

REMOCIÓN DE SEDIMENTOS EN EXTRACTOS DE CAFÉ MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON UNA MANANASA DE *Hypothenemus hampei*

Laura Vanessa Zuluaga Cardona*; Beatriz Elena Padilla Hurtado*; Carolina Aguilera Galvez*; José Luis Ocampo**; José Ricardo Acuña Zornosa***

ZULUAGA, L.V.; PADILLA, B.E.; AGUILERA, C.; OCAMPO, J.L.; ACUÑA S., J.R. Remoción de sedimentos en extractos de café mediante hidrólisis enzimática con una mananasa de *Hypothenemus hampei*. Revista Cenicafé 68(2):90-98. 2017

Con el objeto de encontrar alternativas para la remoción enzimática de sedimentos en extractos concentrados de café, se evaluó la producción de una mananasa clonada a partir del genoma de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y su uso en la hidrólisis de los galactomananos que componen estos sedimentos. La producción de la mananasa se hizo mediante fermentaciones en biorreactor con una cepa de *Pichia pastoris*, previamente recombinada con el gen de la mananasa de la broca. Se evaluaron tres medios de cultivo y de cada fermentación se purificó la mananasa mediante cromatografía de afinidad. La actividad enzimática se verificó mediante una prueba de hidrólisis con galactomanano purificado de semillas de café. Se evaluó la actividad enzimática de la mananasa recombinante junto con otras enzimas comerciales, utilizando como sustrato el galactomanano puro. La actividad enzimática se calculó midiendo la cantidad de manosa producida en función del tiempo y la cantidad de enzima utilizada. La mananasa de la broca mostró la mayor actividad enzimática. Se evaluó el porcentaje de remoción de sedimentos en extractos concentrados de café mediante hidrólisis enzimática con la mananasa de la broca en comparación con otras enzimas comerciales. La incubación de los extractos con la mananasa de la broca logró el 95% de remoción de sedimentos en comparación con el 66% y 33% de remoción con otras enzimas. El uso de esta mananasa es una alternativa para la remoción de sedimentos en el proceso de industrialización del café, sin afectar la calidad sensorial del extracto.

Palabras clave: Broca del café, galactomanano, remoción de sedimentos.

SEDIMENTS REMOVAL IN COFFEE EXTRACTS BY ENZYMATIC HYDROLYSIS WITH A MANNANASE OF *Hypothenemus hampei*

In order to find alternatives for the enzymatic removal of sediments in concentrated coffee extracts, the production of a mannanase cloned from the genome of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and its use in the hydrolysis of the galactomannans that make up these sediments were evaluated. The production of mannanase was made by fermenting, in a bioreactor, a strain of *Pichia pastoris*, previously recombined with the gene of the coffee berry borer mannanase. Three culture media were evaluated and the mannanase in each fermentation was purified by affinity chromatography. The enzymatic activity was verified by a hydrolysis test with purified galactomannan of coffee seeds. The enzymatic activity of the recombinant mannanase, along with other commercial enzymes, was assessed using pure galactomannan as substrate. The enzymatic activity was calculated by measuring the amount of mannanase produced depending on the time and the amount of enzyme used. The mannanase of the coffee berry borer showed greater enzymatic activity. The percentage of sediments removal in concentrated coffee extracts was evaluated by enzymatic hydrolysis with the mannanase of coffee berry borer compared to other commercial enzymes. The extracts incubation with the coffee berry borer mannanase reached 95% of sediments removal compared with 66% and 33% of removal with other enzymes. The use of this mannanase is an alternative to the removal of sediment in the process of coffee industrialization, without affecting the sensory quality of the extract.

Keywords: Coffee berry borer, galactomannan, sediments removal.

* Ingeniera Química, Bacterióloga e Química Farmacéutica (hasta el año 2009), Disciplina de Mejoramiento Genético, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

** Ingeniero Gestión Ambiental, Fábrica de Café Liofilizado Buencafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Investigador Científico III, Disciplina de Mejoramiento Genético, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

Los extractos del café son procesados industrialmente en café instantáneo o en extractos concentrados para exportación. Durante el almacenaje y transporte comercial de los extractos concentrados se forman sedimentos insolubles, los cuales se consideran como un defecto de calidad y una limitante comercial del producto (6). El porcentaje de sedimentos cambia con el grado de tostación, aunque la materia prima y el grado de extracción de los sólidos solubles también puede influir, Buencafé Liofilizado de Colombia reporta contenidos de hasta un 14% de sedimentos (V/V;10°Brix) en extractos de café de alta tostación (comunicación personal).

El principal componente de los sedimentos es el galactomanano, un polisacárido lineal que por asociaciones químicas forma regiones cristalinas muy rígidas que se precipitan en el proceso de manufacturación del extracto concentrado. El galactomanano junto con otros polisacáridos constituyen el 56% en base seca de la semilla de café y forman parte de las paredes celulares vegetales, siendo el 26% de galactomanano (3).

El galactomanano está constituido por una cadena enlazada de β -(1 \rightarrow 4)-mananos bifurcada lateralmente por unidades de galactosa. En el grano de café el galactomanano tiene una relación de galactosa/manosa muy baja (1:10-30), que lo hace muy insoluble en agua. Esta insolubilidad es la responsable de la proporción de sedimentos no extraíbles durante la producción de café soluble, lo que impide un incremento en el rendimiento industrial, además de generar una alta viscosidad y dificultades en el almacenamiento del licor concentrado (6).

La enzima esencial para la degradación de los mananos es una endo- β -mananasa, la cual hidroliza el enlace interno β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranosil en el esqueleto del manano

originando una mezcla de oligo-mananos, principalmente manotriosa, manobiosa y manotetrosa, que son solubles en agua. Esta enzima es producida por varios organismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, plantas, algas marinas y, muy recientemente, se ha demostrado que esta enzima fue transferida horizontalmente de una bacteria simbiote a la broca del café (*Hypothenemus hampei*) para conferirle ventajas adaptativas para alimentarse de granos de café (1). Se han utilizado productos comerciales que incluyen mezclas de celulasas, proteasas, pectinasas y mananasas para digerir sedimentos presentes en extractos de café. La mayor reducción se obtuvo usando Rohapect BIL[®] (pectinasa) y Galactomananasa ACH[®], en concentraciones de 0,3 y 0,1 mg de proteína por cada gramo de sedimento, respectivamente (6).

Recientemente, en la broca del café se identificó un gen (*HhMan*) que codifica una endo-mananasa, la cual fue aislada del tracto digestivo del insecto y ha demostrado su capacidad catalítica para hidrolizar el galactomanano de la semilla del café (1). El gen de la mananasa de la broca fue clonado en la levadura *Pichia pastoris* y se logró la producción de proteína en fermentaciones hechas en condiciones controladas de bioreactor. La mananasa (*rHhMan*) fue purificada y se determinaron las condiciones óptimas de máxima actividad enzimática (2).

En este trabajo se evaluó la reducción de sedimentos en extractos de café mediante hidrólisis enzimática con una endo-mananasa recombinante (*rHhMan*) proveniente de la broca del café y se comparó con la de otras enzimas comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue desarrollado en los laboratorios de Mejoramiento Genético del Centro Nacional

de Investigaciones de Café- Cenicafé y las pruebas de calidad en taza se realizaron en las instalaciones de Investigación y Desarrollo de la Fábrica de Café Liofilizado-Buencafé.

1. Enzimas comerciales:

Las enzimas Rohapect B1L[®], Rohalasa GMP (AB Enzymes, Darmstadt, Alemania) y CoffeeMax (Proenzimas S.A., Cali, Colombia) se obtuvieron comercialmente. La enzima Rohapect B1L es una preparación con base en pectinasas y hemicelulasas, recomendada por el fabricante para el tratamiento de extractos de café. La enzima Rohalasa GMP es un producto que contiene mananasa como su principal actividad enzimática, y glucanasa, xilanasas y celulasa como actividades colaterales, es recomendada por el fabricante para cualquier aplicación donde los galactomananos y otros polisacáridos requieran ser hidrolizados.

2. Producción de mananasa de la broca mediante fermentación en bioreactor:

Se utilizó una cepa de *Pichia pastoris* previamente transformada con el plásmido pPICZ α A, de acuerdo a la metodología

descrita por Padilla *et al.* (8) y Aguilera *et al.* (2), y que contenía el gen de la mananasa de la broca (Secuencia GenBank ADF22325.1). Como control se utilizó una cepa de *P. pastoris* sin transformar. Cada cepa fue inoculada en 100 mL de medio BMGY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 1% glicerol, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Biotina, y 0,1 M fosfato de potasio, pH 6,0), a 30°C, en agitación constante (250 rpm) y a la oscuridad. Al siguiente día se realizó la inoculación de 5 mL de biomasa en 45 mL de solución nutritiva. Se evaluaron tres formulaciones de solución nutritiva BMGY, BMMY y BSM, enriquecidas con peptona (Tabla 1). Los cultivos se incubaron durante 4 días y se inocularon diariamente con 0,5% (v/v) de metanol y 1,0% (v/v) de sorbitol. Para cada una de las fermentaciones mediante centrifugación durante 10 min a 6.000 rpm y 4°C se recolectó el sobrenadante. Se purificó la mananasa de cada uno de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad, usando una resina de Níquel (Qiagen, Valencia, CA, USA), y posteriormente se eluyó de la columna con 400 μL de imidazol (500 mM). Las fracciones eluyentes se concentraron por ultrafiltración a través de un filtro Amicon

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo usados en las fermentaciones con cepas de *P. pastoris* recombinadas con el gen de mananasa de la broca del café.

Medio BMGY	Medio BMMY	Medio BSM (1 L)
Peptona, 2,0%	Peptona, 2,0%	Ácido fosfórico (85%), 26,7 mL
Extracto de levadura, 1,0%	Extracto de levadura, 1,0%	Sulfato de calcio (0,93 g)
Medio base de levadura, 1,34%	Medio base de levadura, 1,34%	Sulfato de potasio (18,2 g)
Buffer fosfato de potasio (pH=6,0) 100 mM	Buffer fosfato de potasio (pH=6,0), 100 mM	Sulfato de magnesio (14,9 g)
Biotina (0,0004%)	Biotina (0,0004%)	Hidróxido potasio (4,13 g)
Glicerol 1% (v/v)		Hidróxido de amonio (pH=5,0)
		Glicerol (40 g)
		Solución PTM1 (Vitaminas)

ultra-0,5 kDa® (Millipore, Bedford, MA, USA). De cada fracción concentrada se evaluó la pureza de la mananasa (*rHhMan*) mediante electroforesis SDS-PAGE (12%), de acuerdo a la metodología descrita por Laemli (7). Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con Coomassie R-250 y se utilizó un estándar de bajo peso molecular como referencia (Biorad, Hercules, California, EUA).

3. Cuantificación de proteína:

La enzima se cuantificó de acuerdo al método de Bradford (4) siguiendo las instrucciones del fabricante del kit Bio-Rad Protein Assay (Biorad Laboratories Inc, CA, USA). Se hizo una curva de calibración con Albúmina Sérica Bovina (BSA), partiendo de una solución stock de 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y realizando diluciones de 750, 500, 250 y 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para cuantificar la proteína de una muestra se utilizaron 1.250 μL de reactivo, 40 μL de NaCl al 0,85% y 10 μL de la enzima mananasa recombinante y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

4. Preparación del galactomanano:

El galactomanano que se utilizó como sustrato en las reacciones de hidrólisis enzimática se obtuvo a partir de 30 g de café verde, siguiendo la metodología descrita por Cerqueira *et al.* (5). Para los experimentos el galactomanano se disolvió al 1,0% (p/v) en 200 mM de acetato de sodio y 100 mM de NaCl (pH = 6,0).

5. Hidrólisis enzimática de galactomanano:

En tubos de micro-centrífuga (1,5 mL) se dispensaron 500 μL de la solución de galactomanano (1%) y se adicionaron, respectivamente, 6 μg de proteína de Rohapect B1L®, Rohalasa® GMP, CoffeeMax® y Mananasa

de la broca (*rHhMan*), obtenida como se describió anteriormente. En ese momento se tomaron 100 μL de muestra para la medición de manosa en el tiempo cero. El resto de la muestra se incubó a 50°C y se dejó transcurrir la hidrólisis durante 30 min. En ese instante se tomaron 100 μL de la mezcla y se determinó la actividad enzimática. Cada reacción se hizo por triplicado para cada una de las enzimas evaluadas. La actividad de la enzima se determinó calculando la cantidad de manosa liberada por segundo y por miligramo de enzima usada. La manosa se determinó con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de azúcares reductores (8). La curva de calibración de manosa se construyó usando ocho diluciones (factor de dilución dos) de una solución pura de manosa (100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Sigma, St. Louis, EUA) en un rango de concentración desde 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta 0,318 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La determinación de manosa se realizó mezclando 100 μL de muestra y 100 μL de reactivo DNS, durante 5 min en baño María en ebullición. Después se agregó 1 mL de agua destilada y se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a longitud de onda de 540 nm. Se realizó un análisis de varianza para determinar si hubo diferencias significativas en la producción de manosa dependiendo de la enzima utilizada en la hidrólisis del galactomanano. En caso de encontrar diferencias se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey con una confianza del 95%.

Para verificar los subproductos de la hidrólisis del galactomanano con la mananasa de la broca se adicionaron fracciones de 0,4 μg de *rHhMan* a soluciones de goma de algarroba (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) en búfer citrato de sodio 0,1 M (pH 5,5). Las reacciones se incubaron a 30 ° C durante 24 h. Alícuotas de la reacción se recogieron a 0, 15 y 30 min, así como

a las 6, 12 y 24 h y se calentaron a 100°C durante 5 min. Los azúcares se analizaron por la técnica de cromatografía en capa fina, de acuerdo a la metodología previamente descrita (2). Los subproductos se separaron en placas de sílice 60F 254 (Merck, Darmstadt, Alemania) con cloroformo: acetato de etilo: n - propanol: agua (0,2: 1: 1,5: 0,5 v/v) y se revelaron por aspersión de ácido sulfúrico en etanol al 5,0%, seguido de calentamiento a 100°C durante 5 min.

6. Reducción de sedimentos por hidrólisis enzimática del extracto de café:

Por cada enzima se pesaron 5 g de extracto concentrado de café con sedimentos y se adicionaron 150 ppm de cada una de las siguientes enzimas: Rohapex®, CoffeeMax® y Mananasa de la broca (*rHhMan*). La hidrólisis se realizó a baja temperatura (10-15°C), con agitación constante de 180 rpm y durante 2 h, para lo cual después de transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 3,3 g y se disolvió hasta un volumen total de 15 mL en agua, se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 min y se determinó el porcentaje de sedimentos y de reducción de sedimentos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción de sedimentos} = \frac{\%SB - \%SM}{\%SB} * 100$$

%SB = Porcentaje de sedimentos del blanco

%SM = Porcentaje de sedimentos de la muestra

7. Prueba de taza del extracto sin sedimentos:

Extractos concentrados de café se incubaron durante 4 h en agitación constante, con una solución con 75 ppm de mananasa de la broca del café (*rHhMan*). Luego, los extractos sin sedimentos se evaluaron en pruebas de taza por un panel de catación del área de Calidad de la Fábrica de Café Liofilizado-Buencafé. El panel estuvo constituido por tres catadores

que calificaron de uno a diez las características sensoriales de aroma, cuerpo, acidez, amargo, dulce, carácter a café e impresión global del extracto con enzima y se comparó con las calificaciones de un gráfico descriptivo no paramétrico “tipo radar” de un extracto de café estándar de la Fábrica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Producción y actividad enzimática de la mananasa de la broca:

En todas las fermentaciones con *Pichia pastoris* se observó un incremento diario de la densidad óptica del cultivo, lo que se reflejó en un incremento de la biomasa. La producción de proteína total fue aproximadamente el doble en los cultivos con la cepa recombinante, en comparación con los cultivos de la cepa control, posiblemente debido a la producción de la mananasa, proveniente de la cepa recombinante. En las fermentaciones con la cepa control no se detectó la producción de mananasa. La producción de mananasa recombinante en la fermentación con los tres medios de cultivo fue similar, siendo 10 mg.L⁻¹ la más alta, obtenida en el medio BMMY (Tabla 2).

El análisis por SDS-PAGE demostró que de cada una de las tres fracciones concentradas se obtuvo una proteína homogénea, con un peso molecular aproximado de 35,5 kDa, correspondiente a 33 kDa de la secuencia de proteínas, sin la secuencia de señalización nativa, y 2,5 kDa de una etiqueta de polihistidina N-terminal (Figura 1a); el cual coincide con el peso molecular previamente calculado para la mananasa recombinante de la broca (1, 8).

La funcionalidad de la mananasa producida se evaluó cualitativamente por la capacidad de formar los productos esperados, cuando se puso a reaccionar con galactomanano,

Tabla 2. Crecimiento y producción de proteína de las fermentaciones hechas con *P. pastoris* en diferentes medios de cultivo. Las lecturas de densidad óptica (DO₆₀₀) fueron registradas a las 3, 6, 9, 12 y 24 h de incubación y corresponden al aumento de biomasa.

Medio de cultivo	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> usada en la fermentación	DO ₆₀₀					Proteína Total (µg.mL ⁻¹)	Endo-mananasa (µg.mL ⁻¹)
		3 h	6 h	9 h	12 h	24 h		
BSM	Recombinante	1,33	2	2,57	2,72	2,56	215	94
	Control	1,35	1,88	2,6	2,57	2,53	121	0
BSM+ Peptona	Recombinante	1,19	2,42	2,5	2,88	2,95	239	95
	Control	1,26	2,73	2,75	2,93	2,96	143	0
BMMY	Recombinante	2,5	2,83	2,89	2,91	2,85	247	101
	Control	2,7	2,79	3,04	3,05	3,14	146	0

de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. En la Figura 1b se muestra la separación cromatográfica en capa fina de los manano-oligosacaridos producidos después del tratamiento enzimático del galactomanano puro del café con la mananasa de la broca. Se observó que durante el transcurso de la reacción se incrementó la concentración de cada uno de los manano-oligosacaridos, siendo la manobiosa la fracción más representativa (Figura 1b). Se comprobó que la enzima recombinante producida en las fermentaciones con la cepa de *P. pastoris* es funcionalmente activa para hidrolizar el galactomanano del café, lo que permitió usarla en los experimentos con extractos concentrados de café.

2. Hidrólisis enzimática de galactomananos con enzimas comerciales y la enzima recombinante (*rHhMan*):

La mananasa de la broca mostró una actividad enzimática dos veces mayor (4,0) que las actividades de las enzimas CoffeMax® (1,5) y Rohalasa® (1,0), y casi el doble que la de la enzima Rohapec® (2,5). De acuerdo con el análisis de varianza hubo diferencias estadísticas en la producción de manosa de acuerdo a la enzima utilizada (F(3,8)=30,83, p=0,0001). La prueba de Tukey reveló que la producción de manosa con la enzima de

la broca fue estadísticamente mayor que la producción con la enzima CoffeMaX (-2,46 ± 0,32, p=0,000), con la enzima Rohalasa (-2,83±0,32, p=0,000) y con la enzima Rohapec (-1,34±0,32, p=0,014) (Figura 2). La *rHhMan* es una enzima aislada de la broca del café y su eficiencia para hidrolizar el galactomanano del café comparada con las otras enzimas comerciales, estaría favorecida por su grado de pureza y por la co-evolución de la broca con la semilla del café por miles de años (1).

En la prueba de reducción de sedimentos a partir de una muestra de extracto concentrado de café, el tratamiento con la mananasa redujo el contenido de sedimentos en un 94,67%. Los tratamientos con la enzima 1 (Rohapec®) y la enzima 2 (CoffeMax®) redujeron los sedimentos del extracto en 66,7% y 33,3%, respectivamente. La mananasa de la broca presenta a concentraciones equivalentes en cantidad de proteína, una reducción de sedimentos superior a los preparados enzimáticos comerciales (Figura 3a).

3. Análisis de prueba de taza:

En la Figura 4 se muestran los resultados del análisis sensorial de extractos concentrados de café a los cuales se les hizo un tratamiento

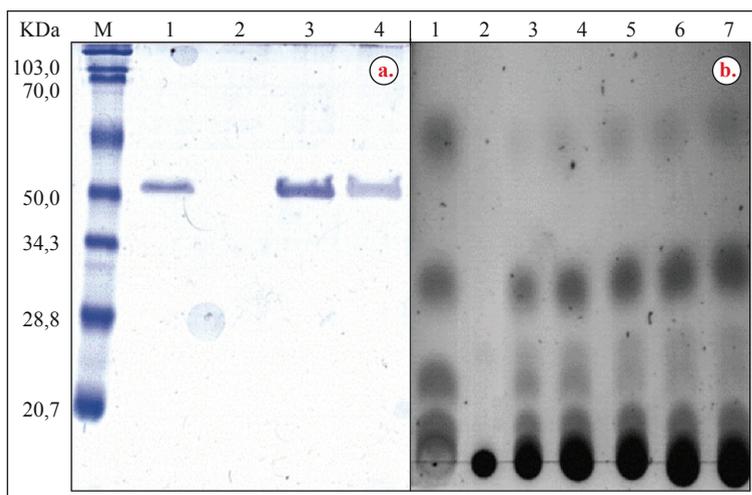


Figura 1. a. Separación electroforética de la mananasa purificada a partir de los sobrenadantes de las fermentaciones hechas con la cepa recombinante de *Pichia pastoris* en tres medios de cultivo. Marcador de peso molecular (M); Medio BSM (carril 1), Medio BMMY (carril 3), Medio BSM+ peptona (carril 4) y cepa sin transformar (carril 2); **b.** Separación cromatográfica en capa fina de los subproductos formados durante la reacción enzimática del galactomanano del café con la enzima recombinante de la broca (*rHhMan*). En el carril 1 mezcla estándar de mano-oligosacaridos (manosa, manobiosa, manotriosa, manotetraosa y manopentosa); en los carriles 2-7 se indican los tiempos de incubación: 0, 15, 30 min, 6, 12 y 24 h, respectivamente.

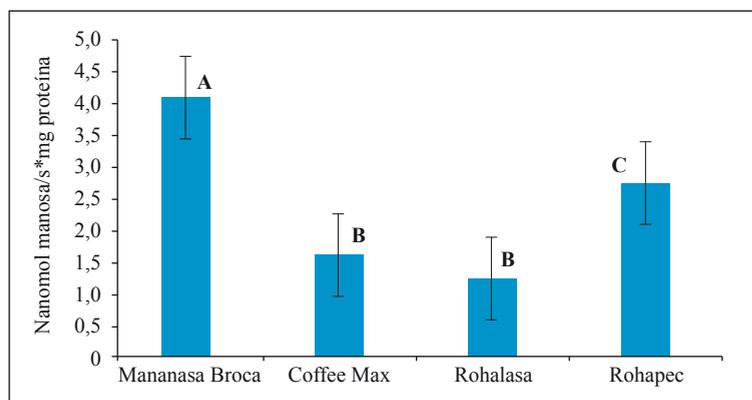


Figura 2. Actividad enzimática de enzimas comerciales y la mananasa de la broca. La mezcla de reacción contenía 16 mg de galactomanano puro diluido en búfer acetato de sodio (pH=6,0) y 6 µg de proteína de Rohapect B1L®, Rohalasa® GMP, CoffeeMax® y mananasa de la broca. Las muestras se incubaron a 50°C durante 30 min. Cada reacción se hizo por triplicado y la actividad enzimática se determinó calculando la cantidad de manosa liberada por segundo y por miligramo de enzima usada. Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente según prueba de Tukey (nivel 5%).

de remoción de sedimentos con mananasa de la broca comparado con el de extractos concentrados de café sin algún tratamiento. Se observó que la adición de la endo-mananasa sobre el extracto de café no afectó sus propiedades organolépticas por lo que es factible su aplicación industrial en empresas

que produzcan extractos concentrados de café y donde el porcentaje de sedimentos deterioren la calidad del producto; sin embargo, se observó una leve desmejora en el carácter a café, la cual se explica por la necesidad de pasteurizar el extracto para inactivar la enzima.

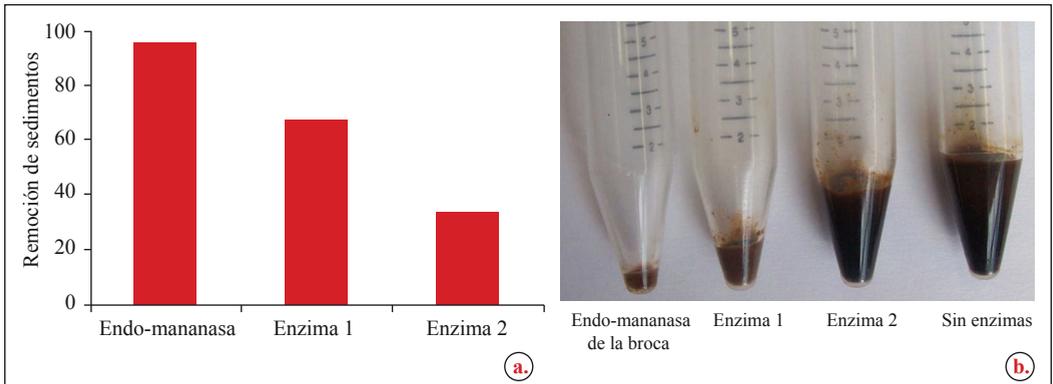


Figura 3. Reducción enzimática de sedimentos en un extracto concentrado de café. **a.** Porcentaje de remoción de sedimentos usando tres enzimas diferentes: Mananasa de la broca, Rohapec® (Enzima 1) y CoffeMax® (Enzima 2), los datos corresponden a la evaluación hecha de una sola muestra por cada enzima; **b.** Se observa la cantidad de sedimentos remanentes en el extracto concentrado después del tratamiento enzimático y se compara con los sedimentos de un extracto sin tratamiento enzimático.

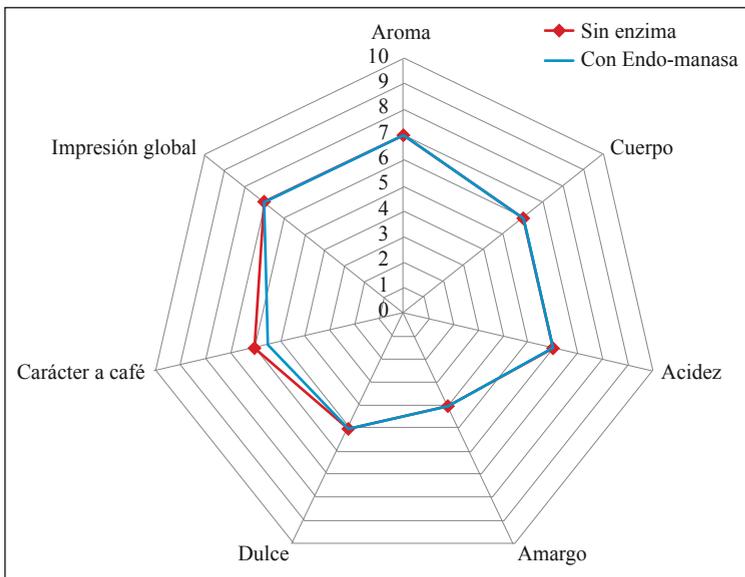


Figura 4. Comparación del análisis sensorial de extractos concentrados de café tratados con mananasa de la broca y sin tratamiento. Las calificaciones se compararon contra un gráfico descriptivo no paramétrico "tipo radar" de un extracto de café estándar.

En conclusión, la mananasa clonada a partir de la broca del café hidroliza más eficientemente los sedimentos presentes en extractos concentrados de café en comparación con otras enzimas comerciales utilizadas para este fin, sin afectar significativamente las características sensoriales del extracto. En caso de ser necesario, la mananasa podría ser inmovilizada a un sustrato inerte y el extracto podría recircularse cuantas veces sea requerido para eliminar los sedimentos de manano y así evitar que la enzima quede integrada al extracto. La técnica de inmovilización enzimática ha sido evaluada con mananos extraídos del café e hidrolizados con mananasas purificadas a partir del hongo *Sclerotium rolfsii* (10). La enzima también podría ser utilizada en el aprovechamiento de la borra, un subproducto del proceso del café tostado y molido, donde podrían obtenerse enzimáticamente Manano-OligosacáridoS (MOS), que son compuestos utilizados como prebióticos para el consumo humano (9). La producción de mananasa de la broca podría llevarse a escala industrial e incluirla en el portafolio comercial de enzimas con aplicaciones en el proceso de fabricación de café soluble. Este trabajo abre nuevos campos de investigación porque en el tracto digestivo de la broca existen otras enzimas capaces de hidrolizar eficientemente carbohidratos de la semilla del café y que podrían ser identificadas y caracterizadas con fines biotecnológicos.

LITERATURA CITADA

1. ACUÑA Z., J.R.; PADILLA, B.E.; FLOREZ R., C.P.; RUBIO, J.D.; HERRERA P., J.C.; BENAVIDES M., P.; LEE, S.J.; YEATS, T.H.; EGAN, A.N.; DOYLE, J.J. Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. *Proceedings of the national academy of sciences* 109(11):4197-4202. 2012.
2. AGUILERA G., C.; VÁSQUEZ O., J.J.; GUTIÉRREZ S., P.; ACUÑA Z., J.R. Cloning and biochemical characterization of an endo-1, 4-β-mannanase from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *BMC research notes* 6:1–8. 2013.
3. BRADBURY, A.G.W.; HALLIDAY, D.J. Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *Journal of agricultural food chemistry* 38(2):389-392. 1990.
4. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1/2):248-254. 1976.
5. CERQUEIRA, M.A.; PINHEIRO, A.C.; SOUZA, B.W.S.; LIMA, Á.M.P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A.; COIMBRA, M.A.; GONÇALVES, M.P. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate polymers* 75(3):408-414. 2009.
6. DELGADO, P.A.; VIGNOLI, J.A.; SHIKA A., M.; FRANCO, T.T. Sediments in coffee extracts: Composition and control by enzymatic hydrolysis. *Food chemistry* 110(1):168-176. 2008.
7. LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 1970.
8. PADILLA H., B.; FLOREZ R., C.P.; AGUILERA G., C.; MEDINA O., J.; RAMÍREZ S., A.; RUBIO G., J.; ACUNA Z., J.R. Cloning and expression of an endo-1,4-beta-xylanase from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *BMC research notes* 5(1):23. 2012.
9. SALINARDI, T.C.; RUBIN, K.H.; BLACK, R.M.; ST-ONGE, M.P. Coffee manno-oligosaccharides, consumed as part of a free living, weight maintaining diet, increase the proportional reduction in body volume in overweight men. *The journal of nutrition* 140(11):1943-1948. 2010.
10. SACHSLEHNER, A.; FOIDL, G.; FOIDL, N.; GÜBITZ, G.; HALTRICH, D. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of biotechnology* 80(2):127-134. 2000.