Se construyó la estructura de la endo-1,4-β-mananasa de *H. hampei* con el programa MODELLER 9V8 (Šali et al., 1993), empleando como molde las coordenadas de la estructura cristalina de la endo-1,4-β-mananasa de *Bacillus* sp. (PDB ID: 3JUG, resolución 1.60 Å) (Zhao et al., 2011).

Docking

Las estructuras 3D de los ligandos se construyeron en el servidor PRODRG (Schuttelkopf et al., 2004). El docking automático para todos los compuestos, se realizó con el programa Autodock v4 (Morris et al., 1998) empleando el modelo comparativo de la estructura completa de la proteína HhMan. En la simulación la proteína se mantuvo rígida y los átomos de los ligandos flexibles. Los parámetros de volumen atómico y solvatación atómica fueron asignados por defecto a la proteína. Se incluyeron todos los hidrógenos en las estructuras y se calculó las cargas Gasteiger. En todos los dockings se empleó un tamaño de caja de 50 x 60 x 80 puntos en las direcciones x, y, z. La dirección fue centrada en el carbono alfa del aminoácido Glu242, presente en el sitio activo de la proteína. Los corridos se generaron utilizando el algoritmo genético Lamarkiano (AGL). Se utilizaron los parámetros por defecto del programa, usando una población inicial de 200 individuos dispuestos al azar, 100 corridas por cada complejo y 25 x 10⁶ evaluaciones por corrida. La mutación y la tasa de entrecruzamiento fue de 0.8 y 0.02 respectivamente y el máximo número de generaciones fue de 27 x 10⁴. Se seleccionaron los resultados con la energía de unión más favorable como complejos estructurales finales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de inhibición de la enzima rHhMan

Se evaluó el probable efecto inhibitorio de cinco compuestos sobre la actividad enzimática de rHhMan (Fig. 1). Se seleccionaron teniendo en cuenta su analogía estructural con el monosacárido manosa, sustrato natural de la enzima. Estos compuestos presentan modificaciones en su estructura sobre la función acetálica del carbono anomérico, que les permiten ser altamente resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática (Borges de Melo et al., 2006; Hanessian et al., 1994). Se presume que estos compuestos glicomiméticos podrían imitar el comportamiento del sustrato, favoreciendo su unión con la enzima y por lo tanto la inhibición de la actividad hidrolítica sobre el sustrato natural.

En la evaluación cualitativa por cromatografía de capa fina, los compuestos 1, 2, 4 y 5 no se comportaron como inhibidores de la enzima. En la figura 2A-D, se observa que los productos de la hidrólisis del sustrato manopentosa (manosa, manobiosa, manotriosa y manotetraosa) se producen tanto en la reacción enzimática en ausencia de los compuestos, como en las reacciones que los incluyen en tres concentraciones: 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM. Por el contrario, el compuesto 3: 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido, inhibió la actividad de la enzima, por lo tanto en las reacciones enzimáticas para las tres concentraciones evaluadas del compuesto no se observan los productos de hidrólisis característicos (Fig.2E).

En la evaluación cuantitativa por el método del ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) se observó que el compuesto 3 en una concentración de 1 mM, fue el único que causó un efecto inhibitorio sobre la actividad de rHhMan. Este resultado se relaciona con lo observado en la evaluación cualitativa por cromatografía en capa fina, en donde el mismo compuesto inhibió la actividad enzimática de rHhMan. Este compuesto exhibió un 93% de inhibición y una IC_{50} de 0.12 mM.

Análisis de la secuencia de la endo-1,4- β -mananasa (HhMan)

El análisis realizado en la base de datos Pfam (E-value $1.4e^{-34}$) evidenció que HhMan pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas 5 (GH5). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos (Henrissat et al., 1997). Se presume que en las mananasas GH5 el proceso catalítico se lleva a cabo a través de un mecanismo de retención, en donde se mantiene la configuración anomérica del monosacárido (Hilge et al., 1998). En este mecanismo participan activamente dos residuos catalíticos que actúan como donador de protones y como nucleófilo; ambos están presentes en el sitio activo y son altamente conservados. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre HhMan y mananasas de *Bacillus circulans* (GenBank: AAX87003.1), *Paenibacillus polymyxa* (GenBank: ADO54643.1), *Cellvibrio japonicus* (GenBank: AA031760.1), *Clostridium butyricum* (GenBank: EEP53331.1) y *Vibrio furnissii* (GenBank: EEX39836.1) (Datos no mostrados), permitió identificar que los dos residuos catalíticos en HhMan corresponden a Glu147 y Glu242. En la figura 3 se ilustra la participación de estos dos residuos en el mecanismo de retención propuesto para HhMan (Hilge et al., 1998)

La función de los residuos glutamato se ha confirmado por mutagénesis dirigida, la sustitución por residuos de alanina provocan una notable disminución de la actividad catalítica (Dias et al., 2004)

Otros seis residuos catalíticos identificados en la secuencia de HhMan conservados en las GH5 son Arg72, Asn146, His212, Trp272, His108. Estos residuos probablemente participan en la unión al

azúcar ó estabilizan la posición o estado de protonación de los residuos glutamato catalíticos (Baird et al., 1990; Gilbert et al., 2008; Macarron et al., 1993; Tailford et al., 2009).

Modelamiento por homología de la estructura 3D de HhMan

Debido a que la estructura 3D de HhMan no se encuentra disponible en la base de datos Protein Data Bank, se desarrolló un modelo por homología. Se empleó como molde la estructura de la endo-1,4- β -mananasa de *Bacillus* sp (PDBID: 3JUG) que presentó un 53% de identidad y un 73% de similitud en el análisis BLASTp. Este porcentaje de identidad superior al 40% permite obtener una estructura modelada por homología que pueda utilizarse en los estudios de docking con suficiente precisión (Baker et al., 2001). Se calcularon 10 modelos de estructuras de la proteína y se seleccionó la que presento el valor de función objetivo mas bajo en MODELLERv4. El modelo final fue utilizado en las evaluaciones de docking molecular. La figura 4, muestra la estructura obtenida de HhMan, comparada con la estructura cristalográfica de la β -mananasa de *Bacillus* sp empleada como molde. Tanto HhMan como la de *Bacillus* sp presentan un plegamiento similar y una estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$, correspondiente al motivo estructural más frecuente en las proteínas GH5. Los residuos catalíticos están situados en las cadenas β cuatro y siete, de las ocho que constituyen el barril $(\alpha/\beta)_8$ que caracteriza su estructura.

Docking

Los estudios de docking molecular se realizaron para conocer la conformación de unión más probable del sustrato manopentosa y los análogos de manosa empleados en los ensayos de inhibición enzimática. Como se describió anteriormente, en el mecanismo hidrolítico de retención propuesto para la enzima HhMan, dos residuos catalíticos del sitio activo desempeñan un rol importante. El residuo Glu147 participa en la primera fase de protonación del enlace O-Glicosídico y posteriormente el residuo Glu242 realiza el ataque nucleofílico al carbono anomérico. En la figura 5A se indica el modo de acción calculado del sustrato en el sitio activo de HhMan y las interacciones que se presentan con los dos residuos catalíticos y otros residuos importantes. Se presentan interacciones hidrofílicas entre la estructura del sustrato, los residuos catalíticos y los residuos His108 e His212. Se presume que estas interacciones influyen el estado de protonación de los residuos glutamato, permitiendo el inicio de la catálisis enzimática. La orientación del

residuo Asn146 se estabiliza por puentes de hidrogeno con Arg72 y adicionalmente forman puentes de hidrogeno con los residuos Glu147 y Glu242 favoreciendo la orientación de los aminoácidos críticos y la estabilidad del sitio activo y de los intermedios de reacción (estados de transición). La estabilización de la posición del residuo Glu242 se logra a través de la formación de puentes de hidrogeno con el NH del anillo pirrólico del Trp272. Este residuo se estabiliza a través de puentes de hidrogeno con los residuos Arg72 y Tyr214. (Hilge et al., 1998). Interacciones similares se han observado en complejos estructurales de diferentes mananasa como la de *Trichoderma Ressei* (Dias et al., 2004; Sabini et al., 2000).

En modo de unión calculado para el compuesto 3: 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido en el sitio activo de la enzima HhMan, se ilustra en la figura 5D. Se observa que el sustituyente nitrofenilo del inhibidor se orienta hacia el interior del sitio activo de la enzima. Esta orientación se puede ver favorecida por interacciones hidrofóbicas que se presentan con la cadena lateral del residuo Tyr214 y por puentes de hidrogeno formados entre el grupo hidroxilo del anillo aromático del residuo Tyr214 y el grupo nitro presente como sustituyente. Se sugiere que estas interacciones podrían modificar la estabilidad de los residuos catalíticos Glu147 y Glu242, impidiendo su acción en el mecanismo catalítico. Adicionalmente estas interacciones podrían facilitar la unión enzima-inhibidor y generar un impedimento estérico en el ingreso del sustrato al sitio activo de la enzima.

El modo de unión calculado para el compuesto 1 se observa en la figura 5B. Pese a la similitud estructural con el compuesto 3 (Fig.5D) se orienta de forma opuesta con respecto al sitio activo de la enzima. Su porción hidrofílica podría formar puentes de hidrogeno con el residuo Glu147, sin embargo esta interacción no influye en la actividad catalítica. Posiblemente existe una relación entre la presencia y orientación del anillo nitrofenilo con el mecanismo de inhibición. Interacciones hidrofóbicas con el residuo Tyr214 y el anillo aromático del residuo Trp272, podrían desempeñar un rol importante en este mecanismo.

Los compuestos 2 y 4 no presentan interacciones con los aminoácidos Tyr214 y Trp272 que al parecer son importantes en el mecanismo de inhibición. A pesar de que los sustituyentes de estos compuestos presentan una naturaleza química diferente, comparten su gran volumen. Esta característica se refleja en un mayor impedimento estérico y ángulos de rotación limitados que impiden el acercamiento a los residuos del sitio activo de la enzima y por lo tanto disminuyen las interacciones necesarias para alterar el entorno del sitio activo (Fig.5C-5E).

El modo de acción calculado para el compuesto 5 en el sitio activo de HhMan, se indica en la figura 5F. Este, es el compuesto estructuralmente mas parecido al monómero del sustrato natural,

sin embargo la ubicación en el sitio activo difiere a la del sustrato, impidiendo la interacción con los residuos catalíticos Glu147 y Glu242. Adicionalmente la ausencia de hidroxilos en el carbono anomérico, dificultan la interacción con el anillo aromático del residuo Tyr214 y la formación de puentes de hidrogeno aparentemente claves en el mecanismo catalítico de la enzima.

CONCLUSIONES

En este estudio se describe por primera vez al compuesto 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido como inhibidor de la endo-1,4- β -mananasa de la broca del café. En la evaluación cualitativa por cromatografía en capa fina, el compuesto inhibió de la actividad enzimática de HhMan. Este resultado se confirmó en la evaluación cuantitativa por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, en donde una concentración de 1mM del compuesto inhibió en un 93% la actividad enzimática de HhMan. El compuesto exhibió una IC_{50} de 0.12mM. Las características estructurales determinadas en este trabajo relevan las probables interacciones del compuesto inhibidor con los residuos del sitio activo de HhMan, lo cual representa el punto de partida para el desarrollo de nuevas moléculas que puedan utilizarse en estrategias de control de la plaga.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (contrato #074/2007). Los autores agradecen a Eliana P. Velázquez cM.Sc y Nevar A. García Bastidas c.M.Sc por su colaboración en los análisis de modelamiento y docking. A Karent E. Bravo Muñoz M.Sc, por la revisión y valiosos aportes en el desarrollo del manuscrito.

FIGURAS

Figura 3-1: Estructura química de los compuestos empleados en los ensayos de inhibición de rHhMan. Compuesto 1: 4-nitrofenil- β -D-manopiranosido, **compuesto 2:** 4-metillumberiferil- β -D-manopiranosido, **compuesto 3:** 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido, **compuesto 4:** 1, 3, 4, 6-tetra-O-acetil- β -D-manopiranosido, **compuesto 5:** 1-deoximanojirimicina hidrocloreuro.

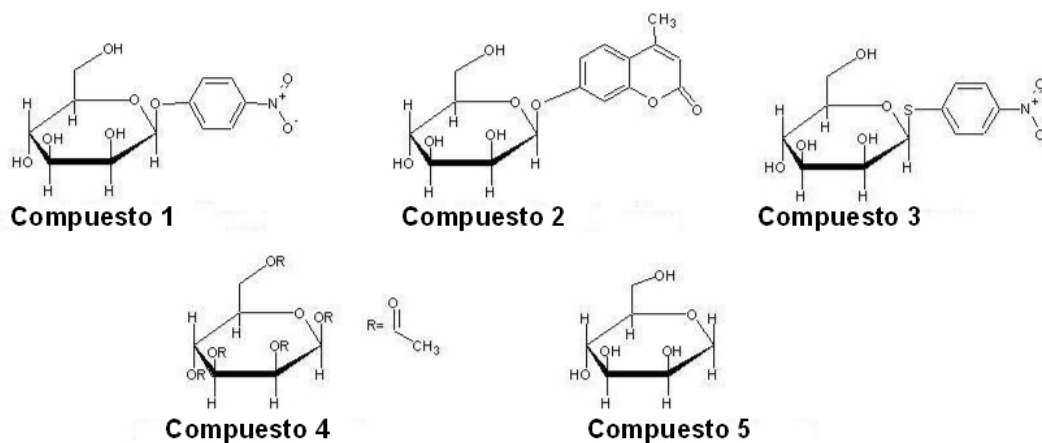


Figura 3-2: Evaluación de la inhibición de rHhMan por cromatografía en capa fina. a) Compuesto 1 b) Compuesto 2, c) Compuesto 4, d) Compuesto 5, e) Compuesto 3. En cada placa se incluyen una mezcla de mano oligosacáridos (manosa-manopentosa) (**st**), diferentes concentraciones de compuesto evaluado **1**:0.25 mM **2**: 0.5 mM. **3**:1 mM. Cada reacción enzimática se realizó en presencia de 0.05 μ g de rHhMan pura y 25 mM de manopentosa disuelto en buffer citrato de sodio 0.1M (pH 5.5).

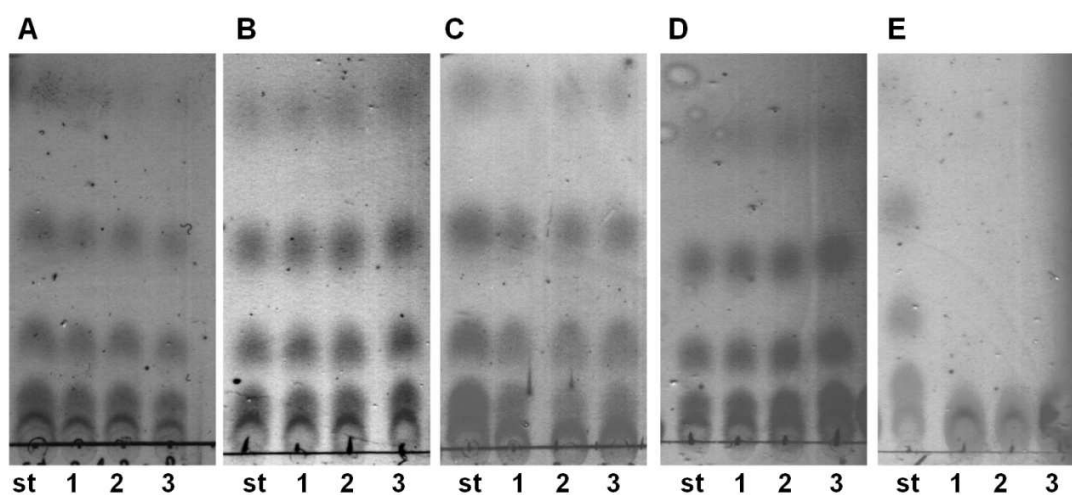


Figura 3-3: Representación esquemática del mecanismo catalítico propuesto para HhMan
 Mecanismo de retención de la enzima, en la cual el oxígeno glicosídico es protonado por Glu147 (donador de protones) y el carbono anomérico es atacado por Glu242 (Nucleófilo). El intermediario resultante manosil-mananasa es hidrolizado por una molécula de agua, generando un producto con la misma configuración anomérica del sustrato. Modificado de (Hilge et al., 1998)

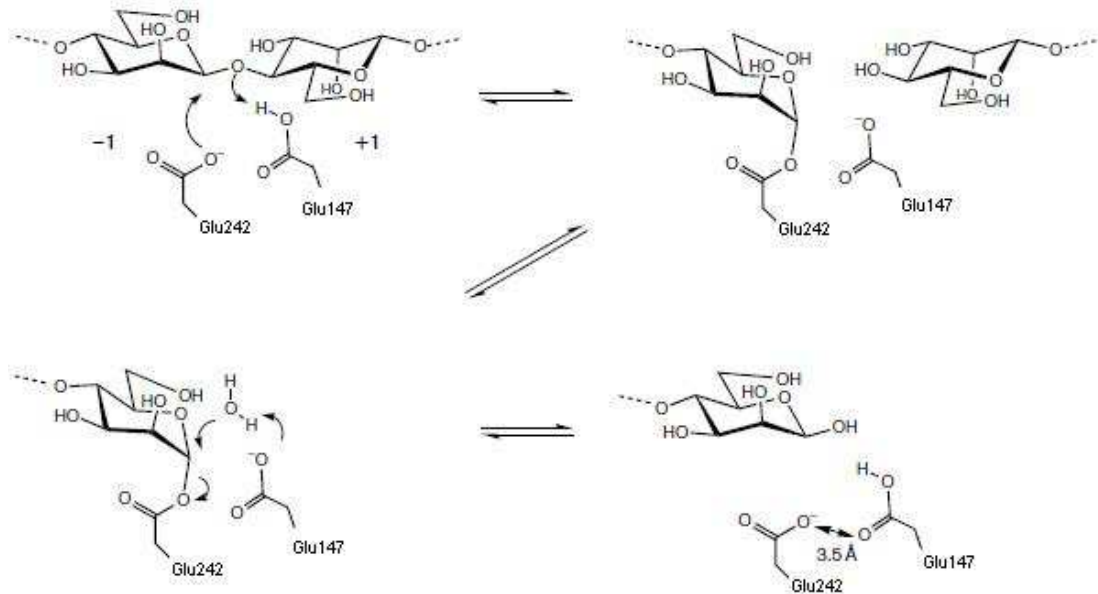
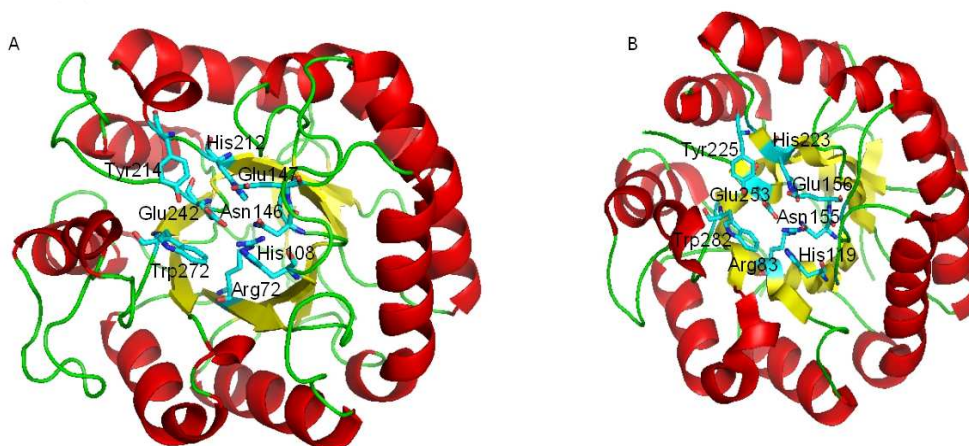
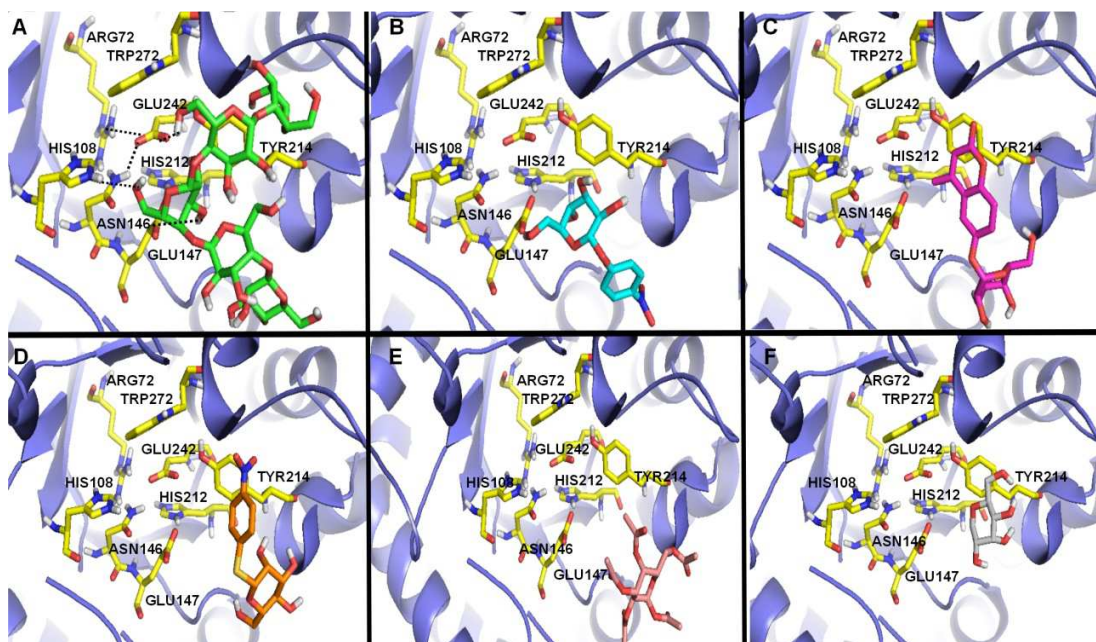


Figura 3-4: Vista comparativa de a) Estructura de HhMan modelada por homología. b) Estructura de la endo-1,4-β-mananasa de *Bacillus sp.* (PDBID:3JUG) obtenida por cristalografía de rayos X. Se señalan ocho residuos estrictamente conservados en proteínas de la familia GH5.



Caracterización bioquímica de una endo- β -mananasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Figura 3-5: Resultado del docking molecular. Se presentan las conformaciones de unión de: a) El sustrato manopentosa, b) compuesto 1, c) compuesto 2, d) compuesto 3, e) compuesto 4, f) compuesto 5, interactuando con los residuos del sitio activo de la estructura modelada de HhMan.



BIBLIOGRAFIA

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-410.

BAIRD SD, HEFFORD MA, JOHNSON DA, SUNG WL, YAGUCHI M, SELIGY VL. The Glu residue in the conserved ASN-Glu-Pro sequence of two highly divergent endo- β -1,4-glucanases is essential for enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;169(3):1035-1039.

BAKER D, SALI A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science*. 2001;294(5540):93-96.

BARBOSA A, ALBUQUERQUE E, SILVA M, SOUZA D, OLIVEIRA-NETO O, VALENCIA A, et al. alpha-Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits alpha-amylases from the coffee berry borer pest. *BMC Biotechnology*. 2010;10(1):44.

BORGES DE MELO E, DA SILVEIRA GOMES A, CARVALHO I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. 2006;62(44):10277-10302.

BUSTILLO PARDEY AE. Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 2006;32(101-116).

DIAS FMV, VINCENT F, PELL G, PRATES JAM, CENTENO MSJ, TAILFORD LE, et al. Insights into the Molecular Determinants of Substrate Specificity in Glycoside Hydrolase Family 5 Revealed by the Crystal Structure and Kinetics of *Cellvibrio mixtus* Mannosidase 5A. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(24):25517-25526.

FINN RD, MISTRY J, SCHUSTER-BÖCKLER B, GRIFFITHS-JONES S, HOLLICH V, LASSMANN T, et al. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(suppl 1):D247-D251.

GILBERT HJ, STÅLBRAND H, BRUMER H. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008;11(3):338-348.

HANESSIAN S, PRABHANJAN H. Design and synthesis of glycomimetic prototypes - A model sialyl lewisx ligand for E-Selectin. *Synlett*. 1994;1994(10):868,870.

HENRISSAT B, DAVIES G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. 1997;7(5):637-644.

HILGE M, GLOOR SM, RYPNIEWSKI W, SAUER O, HEIGHTMAN TD, ZIMMERMANN W, et al. High-resolution native and complex structures of thermostable β -mannanase from

Caracterización bioquímica de una endo- β -mannanasa de la broca del café
Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytinae)

Thermomonospora fusca substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. Structure (London, England : 1993). 1998;6(11):1433-1444.

JARAMILLO J, BORGEMEISTER C, BAKER P. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. Bulletin of Entomological Research. 2006;96(03):223-233.

MACARRON R, VAN BEEUMEN J, HENRISSAT B, DE LA MATA I, CLAEYSSSENS M. Identification of an essential glutamate residue in the active site of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. FEBS Letters. 1993;316(2):137-140.

MORRIS GM, GOODSELL DS, HALLIDAY RS, HUEY R, HART WE, BELEW RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. Journal of Computational Chemistry. 1998;19(14):1639-1662.

NAVARRO L, GONGORA C, BENAVIDES P. Single nucleotide polymorphism detection at the *Hypothenemus hampei* Rdl gene by allele-specific PCR amplification with Tm-shift primers. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2010;97(3):204-208.

PAVA-RIPOLL M, POSADA FJ, MOMEN B, WANG C, ST. LEGER R. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. Journal of Invertebrate Pathology. 2008;99(2):220-226.

PETER B. Amylases, α and β . Methods in Enzymology. Academic Press, 1955. 149-158.

SABINI E, SCHUBERT H, MURSHUDOV G, WILSON KS, SIIKA-AHO M, PENTTILA M. The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* β -mannanase from glycoside hydrolase family 5. Acta Crystallographica Section D. 2000;56(1):3-13.

ŠALI A, BLUNDELL TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. Journal of Molecular Biology. 1993;234(3):779-815.

SCHUTTELKOPF AW, VAN AALTEN DMF. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta Crystallographica Section D. 2004;60(8):1355-1363.

TAILFORD LE, DUCROS VMA, FLINT JE, ROBERTS SM, MORLAND C, ZECHEL DL, et al. Understanding How Diverse β -Mannanases Recognize Heterogeneous Substrates. Biochemistry. 2009;48(29):7009-7018.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. Nucleic Acids Research. 1997;25(24):4876-4882.

ZHAO Y, ZHANG Y, CAO Y, QI J, MAO L, XUE Y, et al. Structural Analysis of Alkaline β -Mannanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5: Implications for Adaptation to Alkaline Conditions. PLoS ONE. 2011;6(1):e14608.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Este estudio es el primer reporte de una endo-1,4- β -mananasa de un insecto expresada en el sistema de *Pichia pastoris*. Esta enzima tiene un peso molecular de 35.5 kDa. Hace parte de la familia de glicosil hidrolasas GH5 y contiene ocho residuos estrictamente conservados en las proteínas de esta familia.

La enzima exhibe actividad óptima en condiciones similares a las presentes fisiológicamente el tracto digestivo de la broca. rHhMan tiene la capacidad de hidrolizar diferentes galactomananos y mano-oligosacáridos que pueden ser utilizados en las industrias farmacéuticas y de alimentos, debido a que exhiben efectos benéficos sobre la salud de los humanos.

El rol que desempeña esta enzima en los procesos asimilación del principal polisacárido del grano de Café (Galactomanano, único alimento de la broca, hace que los resultados obtenidos sean una buena aproximación al diseño de inhibidores de rHhMan que puedan ser utilizados como estrategias biotecnológicas de control que permitan reducir las pérdidas económicas ocasionadas por esta plaga.

En este estudio se describe por primera vez al compuesto 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido como inhibidor de la endo-1,4- β -mananasa de la broca del café. En la evaluación cualitativa por cromatografía en capa fina, el compuesto inhibió de la actividad enzimática de HhMan. Este resultado se confirmó en la evaluación cuantitativa por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, en donde una concentración de 1mM del compuesto inhibió en un 93% la actividad enzimática de HhMan. El compuesto exhibió una IC₅₀ de 0.12mM. .

4.2 Recomendaciones

Se propone estudiar el efecto del compuesto 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido en bioensayos con la broca del café, adicionalmente evaluar el compuesto descrito en estrategias de control de organismos diferentes a la broca, que utilicen mananasa como factor de patogenicidad.

Adicionalmente el inhibidor 4-nitrofenil-tio- β -D-manopiranosido puede ser utilizado en procesos industriales en donde se requiera inhibir la acción enzimática de esta enzima.

A. Anexo: secuencia de nucleótidos del gen la endo-1,4- β -mananasa de la broca del café *hypothenemus hampei* (HhMan).no accesión: gv661326.1

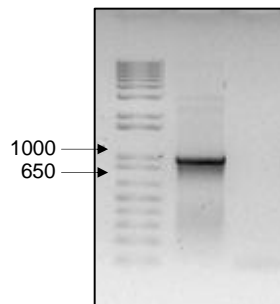
ATGACCGCTGATACATTAACGCGGGCACTGCTGCTGTTGCTGTTGTTGCGCGCTGCTG
CTGCTGTACCCGGATTACGGTTTCCGGTACTCGAATTTAGATGCTAACGGTCAGGA
ATTTATGATAAGAGGGGTCAGTCACGCACATACCTGGTATAAGGATGATATTAATGGG
GCCATCACATCCATCGCTGCTGCTGGCGCCAACACGGTTCGCATTGTACTTTCTAATGG
CGGACAGTGGACAAAAGACAACCTGGATTACAGTTCAGAACATTCTGTCCCTCTGTGAG
AGCCATAAGCTTATTGCCATGCTGGAAGTTCACGATGCCACCGGCAATGACAGCCAAG
AAACACTGGAAAATGCCGTGAATTACTGGAAAGAGCTTCGGGACTTGCTCATTGGTAA
GGAAGACAGAGTTATTATCAATATAGCCAATGAGTGGTTCGGTACCTGGGATACTGCT
GGCTGGGCCGACGGTTATAAAGTTGTCATTCCGGAACACTACGTAACGCCGGACTGGAAC
ACCTGCTGGTTGTAGACACAGCGGGATACGGACAATATCCTCAAGCTATTTTTGAAAA
AGGTAAGGAGGTTTTCCAGACAGACCTTCTTGCCCGCACGGTGTTTTCCATTCACATGT
ATGAATATGCAGCGACGGATGTAACAATGATAAAAGGAAATATTGACTCGGCCTTGA
ATACAGGCATCCCGGTGATTATTGGAGAATTTGGTGACCGAAAACCGGAGTCGCAGC
ATGTTGATATCGATACCATCATGAGCTACACTCGCGAGAAATCCGTAGGCTGGTTGGC
CTGGTCCTGGTACGGTAACGGTAACGATGAATCAATTCTTGACCTGACGAACGGACCT
AGCGGAGATTACAGTCTTACTAACGTGGGGAGTCAAATTGTTGACAGTGAGAACGGC
ATTCGCAAAACCTCCACAATCTGTTCAATATTCAAT

B. Anexo: secuencia de aminoácidos de la proteína endo-1,4- β -mananasa de la broca del café *Hypothenemus hampei* (HhMan) no accesión: ADF22325.1 producto de amplificación del gen *HhMan*.

MTADTLTRALLLLLLLRAAAAVPGFTVSGTRILDANGQEFMIRGVSHAHTWYKDDINGAI
TSIAAAGANTVRIVLSNNGGQWTKDNLDSVQNILSLCESHKLIAMLEVHDATGNDSQETLE
NAVNYWKELRDLLIGKEDRVIINIANEWFGTWDTAGWADGYKVVPELRNAGLEHLLVV
DTAGYGQYPQAIFEKGKEVFQTDLLARTVFSIHMYEYAATDVTMIKGNIDSALNTGIPVII
GEFGDRKPESQHVDIDTIMSYTREKSVGWLAWSWYGNGNDESILDLTNGPSGDYSLTNV
GSQIVDSENGIRKTSTICSIFN

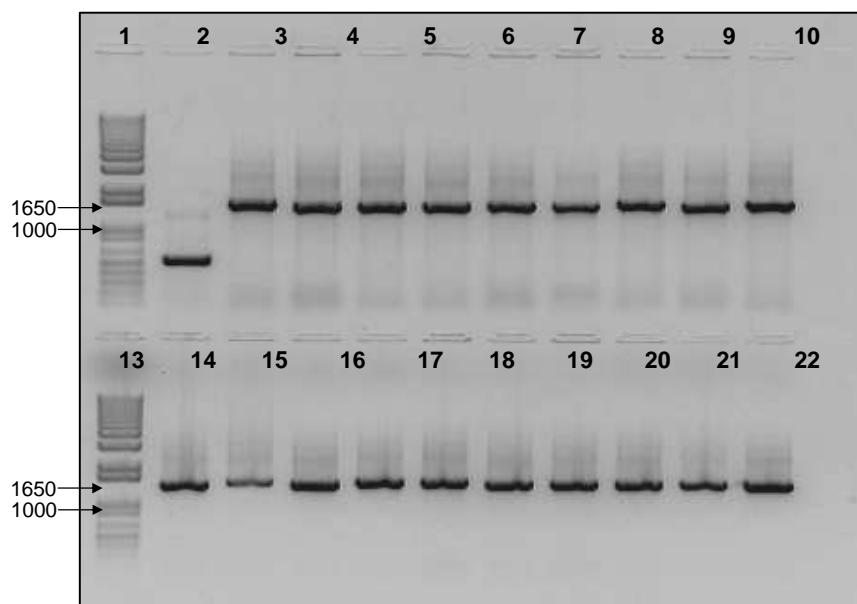
C. Anexo: Producto de amplificación del gen *HhMan*.

Se observa el producto amplificado del gen *HhMan*. **1.** Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA ladder). **2.** Producto amplificado de 900 pb. **3.** Control negativo de la reacción de PCR



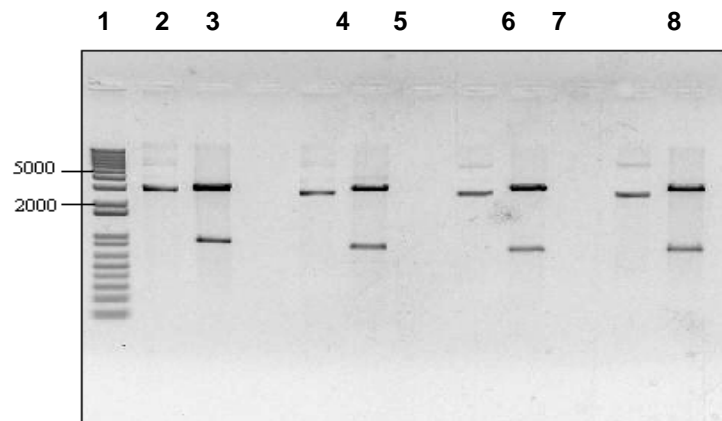
D. Anexo: PCR de colonias transformadas con pPicz α A- HhMan empleando los primers aox1.

Se observa un producto esperado de aproximadamente 1500 pb correspondientes a 900 pb del inserto y 590 pb de la región que flanquea el inserto. **1 y 13.** Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA ladder) **2-11.** Colonias evaluadas 1-10. **14-23** Colonias evaluadas 11-20.



E. Anexo: análisis de restricción de la construcción Ppicz α a/Hhman.

1. Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA ladder). 2. pPICZ α A/HhMan col17 sin digerir. 3. pPICZ α A/HhMan col17 digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. 4. pPICZ α A/HhMan col19 sin digerir. 5. pPICZ α A/Hhman col19 digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. 6. pPICZ α A/HhMan col6 sin digerir. 7. pPICZ α A/HhMan col6 digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. 8. pPICZ α A/HhMan col15 sin digerir. 9. pPICZ α A/HhMan col15 digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI*.



Bibliografía

ACUÑA R, PADILLA BE, FLÓREZ CP, RUBIO JD, HERRERA JC, BENAVIDES P, et al. Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(11):4197-4202.

ADAMS M, KELLEY J, GOCAZYNE J, DUBNICK M, POLYMEROPOULOS M, XIAO H, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science. 1991;252(5013):1651-1656.

ALVARADO G, POSADA H, CORTINA H. Castillo: Nueva variedad de café con resistencia a la roya. Avances Técnicos Cenicafe. Chinchiná (Colombia), 2005. 1 - 4 p.

ARYA M, RAO LJM. An Impression of Coffee Carbohydrates. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2007;47(1):51-67.

BARBOSA A, ALBUQUERQUE E, SILVA M, SOUZA D, OLIVEIRA-NETO O, VALENCIA A, et al. alpha-Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits alpha-amylases from the coffee berry borer pest. BMC Biotechnology. 2010;10(1):44.

BERGAMIN J. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col. Ipidae). Arquivos do Instituto Biológico, 1943. 31 - 72 p.

BERTRAND B, VILLARREAL D, LAFFARGUE A, POSADA H, LASHERMES P, DUSSERT S. Comparison of the Effectiveness of Fatty Acids, Chlorogenic Acids, and Elements for the Chemometric Discrimination of Coffee (*Coffea arabica* L.) Varieties and Growing Origins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008;56(6):2273-2280.

BUSTILLO AE. Aspectos sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchiná (Colombia), 2008. 388 - 418 p.

CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Research. 2009;37(suppl 1):D233-D238.

DAMON A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research. 2000;90(06):453-465.

DAVIS AP, GOVAERTS R, BRIDSON DM, STOFFELEN P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society. 2006;152(4):465-512.

DE AZEVEDO PEREIRA R, NOGUEIRA BATISTA JA, MATTAR DA SILVA MC, BRILHANTE DE OLIVEIRA NETO O, ZANGRANDO FIGUEIRA EL, VALENCIA JIMÉNEZ A, et al. An α -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Phytochemistry. 2006;67(18):2009-2016.

DELGADO PA, VIGNOLI JA, SIIKA-AHO M, FRANCO TT. Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis. Food Chemistry. 2008;110(1):168-176.

DHAWAN S, KAUR J. Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. Critical Reviews in Biotechnology. 2007;27(4):197-216.

DUQUE H, BAKER P. Devouring Profit: the socioeconomics of coffee berry borer IPM. Editorial Feriva, Colombia. 2003. 106 p.

ELBEIN AD, MOLYNEUX RJ. Alkaloid Glycosidase Inhibitors. in: M Editors-in-Chief: Lew, L Hung-Wen (Eds.), Comprehensive Natural Products II. Elsevier. Oxford, 2010. 225-260.

FISCHER M, REIMANN S, TROVATO V, REDGWELL RJ. Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*. 2001;330(1):93-101.

FLÓREZ CP, PADILLA BE, RANGEL MP, RUBIO D, OSSA G, VASQUEZ JJ, et al. Genómica de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae). En: resúmenes Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología Socolen, XXXII. 2005;18 p.

HAQ SK, ATIF SM, KHAN RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004;431(1):145-159.

HÉMA O, SOMÉ HN, TRAORÉ O, GREENPLATE J, ABDENNADHER M. Efficacy of transgenic cotton plant containing the Cry1Ac and Cry2Ab genes of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* and *Syllepte derogata* in cotton cultivation in Burkina Faso. *Crop Protection*. 2009;28(3):205-214.

ICO. Organización Internacional del Café, Todo sobre el Café. 2012. Información estadística. URL: <http://www.ico.org>.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ R, DEL CARMEN RODRÍGUEZ-GACIO M, BARRERO-SICILIA C, CARBONERO P, MATILLA AJ. Molecular analysis of endo- β -mannanase genes upon seed imbibition suggest a cross-talk between radicle and micropylar endosperm during germination of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(1):80-82.

JARAMILLO J, BORGEMEISTER C, BAKER P. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research*. 2006;96(03):223-233.

JØRGENSEN H, SANADI A, FELBY C, LANGE N, FISCHER M, ERNST S. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;161(1):318-332.

LIEPMAN AH, NAIRN CJ, WILLATS WGT, SØRENSEN I, ROBERTS AW, KEEGSTR A K. Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. *Plant Physiology*. 2007;143(4):1881-1893.

LIN J, PANTALONE VR, LI G, CHEN F. Molecular Cloning and biochemical characterization of an endo- β -mannanase gene from soybean for soybean meal Improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(9):4622-4628.

MCCLEARY BV, AMADO R, WAIBEL R, NEUKOM H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydrate Research*. 1981;92(2):269-285.

MONDEGO J, VIDAL R, CARAZZOLLE M, TOKUDA E, PARIZZI L, COSTA G, et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biology*. 2011;11(1):30.

MOREIRA L, FILHO E. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79(2):165-178.

NAVARRO L, GONGORA C, BENAVIDES P. Single nucleotide polymorphism detection at the *Hypothenemus hampei* Rdl gene by allele-specific PCR amplification with Tm-shift primers. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010;97(3):204-208.

PALACKAL N, LYON C, ZAIDI S, LUGINBÜHL P, DUPREE P, GOUBET F, et al. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(1):113-124.

PARVATHY KS, SUSHEELAMMA NS, THARANATHAN RN, GAONKAR AK. A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62(2):137-141.

REDGWELL R, FISCHER M. Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2006;18(1):165-174.

VAN ZYL WH, ROSE SH, TROLLOPE K, GÖRGENS JF. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*. 2010;45(8):1203-1213.

VIKTORINOVA I, KUCEROVA L, BOHMOVA M, HENRY I, JINDRA M, DOLEZAL P, et al. Characterization of two closely related α -amylase paralogs in the bark beetle, *Ips typographus* (L.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2011;77(4):179-198.

XU B, SELLOS D, JANSON J-C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β -mannanase gene. *European Journal of Biochemistry*. 2002;269(6):1753-1760.

ZAHURA UA, RAHMAN MM, INOUE A, TANAKA H, OJIMA T. cDNA cloning and bacterial expression of an endo- β -1,4-mannanase, AkMan, from *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;159(4):227-235.