

9-



Organización y
Digitalización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

BT



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-62870

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: BETA-MANANASA DE LA BROCA DEL CAFÉ, HYPOTHENEMUS
HAMPEI, Y USOS DE LA MISMA

SOLICITANTE: FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA y
CORNELL RESEARCH FOUNDATION INC.

DIRECCIÓN: Calle 73 No.8-13, Bogotá, y Cornell Business & Technology
Park Suite 105, 20 Thornwood Drive, Ithaca, NY14850, USA

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 17 de Junio de 2009



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062870- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:16:05 Dep. 2020 NUECREACION

**PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000117

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: FEDERACION NACIONAL DE
CAFETEROS DE COLOMBIA y CORNELL
RESEARCH FOUNDATION INC.

Dirección: Calle 73 No. 8-13, Bogotá; y
Cornell Business & Technology Park Suite 105,
20 Thornwood Drive, Ithaca, NY14850, USA

Nacionalidad o Domicilio: Colombiana y EUA

Lugar de Constitución: Colombia y EUA

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta

TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: RICARDO ACUÑA ZORNOSA y JOCELYN ROSE

Dirección: Plan Alto, Chinchina, Caldas, Colombia y 34 Autumn Ridge
Circle, Ithaca, New York, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Colombiana, Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/004288

Fecha Noviembre 21, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/062317

Fecha Mayo 29, 2008

6

Título (54) BETA-MANANASA DE LA BROCA DEL CAFÉ, HYPOTHENEMUS
HAMPEI, Y USOS DE LA MISMA

Clasificación Internacional (51) C07K 14/435

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Noviembre 21, 2006

(31) Número de
Solicitud

60/866.705

9

Comprobante de pago No. 09- 44.590

Fecha Junio 16 de 2009



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-128.272



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

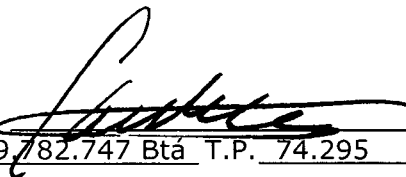


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

B

Fecha: 2009-06-17 17:16:05 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062870- -00000-0000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 44,590
FECHA : JUNIO 16 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105800155	16/06/2009	6,975,000.00

***** CONCEPTO *****

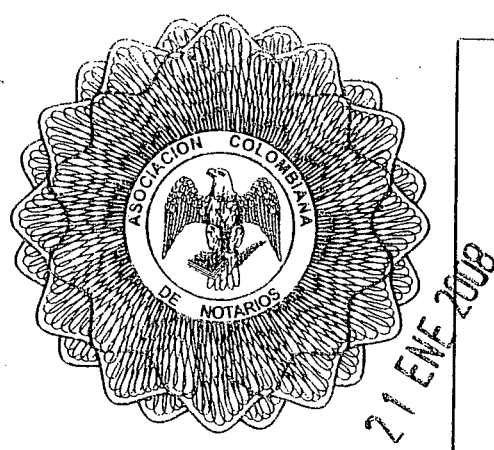
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
TOTAL :			\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

WK 6301800



ESCRITURA PUBLICA NUMERO = = = = =
CERO CUARENTA (040) = = = = =

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Veintiuno = = = = (21) días del mes de
Enero = = = = del año dos mil ocho
(2008), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE

URUETA = = = = = NOTARIA VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, = = se otorgó la escritura pública que
se consigna en los siguientes términos: -----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL PARA
REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS VARIOS DE PROPIEDAD
INTELECTUAL. -----

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA
NIT: 860007538-2 -----

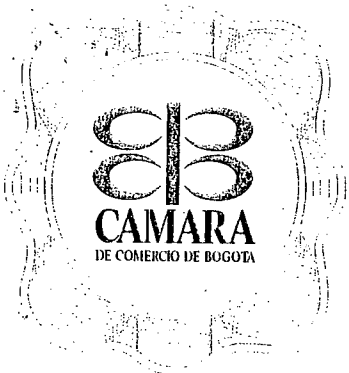
A: CARLOS OLARTE, J. IAN RAISBECK y/o JUAN
GUILLERMO MOURE. -----

C O M P A R E C I Ó: LUIS GENARO MUÑOZ ORTEGA
mayor de edad, vecino y domiciliado en Colombia,
identificado con cédula de ciudadanía N° 10.536.679, obrando
en nombre y representación de la FEDERACIÓN NACIONAL
DE CAFETEROS DE COLOMBIA, persona jurídica de derecho
privado, sin ánimo de lucro, con domicilio en la ciudad de
Bogotá D.C., con personería jurídica reconocida por el
Gobierno Nacional de la República de Colombia mediante
resolución ejecutiva número 33 del 2 de septiembre de 1927,
publicada en el Diario Oficial No. 20.894 de 1928, (en
adelante la "PODERDANTE"), debidamente facultado por mi
calidad de representante legal de la entidad (Primer Gerente
Auxiliar-Gerente Administrativo) manifiesto lo siguiente:

NOTARIA VEINTISIETE
MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

PRIMERO.- Que mediante el presente instrumento público, confiere PODER ESPECIAL, pero amplio y suficiente a CARLOS OLARTE, mayor de edad, vecino y domiciliado en Bogotá D.C., identificado con la cédula de ciudadanía No. 79.782.747 de Bogotá y con Tarjeta Profesional número 74.295, J. IAN RAISBECK, mayor de edad, vecino y domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía No. 79'376.996 de Bogotá y con Tarjeta Profesional número 135.799 y/o JUAN GUILLERMO MOURE, mayor de edad, vecino y domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía No. 80'412.281 de Usaquén y con Tarjeta Profesional número 67.343, para que a nombre de la PODERDANTE, presenten, tramiten, obtengan, defiendan y hagan respetar todo derecho o título de propiedad intelectual de la PODERDANTE, tal como Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la PODERDANTE en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la PODERDANTE, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la PODERDANTE judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por

5



01



* 6 6 3 2 6 6 8 5 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 1 DE 6

* * * * *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL DE LA ENTIDAD SIN ANIMO DE LUCRO: FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. NUMERO: S0002579

N.I.T. : 860007538-2

EL SUSCRITO SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA, EN EJERCICIO DE LA FACULTAD CONFERIDA POR LOS ARTICULOS 43 Y 144 DEL DECRETO NUMERO 2150 DE 1995.

CERTIFICA :

DOMICILIO: BOGOTA D.C.

DIRECCION: CLL. 73 NO. 8-13

TELEFONO: 3456600 FAX: 2171021

CERTIFICA :

QUE POR CERTIFICACION DEL 28 DE FEBRERO DE 1997 , OTORGADO(A) EN MINISTERIO DE AGRICULTURA , INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE MARZO DE 1997 BAJO EL NUMERO: 00002809 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, FUE INSCRITA LA ENTIDAD DENOMINADA: FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA

CERTIFICA :

QUE DICHA ENTIDAD OBTUVO SU PERSONARIA JURIDICA NO. 0033 EL 02 DE SEPTIEMBRE DE 1927.

CERTIFICA :

ENTIDAD QUE EJERCE LA FUNCION DE INSPECCION, VIGILANCIA Y CONTROL: MINISTERIO DE AGRICULTURA

CERTIFICA :

QUE DICHA ENTIDAD HA SIDO REFORMADA POR LOS SIGUIENTES DOCUMENTOS:

NUMERO	FECHA	ORIGEN	INSCRIP	FECHA
	1998/12/03	CONGRESO		
0000003	2000/12/13	CONGRESO	00023670	1999/06/21
0000001	2003/12/10	CONGRESO NACIONAL	00040882	2001/06/04
			00069444	2004/03/16

CERTIFICA :

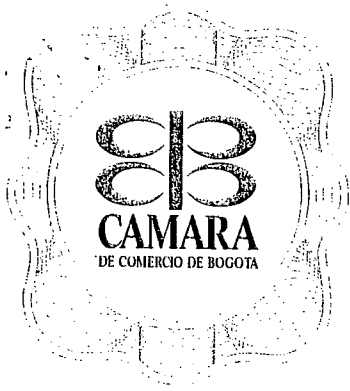
VIGENCIA: QUE LA ENTIDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 1 DE DICIEMBRE DE 2094 .

CERTIFICA :

OBJETO: TIENE POR OBJETO ORIENTAR, ORGANIZAR, FOMENTAR Y REGULAR LA CAFICULTURA COLOMBIANA PROCURANDO EL BIENESTAR DEL CAFICULTOR A TRAVES DE MECANISMOS DE COLABORACION, PARTICIPACION Y FOMENTO DE CARACTER ECONOMICO, CIENTIFICO, TECNOLOGICO, INDUSTRIAL Y COMERCIAL, BUSCANDO MANTENER EL CARACTER DE CAPITAL SOCIAL ESTRATEGICO DE LA CAFICULTURA COLOMBIANA. LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA ES UNA ENTIDAD DEMOCRATICA, PARTICIPATIVA, PLURALISTA, FEDERADA Y DELIBERANTE, QUE TIENE COMO MISION PROMOVER PRIMERO Y PRIORITARIAMENTE LA PROSPERIDAD Y EL INTERES GENERAL DE LOS PRODUCTORES. SON FUNCIONES DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA : A) DEFENDER LOS DERECHOS DE LOS CAFICULTORES. B) PROCURAR QUE LAS POLITICAS MACROECONOMICAS Y SECTORIALES DEL ESTADO BENEFICIEN AL CAFICULTOR. C) TRABAJAR PARA QUE LOS CAFICULTORES ALCANCEN

NOTARIA VENTISIEETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

NIVELES DE COMPETITIVIDAD QUE LES PERMITA MANTENER UN ADECUADO NIVEL DE VIDA Y CONTINUAR SIENDO EL CAPITAL SOCIAL ESTRATEGICO DEL CAMPO COLOMBIANO. D) CELEBRAR CONVENIOS O CONTRATOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, DEPARTAMENTAL O MUNICIPAL Y CON OTRAS ENTIDADES DE CARACTER PUBLICO Y PRIVADO, PARA LA GESTION, ADMINISTRACION Y MANEJO DE PROGRAMAS DE INVERSION E IMPUESTOS, NORMAS, CONTROLES, PRESTACION DE SERVICIOS, PROPAGANDA Y, EN GENERAL, SOBRE TODO LO QUE TIENDA A BENEFICIAR AL CAFICULTOR. E) CELEBRAR PACTOS O CONVENIOS CON ORGANIZACIONES SIMILARES DE OTROS PAISES PRODUCTORES, CON INSTITUCIONES INTERNACIONALES, CON ORGANIZACIONES NO GUBERNAMENTALES Y CON EMPRESAS PRIVADAS PARA LA DEFENSA DE LOS INGRESOS DE LOS CAFICULTORES Y EL FOMENTO DEL CONSUMO, DEL CULTIVO, PROPAGANDA, CUOTAS DE EXPORTACION, PRECIOS, TRANSPORTE, BANCA, IMPUESTOS Y COMERCIO CAFETERO. F) ENTREGAR FONDOS EN FIDEICOMISO, O BAJO CUALQUIER MODALIDAD, A ENTIDADES NACIONALES O DEL EXTERIOR, PARA FINANCIAR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON EL CAFICULTOR Y LA INDUSTRIA CAFETERA EN GENERAL. G) CON ARREGLO A LOS REGLAMENTOS ESPECIFICOS ADOPTADOS POR LOS ORGANOS COMPETENTES, PRESTAR ASISTENCIA A LOS CAFICULTORES, CON EL FIN DE MEJORAR SU NIVEL DE INGRESOS. H) DIVULGAR ENTRE LOS CAFICULTORES LOS AVANCES TECNICOS Y LA INFORMACION CORRESPONDIENTE SOBRE EL CULTIVO, BENEFICIO Y COMERCIO DEL CAFE Y MANTENERLOS ACTUALIZADOS EN RELACION CON EL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES ECONOMICAS, SOCIALES Y PRODUCTIVAS QUE INCIDEN SOBRE LA ACTIVIDAD. I) APOYAR AL CAFICULTOR MEDIANTE LA ADQUISICION, VENTA, PRESTAMO, ALQUILER O DISTRIBUCION DE LOS ELEMENTOS NECESARIOS O UTILES PARA LA CAFICULTURA. J) ORGANIZAR, ADMINISTRAR O PROMOVER OBRAS DE UTILIDAD COMUN, EN CUANTO FAVOREZCAN LA CAFICULTURA DEL PAIS. K) ORGANIZAR, ADMINISTRAR O PROMOVER, CON SUS RECURSOS O CON EL CONCURSO DE ORGANIZACIONES CAFETERAS O ENTIDADES OFICIALES O PARTICULARES DE COLOMBIA O DE OTROS PAISES, ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO DEDICADOS A LA VENTA, DISTRIBUCION Y DIVULGACION DEL CONSUMO DE CAFE, ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE, BODEGAS, PLANTAS DE PROCESAMIENTO DE CAFE Y EMPRESAS DE COMERCIALIZACION, ALMACENES DE PROVISION AGRICOLA, SOCIEDADES COOPERATIVAS, ENTIDADES SOLIDARIAS O ASOCIATIVAS DE AHORRO Y CREDITO, ESQUEMAS DE COBERTURA Y CONTROL DE RIESGO, TOSTADORAS Y TRILLADORAS DE CAFE, CENTRALES DE BENEFICIO, QUE TENGAN POR OBJETO MEJORAR EL INGRESO DEL CAFICULTOR, DISMINUIR LOS COSTOS DE PRODUCCION, HACER MAS EFICIENTE SU COMERCIALIZACION Y MEJORAR LAS CALIDADES DEL CAFE; L) CREAR OFICINAS DE PROPAGANDA, VENTA, COMISION DEPOSITO DE CAFE, EN EL INTERIOR Y EN EL EXTERIOR Y ORGANIZAR, ADMINISTRAR O PARTICIPAR EN BOLSAS CAFETERAS. M .) ORGANIZAR Y SOSTENER UNA ACTIVA Y ADECUADA PROPAGANDA DE CAFE COLOMBIANO EN EL INTERIOR Y EN EL EXTERIOR, BUSCANDO GENERAR MAYOR RECONOCIMIENTO Y VALOR AGREGADO AL PRODUCTOR Y PROMOVER EL AUMENTO DEL CONSUMO. N) COMPRAR CAFE, PROCESARLO Y VENDERLO EN EL MERCADO INTERIOR Y DEL EXTERIOR, O RETENERLO EN EL PAIS. O) REALIZAR UN SEGUIMIENTO DE LA INDUSTRIA CAFETERA MUNDIAL, Y SUS AGENTES, LOS PAISES PRODUCTORES, LOS PAISES CONSUMIDORES, Y, EN GENERAL, DE TODOS AQUELLOS ASPECTOS NACIONALES O INTERNACIONALES QUE SEAN RELEVANTES PARA EL DESARROLLO DE LA INDUSTRIA CAFETERA COLOMBIANA. P) LLEVAR UNA COMPLETA ESTADISTICA DE LA ACTIVIDAD CAFETERA Y MANTENER PERMANENTEMENTE INFORMADO AL GREMIO, EN SUS DIVERSAS INSTANCIAS, SOBRE LO CONCERNIENTE A PRECIOS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS, EXISTENCIAS O VENTAS EN LOS MAS IMPORTANTES



01



* 6 6 3 2 6 6 8 6 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 2 DE 6

* * * * *

CENTROS DE DISTRIBUCION O CONSUMO MUNDIAL Y SOBRE LOS PRONOSTICOS RELATIVOS A LA PRODUCCION DE CAFE, Y, EN GENERAL, A TODO LO QUE PUEDA CONVENIR PARA LA BUENA ORGANIZACION DE LA INDUSTRIA CAFETERA. IGUALMENTE CORRESPONDE A LA FEDERACION, EN EL PAIS, LA ESTADISTICA DE PRODUCTORES, DE PREDIOS CAFETEROS, DE PRODUCCION Y COSTOS, DE PRODUCTIVIDAD, Y, EN GENERAL, DE TODAS LAS ACTIVIDADES CAFETERAS QUE PUEDAN SERVIR PARA LA MEJOR ORIENTACION DE LA INDUSTRIA EN COLOMBIA, ASI COMO LOS INDICADORES SOCIALES DE LA ACTIVIDAD CAFETERA. Q) PROMOVER Y EJECUTAR PROGRAMAS DE DESARROLLO ECONOMICO Y DE COMPLEMENTACION DEL INGRESO DEL CAFICULTOR. R) APOYAR LA INVESTIGACION Y LA TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA, PARA EL CULTIVO, EL PROCESAMIENTO Y LA COMERCIALIZACION DEL CAFE PROCURANDO, EN TODO CASO, LA PRESERVACION DEL MEDIO AMBIENTE Y LA CONSERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES. S) FOMENTAR, APOYAR E INTENSIFICAR EL ESTABLECIMIENTO DE INDUSTRIAS COMPLEMENTARIAS O QUE TIENDAN A INCREMENTAR EL INGRESO DE LOS CAFICULTORES. T) CONTRATAR EMPRESTITOS O PRESTAMOS CON ENTIDADES NACIONALES O EXTRANJERAS, TENIENDO EN CUENTA LAS DISPOSICIONES DE LOS ESTATUTOS Y DE LOS CONTRATOS CELEBRADOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, SI FUERE EL CASO, Y CONSTITUIR LAS GARANTIAS PERTINENTES. U) CON RECURSOS PROPIOS U OBTENIDOS DE ENTIDADES OFICIALES, SEMIOFICIALES O PARTICULARES, PROCURAR LA DOTACION DE LA INFRAESTRUCTURA FISICA Y SOCIAL INDISPENSABLE PARA LOGRAR EL DESARROLLO SOCIAL Y ECONOMICO DE LOS HABITANTES DE LA ZONA DE INFLUENCIA CAFETERA. V) PROCURAR POR LOS MEDIOS QUE SE CONSIDEREN MAS ADECUADOS EL ESTABLECIMIENTO DE UNA POLITICA INTEGRAL DE PROTECCION SOCIAL A LOS CAFICULTORES. W) ORGANIZAR FUNDACIONES O ASOCIACIONES SIN ANIMO DE LUCRO, PARA ATENDER LA PRESTACION DE SERVICIOS A SUS FEDERADOS, TALES COMO LA EDUCACION Y LA SALUD. X) REALIZAR INVERSIONES PERMANENTES CON SUS RECURSOS SOLO EN ACTIVOS QUE PERTENEZCAN A LA INDUSTRIA CAFETERA Y EFECTUAR INVERSIONES TEMPORALES, PARA OBTENER BENEFICIOS Y RENDIMIENTOS QUE GARANTICEN LA SOLIDEZ PATRIMONIAL DE LA FEDERACION Y LE PERMITAN ATENDER OPORTUNA Y ADECUADAMENTE SUS PROGRAMAS A FAVOR DE SUS ASOCIADOS Y DE BIENESTAR PARA SUS SERVIDORES. Y) REALIZAR TODA CLASE DE ACTOS O NEGOCIOS JURIDICOS. PODRAN EN CONSECUENCIA, ADQUIRIR Y ENAJENAR TODA CLASE DE BIENES, EN CUANTO LA ADQUISICION O ENAJENACION CORRESPONDAN AL OBJETO.

CERTIFICA :

PATRIMONIO : \$ 1,314,923.00

CERTIFICA :

** ORGANO DIRECTIVO **

NOMBRE

IDENTIFICACION

MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO

RESTREPO SALAZAR JUAN CAMILO

C.C. 00017157059

MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO

GOMEZ ESTRADA MARIO

C.C. 00010211732

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urueña

MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CAMPOS ARANA CESAR ELADIO	C.C. 00005881550
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO RAMIREZ MONTOYA CARLOS ROBERTO	C.C. 00092937864
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO ECHEVERRY CASTAÑO CESAR AUGUSTO	C.C. 00009956514
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO GOMEZ BUENDIA CARLOS ALBERTO	C.C. 00017057077
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO AZÜERO RAMIREZ CARLOS FLORESMIRO	C.C. 00012090307
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CASTRILLON M FERNANDO	C.C. 00010518013
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CALA ROBAYO JORGE	C.C. 00000160838
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CAMPO GONZALEZ RAMON ALBERTO	C.C. 00012558183
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CAMPO SOTO RODOLFO JOSE	C.C. 00005131927
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO ROMAN CALDERON HERNAN MIGUEL	C.C. 00017197691
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO YAÑEZ CARVAJAL ALFREDO	C.C. 00013223632
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO GARCIA PARRA JAIME	C.C. 00000001394
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO BOHORQUEZ BOHORQUEZ JAVIER	C.C. 00017066695

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL: LA REPRESENTACION LEGAL DE LA FEDERACION PARA ASUNTOS JUDICIALES, EXTRAJUDICIALES Y ADMINISTRATIVOS DE CARACTER LABORAL INDIVIDUAL O COLECTIVO, LA TENDRA EL DIRECTOR DE RELACIONES INDUSTRIALES Y EN SU DEFECTO A QUIEN PARA ESOS PROPOSITOS DESIGNE EL GERENTE GENERAL. LA DESIGNACION DE DOS REPRESENTANTES LEGALES SUPLENTES, QUIENES TENDRAN LA DISTINCION DE PRIMER GERENTE AUXILIAR Y SEGUNDO GERENTE AUXILIAR, Y DEL SECRETARIO GENERAL ESTARA A CARGO DEL GERENTE GENERAL, PREVIA CONSULTA CON EL COMITE DIRECTIVO. EN CASO DE AUSENCIAS TEMPORALES, EL GERENTE GENERAL ENCARGARA A UNO DE SUS SUPLENTES. CUANDO SE TRATE DE AUSENCIAS PERMANENTES O GENERADAS POR UN IMPEDIMENTO DEL GERENTE GENERAL, SERA EL COMITE DIRECTIVO QUIEN ENCARGUE A UNO DE LOS DOS REPRESENTANTES LEGALES SUPLENTES, MIENTRAS SE DESIGNA UN NUEVO TITULAR EN PROPIEDAD.

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL

PRINCIPAL(ES) : - GERENTE GENERAL
SILVA LUJAN GABRIEL
C.C. 00079142102

SUPLENTE(ES) : - PRIMER GERENTE AUXILIAR
MUÑOZ ORTEGA LUIS GENARO
C.C. 00010536679

- SEGUNDO GERENTE AUXILIAR
DURAN CATALINA CRANE DE
C.C. 00035460200

- DIRECTOR DE RELACIONES INDUSTRIALES
MUÑOZ ORTEGA LUIS GENARO
C.C. 00010536679

CERTIFICA :

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: - A) ORGANIZAR Y EJECUTAR LAS



01



* 6 6 3 2 6 6 8 7 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 3 DE 6

* * * * *

POLITICAS Y LOS PROGRAMAS DE LA FEDERACION, DE ACUERDO CON LOS ESTATUTOS, LOS CONTRATOS CELEBRADOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, LOS ACUERDOS Y RESOLUCIONES DE LOS CONGRESOS NACIONALES DE CAFETEROS Y LAS ORDENES E INSTRUCCIONES DEL COMITE NACIONAL COMO ORGANISMO ADMINISTRADOR DEL FONDO NACIONAL DEL CAFE Y DEL COMITE DIRECTIVO COMO MAXIMA AUTORIDAD ADMINISTRATIVA DE LA FEDERACION; - B) REPRESENTAR LEGALMENTE A LA FEDERACION Y ACTUAR COMO SU VOCERO ANTE TODAS LAS AUTORIDADES DE LA REPUBLICA O DE CUALQUIER PAIS Y ANTE TERCEROS, CON FACULTAD PARA DELEGAR EN OTROS EMPLEADOS O EN APODERADOS ESPECIALES; EL GERENTE GENERAL O SUS SUPLENTE PODRAN CONFERIR PODERES GENERALES A LOS DIRECTORES EJECUTIVOS DE LOS COMITES DEPARTAMENTALES DE CAFETEROS PARA QUE REPRESENTEN A LA FEDERACION ANTE LAS AUTORIDADES DEL RESPECTIVO DEPARTAMENTO Y ATIENDAN TODO LO RELACIONADO CON LOS EMPLEADOS DE CADA COMITE; C) DIRIGIR LAS RELACIONES DE LA FEDERACION CON LAS ENTIDADES PUBLICAS Y PRIVADAS. - D) ELABORAR DE MANERA QUINQUENAL UN PLAN ESTRATEGICO EN CONCORDANCIA CON EL OBJETO DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS, AL CUAL DEBERAN ADECUARSE LOS PLANES Y PROGRAMAS DE LOS COMITES DEPARTAMENTALES Y MUNICIPALES. DICHO PLAN ESTRATEGICO SERA LLEVADO PARA SU APROBACION AL COMITE DIRECTIVO PARA SU ADOPCION POR EL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS. E) PROVEER LOS CARGOS EN LA OFICINA CENTRAL DE LA FEDERACION, DE ACUERDO CON EL ORGANIGRAMA, LA POLITICA SALARIAL Y LA PLANTA DE CARGOS APROBADOS POR EL COMITE DIRECTIVO. F) CELEBRAR TODA CLASE DE ACTOS, CONTRATOS O NEGOCIOS JURIDICOS, CUYA CUANTIA NO EXCEDA DE MIL QUINIENTOS CINCUENTA SALARIOS MINIMOS MENSUALES LEGALES VIGENTES (1.550 SMLV) EN CONCORDANCIA CON EL LITERAL P) DEL ARTICULO 23. G) MANTENER INFORMADOS A LA DIRIGENCIA GREMIAL Y A LOS CAFICULTORES SOBRE LA SITUACION Y PERSPECTIVAS DEL MERCADO Y COSECHAS DE CAFE, Y ATENDER LAS CONSULTAS QUE LE SEAN FORMULADAS. H) ORDENAR LOS GASTOS DE LA FEDERACION, DENTRO DEL MARCO DEL PLAN ESTRATEGICO, LOS PRESUPUESTOS Y NORMAS RESPECTIVAS. I) ESTUDIAR LAS CIRCUNSTANCIAS QUE CONFRONTE LA CAFICULTURA, Y PRESENTAR AL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS, AL COMITE NACIONAL Y AL COMITE DIRECTIVO, LAS INICIATIVAS QUE ESTIMARE CONVENIENTES PARA SU BUEN MANEJO. J) INFORMAR AL COMITE NACIONAL SOBRE LA SITUACION DEL FONDO NACIONAL DEL CAFE Y AL COMITE DIRECTIVO SOBRE LA PRODUCCION, COMERCIALIZACION, INVESTIGACION, EXTENSION, LA SITUACION FINANCIERA Y DEMAS TEMAS ADMINISTRATIVOS DE LA FEDERACION; K) PRESENTAR PERIODICAMENTE AL COMITE DIRECTIVO LOS ESTADOS FINANCIEROS DE LA FEDERACION; L) PRESENTAR AL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS UN INFORME DETALLADO DE LAS LABORES REALIZADAS POR LA FEDERACION TANTO EN EL PAIS COMO EN EL EXTERIOR A PARTIR DE LA REUNION DEL ULTIMO CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS; SOBRE LA MANERA QUE SE HAYAN CUMPLIDO LAS DECISIONES DE ESTE; SOBRE LOS PROBLEMAS PRINCIPALES, LAS ACTIVIDADES DE LA INDUSTRIA, LAS SOLUCIONES QUE CONVENDRIA ADOPTAR; Y SOBRE LOS DEMAS TEMAS

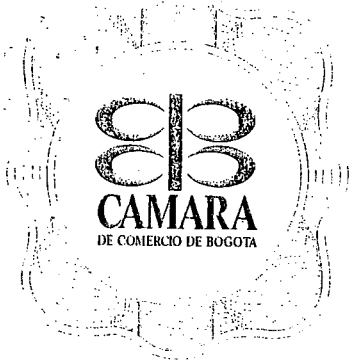
NOTARIA VEINTISIETE

Maria Eugenia Rojas de Uribe

PERTINENTES DE ACUERDO CON LA SITUACION Y PERSPECTIVAS DE LA FEDERACION Y DE LA ECONOMIA CAFETERA; M) ELABORAR EL PROYECTO DE PRESUPUESTO DE LA FEDERACION PARA LA VIGENCIA SIGUIENTE, SOMETERLO A CONSIDERACION DEL COMITE DIRECTIVO Y PRESENTARLO OPORTUNAMENTE AL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS, PARA SU ESTUDIO Y APROBACION. N) MANTENER OPORTUNAMENTE INFORMADOS A LOS COMITES DEPARTAMENTALES SOBRE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES DESARROLLADAS POR EL COMITE NACIONAL, EL COMITE DIRECTIVO, LA GERENCIA GENERAL Y DEMAS DEPENDENCIAS; O) ORIENTAR LA POLITICA SALARIAL APLICABLE A LOS EMPLEADOS ADSCRITOS A LA GERENCIA GENERAL Y DEMAS GERENCIAS, OFICINAS DEL EXTERIOR Y DE LOS DIRECTORES EJECUTIVOS, UNA VEZ APROBADA POR EL COMITE DIRECTIVO. P) COORDINAR LA POLITICA DE INVERSIONES, GASTOS, PROGRAMAS Y ACTIVIDADES DE LOS COMITES DEPARTAMENTALES EN CONSONANCIA CON LOS LINEAMIENTOS ESTABLECIDOS POR EL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS, EL COMITE NACIONAL Y EL COMITE DIRECTIVO. Q) COORDINAR LA ACCION GREMIAL PARA LA EFICAZ DEFENSA DE LOS PRODUCTORES Y DE LA ACTIVIDAD CAFETERA Y LAS DISTINTAS CAMPAÑAS QUE DEBAN EJECUTAR LOS COMITES DEPARTAMENTALES A TRAVES DE SUS DIRECTORES EJECUTIVOS. R) OTORGAR EL VISTO BUENO A LA DESIGNACION DE LOS DIRECTORES EJECUTIVOS QUE REALICEN LOS COMITES DEPARTAMENTALES Y SOLICITAR SU REMOCION CUANDO SE PRESENTEN LAS CIRCUNSTANCIAS PREVISTAS EN EL LITERAL D) DEL ARTICULO 30. EN CASO QUE EL COMITE DEPARTAMENTAL NO PROCEDA A LA REMOCION SOLICITADA POR EL GERENTE GENERAL, SE CONSULTARA AL COMITE DIRECTIVO PARA SU DECISION FINAL. EL GERENTE GENERAL PODRA APLAZAR, INFORMANDO DE MANERA OPORTUNA AL COMITE DIRECTIVO, EL ENVIO DE LOS DINEROS QUE CORRESPONDEN A LOS COMITES DEPARTAMENTALES CUANDO ESTOS NO HAYAN PRESENTADO OPORTUNAMENTE LAS CUENTAS CORRESPONDIENTES, O HABIENDOLAS PRESENTADO NO FUEREN SATISFACTORIAS O HAYAN INCURRIDO EN VIOLACION DE LAS NORMAS ESTATUTARIAS O REGLAMENTARIAS, O DE LAS POLITICAS GENERALES DE LA FEDERACION, CASO EN EL CUAL LA GERENCIA GENERAL PODRA ORDENAR LA INTERVENCION DE DICHO COMITE DEPARTAMENTAL. CORRESPONDE AL COMITE DIRECTIVO AUTORIZAR LA CELEBRACION DE CONTRATOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, CON ENTIDADES TERRITORIALES, CON INSTITUCIONES PUBLICAS Y PRIVADAS, CON ORGANISMOS INTERNACIONALES Y CON ORGANIZACIONES NO GUBERNAMENTALES A NOMBRE DE LA FEDERACION; AUTORIZAR AL GERENTE GENERAL PARA LA CELEBRACION DE ACTOS, CONTRATOS O NEGOCIOS JURIDICOS A NOMBRE DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS, INCLUIDOS PERO NO LIMITADOS A LA ADQUISICION, ENAJENACION, GRAVAMENES O LIMITACIONES DEL DOMINIO DE INMUEBLES, A CUALQUIER TITULO, QUE SE HAGAN POR LA OFICINA CENTRAL O POR LOS COMITES DEPARTAMENTALES, LO MISMO QUE LA PARTICIPACION EN SOCIEDADES, CUYA CUANTIA EXCEDA DE MIL QUINIENTOS CINCUENTA SALARIOS MINIMOS MENSUALES LEGALES VIGENTES (1.550 SMMLV).

CERTIFICA:

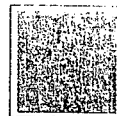
QUE POR RESOLUCION NO. 002 DEL 12 DE MARZO DE 1990, INSCRITA EL 3 DE JUNIO DE 1997, BAJO EL NO. 5857 DEL LIBRO 51, EL GERENTE GENERAL DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA, EN USO DE SUS ATRIBUCIONES, Y CONFORME AL ARTICULO 23 DE LOS ESTATUTOS, FACULTO A CADA UNO DE LOS SEÑORES SUBGERENTE GENERAL, PRIMER GERENTE AUXILIAR Y SEGUNDO GERENTE AUXILIAR, GERENTE ADMINISTRATIVO PARA QUE, ACTUANDO SEPARADAMENTE, REPRESENTEN A LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA, EJERCIENDO SU PERSONERIA, ANTE TERCEROS AUTORIDADES CIVILES, JUDICIALES Y ADMINISTRATIVAS DE LA REPUBLICA O DE CUALQUIER OTRO PAIS .-----



01



* 6 6 3 2 6 6 8 8 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 4 DE 6

* * * * *

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 102 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., DEL 16 DE ENERO DE 2002, INSCRITA EL 23 DE JULIO DE 2002 BAJO EL NO. 52475 DEL LIBRO I, DE LOS LIBROS DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMPARECIO EMILIO ECHEVERRI MEJIA IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 4. 317. 954 DE MANIZALES, EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA SOCIEDAD DE LA REFERENCIA, POR MEDIO DE LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA, OTORGA PODER GENERAL A LUIS GENARO MUÑOZ ORTEGA, IDENTIFICADO CON LAS CEDULA DE CIUDADANIA NO. 10.536.679 DE BOGOTA, PARA QUE EN NOMBRE DE LA ENTIDAD REALICE LOS SIGUIENTES ACTOS: 1. SUSCRIBA LA ESCRITURA PUBLICA MEDIANTE LA CUALES LA FEDERACION ACEPTA LAS HIPOTECAS QUE LOS CITADOS EMPLEADOS DE LA FEDERACION O DE LOS ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE ALMACAFE, CONSTITUYAN EN FAVOR DE LA FEDERACION PARA GARANTIZAR EL PAGO DE LOS PRESTAMOS. 2. SUSCRIBA LAS ESCRITURAS PUBLICAS DE CANCELACION DE LAS HIPOTECAS, QUE COMO GARANTIA DE LOS PRESTAMOS DE VIVIENDA OTORGADOS TANTO A LOS EMPLEADOS DE LA FEDERACION COMO A LOS DE LOS ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE ALMACAFE, HAYAN SIDO CONSTITUIDOS A FAVOR DE LA FEDERACION. 3. CONFIERE PODERES ESPECIALES, CON LOS MISMOS FINES A LOS SEÑORES GERENTES REGIONALES DE LOS ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE ALMACAFE. 4. ASUMA EL MANEJO DE TODAS LAS GESTIONES NOTARIALES PARA EL BUEN EXITO DE LA GESTION QUE SE ENCOMIENDA. SOLICITE Y RETIRE LAS COPIAS DE LAS ESCRITURAS. 5. REPRESENTA A LA FEDERACION EN LA CELEBRACION DE CONTRATOS DE MUTUO, POR CONCEPTO DE PRESTAMOS DE DINERO OTORGADOS POR LA FEDERACION A SUS EMPLEADOS O A LOS DE ALMACAFE EN EL DESARROLLO DEL PROGRAMA DE BIENESTAR SOCIAL, Y ACEPTA Y EN SU MOMENTO CANCELE LOS GRAVAMENES DE PRENDA O SIN TENENCIA O LIMITACIONES DEL DOMINIO SOBRE VEHICULOS AUTOMOTORES, CONSTITUYAN LOS DEUDORES PARA GARANTIZARLE A LA FEDERACION EL PAGO DE LOS CORRESPONDIENTES PRESTAMOS.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 657 DE LA NOTARIA 27 DE BOGOTA D.C., DEL 01 DE JUNIO DE 2004, INSCRITA EL 27 DE OCTUBRE DE 2005 BAJO EL NO. 91131 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMPARECIO LUIS GERARDO MUÑOZ ORTEGA, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 10.536. 679 DE POPAYAN, OBRANDO COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA POR MEDIO DE LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA CONFIERE PODER GENERAL AL DOCTOR GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 19.366. 099 DE BOGOTA, PARA QUE EN NOMBRA Y REPRESENTACION DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA Y REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONCILIAR, COMPAREZCA A LAS AUDIENCIAS DE CONCILIACION, SANEAMIENTO Y DECISION DE EXCEPCIONES PREVIAS Y FIJACION DEL LITIGIO, DE QUE TRATA EL ARTICULO 101 DEL CODIGO DE PROCEDIMIENTO CIVIL, QUE SE LLEVEN A CABO ANTE LAS

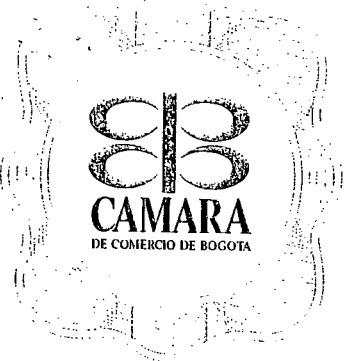
NOTARIA VEINISIETE

María Eugenia Rojas de Urueta

AUTORIDADES JURISDICCIONALES DEL ORDEN CIVIL, EN TODO EL TERRITORIO DE LA REPUBLICA, DENTRO DE LOS PROCESOS CIVILES ORDINARIOS ABREVIADOS Y DE EJECUCION (EJECUTIVO SINGULAR, EJECUTIVO HIPOTECARIO Y EJECUTIVO CON TITULO PRENDARIO), EN LOS CUALES LA FEDERACION SEA PARTE COMO DEMANDANTE O COMO DEMANDADA, E IGUALMENTE PARA QUE COMPAREZCA EN LA MISMA CLASE DE PROCESOS, REVESTIDO DE PLENA FACULTAD PARA CONFESAR, A ABSOLVER LOS INTERROGATORIOS A INSTANCIA DE PARTE QUE DEBA ABSOLVER EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION. PRESENTE EL DOCTOR GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO, DE LAS CONDICIONES CIVILES ANTERIORMENTE ANOTADAS, MANIFIESTA QUE ACEPTA EL PODER GENERAL QUE MEDIANTE LA PRESENTE ESCRITURA SE CONFIERE.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 925 DE LA NOTARIA 27 DE BOGOTA D.C., DEL 08 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 27 DE OCTUBRE DE 2005 BAJO EL NO. 91130 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMPARECIO LUIS GERARDO MUÑOZ ORTEGA, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 10. 536. 679 DE POPAYAN, OBRANDO COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA POR MEDIO DE LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA CONFIERE PODER GENERAL AL DOCTOR GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO, MAVOR VECINO DE ESTA CIUDAD, IDENTIFICADO CON CEDULA DE CIUDADANIA NUMERO 19.366.099 DE BOGOTA Y LIBRETA MILITAR NUMERO 19.366. 099, DISTRITO MILITAR NUMERO TREINTA Y OCHO (38), JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PERSONAL DE LA ENTIDAD, PARA QUE REVESTIDO DE LA PLENITUD DE LAS FACULTADES QUE LOS ESTATUTOS CONFIEREN A QUIEN OTORGA ESTE PODER, REPRESENTA A LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA, POR, UNA PARTE, EN TODA CLASE DE PROCESOS ORDINARIOS, EJECUTIVOS Y DE FUERO SINDICAL QUE SE ADELANTEN ANTE LA JUSTICIA LABORAL EN CUALQUIER PARTE DEL TERRITORIO NACIONAL Y CUALQUIERA QUE SEA LA ; JERARQUIA DEL JUZGADO O TRIBUNAL QUE CONOZCA DE ELLOS, EN LOS CUALES DEBA INTERVENIR A LA FEDERACION COMO DEMANDANTE O COMO DEMANDADA, Y, POR OTRA PARTE, EN AUDIENCIAS DE CONCILIACION PROCESAL EXTRAPROCESAL DE CARACTER LABORAL QUE LA FEDERACION QUIERA LLEVAR A CABO, CON LA INTERVENCION DE CUALQUIER JUEZ LABORAL. IGUALMENTE LE CONFIERE PODER PARA QUE, DENTRO DE LA MISMA ORBITA LABORAL REPRESENTA A LA FEDERACION ANTE EL MINISTERIO DE PROTECCION SOCIAL, EN TODAS LAS DILIGENCIAS DE CARACTER ADMINISTRATIVO LABORAL INDIVIDUAL Y DE FUERO SINDICAL EN AQUELLA DEBA FORMAR PARTE, EN VIRTUD DE TODO LO ANTERIOR, EL DOCTOR ROJAS GIRALDO PODRA RECIBIR TODA CLASE DE NOTIFICACIONES TANTO ADMINISTRATIVAS COMO JUDICIALES, CONCURRIR, CON PLENA FACULTAD PARA CONCILIAR, A AUDIENCIAS DE CONCILIACION TANTO PROCESALES COMO EXTRAPROCESALES, JUDICIALES O ADMINISTRATIVAS ABSOLVER, CON PLENA FACULTAD PARA CONFESAR, INTERROGATORIOS DE PARTE QUE SE LE FORMULEN AL REPRESENTA LEGAL DE LA FEDERACION DENTRO DE PROCESOS ORDINARIOS LABORALES PROCESOS EJECUTIVOS LABORALES Y PROCESOS DE FUERO SINDICAL. TAMBIEN SE LE CONFIERE PODER PARA INSTAURAR Y CONTESTAR LAS ACCIONES DE TUTELA ANTE TODAS LAS JURISDICCIONES EN LAS QUE SEA PARTE O INTERVENGA LA FEDERACION. IGUALMENTE SE LE CONFIERE PODER PARA ADELANSTAR TRAMITES ADMINISTRATIVOS ANTE EL INSTITUTO DE SEGURO SOCIAL ISS, Y DEMAS ENTIDADES DE SEGURIDAD SOCIAL COMO EMPRESAS DE RIESGOS PROFESIONALES, CAJAS DE COMPENSACION FAMILIAR, SENA, INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR Y SUPERINTENDENCIA DE SALUD, TALES COMO RADICAR DOCUMENTOS, RECIBIR NOTIFICACIONES Y DEMAS ACTIVIDADES; . QUE REQUIERAN ACREDITAR LA REPRESENTACION LEGAL DE



01



* 6 6 3 2 6 6 8 9 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 5 DE 6

* * * * *

LA : FEDERACION, ANTE DICHAS ENTIDADES. ASI COMO INTERPONER, RECURSOS Y NOTIFICARSE DE LAS DECISIONES QUE SE ADOPTEN ANTE LAS; JUNTAS REGIONALES DE CALIFICACION DE INVALIDEZ Y LA JUNTAY; NACIONAL DE CALIFICACION DE INVALIDEZ. EL PRESENTE PODER DEJA SIN EFECTOS EL CONFERIDO MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NUMERO SEISCIENTOS CUARENTA Y SIETE (647) DEL CATORCE (14) DE FEBRERO DE DOS MIL DOS (2002) Y EL CONFERIDO MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NUMERO TRES MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE (3227) DEL NUEVE (9) DE JULIO DE DOS MIL TRES (2003), EXPEDIDOS LOS DOS (2) POR LA NOTARIA SEXTA (6A.) DEL CIRCULO DE BOGOTA.

CERTIFICA :

QUE MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NO. 3041 DE LA NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JULIO DE 2001, INSCRITA EL 31 DE JULIO DE 2006 BAJO EL NO. 104760 DEL LIBRO V, COMPARECIO EMILIO ECHEVERRI MEJIA, MAYOR DE EDAD Y ESTA DOMICILIADO EN ESTA CIUDAD, QUIEN SE IDENTIFICA CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 4. 317. 954 DE MANIZALES QUE ACTUANDO EN SU CONDICION DE PRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA CONFIERE PODER GENERAL AL DOCTOR CARLOS EDUARDO UMAÑA LIZARAZO, QUEN ES MAYOR DE EDAD Y DOMICILIADO ES ESTA CIUDAD Y SE IDENTIFICA CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 74. 281. 101 DE GUATEQUE TARJETA PROFESIONAL DE ABOGADO NO.86. 022 DEL CONSEJO SUPERIOR DE LA JUDICATURA, PARA QUE EN NOMBRE Y REPRESENTACION DE LA FEDERACION Y REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONCILIAR, COMPAREZCA A LAS AUDIENCIAS DE CONCILIACION, SANEAMIENTO, DECISION DE EXCEPCIONES PREVIAS Y FIJACION DEL LITIGIO, DE QUE TRATA EL ARTECULO 101 DEL CDDIGO DE PROCEDIMIENTO CIVIL, QUE SE LLEVEN A CABO ANTE LAS AUTORIDADES JURISDICCIONALES DEL ORDEN CIVIL, EN TODO EL TERRITORIO DE LA REPUBLICA, DENTRO DE LOS PROCESOS CIVILES ORDINARIOS, ABREVIADOS DE EJECUCION (EJECUTIVO SINGULAR, EJECUTIVO CON TETULO HIPOTECARIO Y EJECUTIVO CON TETULO PRENDARIO), EN LOS CUALES LA FEDERACION SEA PARTE COMO DERMANDANTE O COMO DEMANDADA, E IGUALMENTE PARA QUE COMPAREZCA EN LA MISMA CLASE DE PROCESOS, REVESTIDO DE PLENA FACULTAD PARA CONFESARA A ABSOLVER LOS INTERROGATORIOS A INSTANCIA DE PARTE QUE DEBA ABSORVER EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION. B. QUE ASE MISMO, CONFIERE PODER AL DOCTOR CARLOS EDUARDO YUMARA LIZARAZO, PARA QUE, IGUALMENTE REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONCILIAR, COMPAREZCA EN NOMBRE REPRESENTCION DE LA FEDERACION A LAS AUDIENCIAS DE CONCILIACION QAE SE LLEVEN A CABO DENTRO DE LOS PROCESOS CONTENCIOSO ADMINISTRATIVOS, EN LOS CUALES SEA PARTE LA ENTIDAD. QUE SE ADELANTEN ANTE LA JURISDICCION DE LO CONTENCIOSO ADMINISTRATIVO, EN TODO EL PAES. FARA TODOS LOS EFECTOS ANTERIORES EL APODERADO PODRA TAMBIN RECIBIR LAS NOTIFICACIONES QUE SEAN DEL CASO.

CERTIFICA:

QUE MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NO.4176 DE LA NOTARIA 6 DE BOGOTA

NOTARIA VEINTISIETE

Miguel Eugenio Rojas de Urue

D.C. DEL 23 DE AGOSTO DE 2000, INSCRITA EL 31 DE JULIO DE 2006 BAJO EL NO. 104761 DEL LIBRO V, COMPARECIO EMILIO ECHEVERRI MEJIA , MAYOR DE EDAD Y ESTA DOMICILIADA EN ESTA CIUDAD, QUIEN SE IDENTIFICA CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 4.317.954 DE MANIZALES QUE ACTUANDO EN SU CONDICION DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. PRIMERO : .QUE ACTUANDO EN SU CONDICION DE SEGUNDO GERENTE AUXILIAR - GERENTE ADMINISTRATIVO DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA Y COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LA ENTIDAD, CONFIERE PODER GENERAL A CARLOS EDUARDO UMAÑA LIZARAZO MAYOR DE EDAD, DE ESTADO CIVIL SOLTERO, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NUMERO 74.281.101 DE GUATEQUE TARJETA PROFESIONAL DE ABOGADO NO. 86.022 DEL CNNSEJO SUPERIOR DE LA JUTICATURA, VECINO Y DOMICILADO EN SANTA FE DE BOGOTA, D. C, PARA QUE. EN NOMBRE Y REPRESENTACION DE LA FEDERACION DE CAFETEROS DE COLOMBIA . 1. LA REPRESENTANTE ANTE LAS DISTINTAS AUTORIDADES JUDICIALES, CON JURISDICCION EN TODO EL PAIS, EN CUALQUIER ACTUACION O DILIGENCIA QUE COMO CONSECUENCIA DE DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA INSTAURADAS CONTRA ELLA HAYA LUGAR. 2) RECIBIR EN NOMBRE DE ELLA TODAS LAS MODIFICACIONES QUE SEAN DEL CASO DENTRO DE LAS DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA QUE INTERPONGAN 3) CONTESTAR EN SU NOMBRE TODOS LOS REQUERIMIENTOS QUE EN DESARROLLO DE LAS ACCIONES DE TUTELA QUE SE INTERPONGAN SE REALICEN POR PARTE DE LOS DESPACHOS JUDICIALES 4) INTERPONER EN CONTRA DE LAS PROVIDENCIAS O FALLOS QUE RESUELVAN LAS DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA , LOS RECURSOS O IMPUGNACIONES A QUE HAYA LUGAR, DE CONFORMIDAD CON LAS NORMATIVIDAD VIGENTE 5) REALIZAR TODAS LAS DEMAS ACTUACIONES QUE SE DERIVEN DE LAS DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA DONDE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA SEA ACCIONADA

CERTIFICA :

** ORGANO DE FISCALIZACION **

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL - FIRMA AUDITORIA	
DELOITTE & TOUCHE LTDA	N.I.T. 08600058134
REVISOR FISCAL	
DUQUE MONTENEGRO ISMAEL	P.P 00000003270
REVISOR FISCAL SUPLENTE	
CARRILLO CAICEDO WILSON OSWALDO	C.C. 00080373219
SUBORDINADA EN SITUACION DE CONTROL	
COFFEA ARABICAS LTDA	N.I.T. 00900057955

CERTIFICA :

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DEL 21 DE MARZO DE 2002 Y RESOLUCION NO. 0103 DEL 22 DE FEBRERO DE 2002 DE LA SUPERINTENDENCIA DE VALORES, INSCRITAS EL 23 DE ABRIL DE 2002 BAJO EL NO. 49020 DEL LIBRO I DE LOS LIBROS DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, SE NOMBRO A FIDUCOLOMBIA S A, COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LOS TENEDORES DE BONOS DE LA EMISION DE 225,000,000,000.00.

CERTIFICA :

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DE BOGOTA D.C. DEL 07 DE SEPTIEMBRE DE 2004, INSCRITO EL 07 DE OCTUBRE DE 2004 BAJO EL NUMERO 0077945 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMUNICO LA SOCIEDAD DE LA REFERENCIA (MATRIZ), QUE HA CONFIGURADO SITUACION DE CONTROL CON LAS SIGUIENTES SOCIEDADES SUBORDINADAS:

- PROMOTORA DE CAFE COLOMBIA S.A. LA CUAL PODRA TAMBIEN UTILIZAR LA SIGLA PROCAFECOL S.A.
DOMICILIO : BOGOTA, D.C.

CERTIFICA :



01



* 6 6 3 2 6 6 9 0 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 6 DE 6

* * * * *

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DE BOGOTA D.C. DEL 28 DE DICIEMBRE DE 2005, INSCRITO EL 05 DE ENERO DE 2006 BAJO EL NUMERO 93498 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMUNICO LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA (MATRIZ), QUE HA CONFIGURADO SITUACION DE CONTROL SOBRE LA SOCIEDAD:

- ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE S A ALMACAFE.
DOMICILIO : BOGOTA, D.C.

CERTIFICA :

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DE BOGOTA D.C. DE MAYO DE 2006, INSCRITO EL 14 DE JUNIO DE 2006 BAJO EL NUMERO 102413 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMUNICO LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA (MATRIZ), QUE HA CONFIGURADO SITUACION DE CONTROL SOBRE LA SOCIEDAD:

- COOFFE ARABICAS LTDA
DOMICILIO : BOGOTA, D.C.

CERTIFICA :

DIRECCION DE NOTIFICACION JUDICIAL : CLL. 73 NO. 8-13
MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA :

QUE EN ESTA CAMARA DE COMERCIO NO APARECEN INSCRIPCIONES POSTERIORES DE DOCUMENTOS REFERENTES A REFORMA, DISOLUCION, LIQUIDACION O NOMBRAMIENTOS DE REPRESENTANTES LEGALES DE LA MENCIONADA ENTIDAD.

I M P O R T A N T E

EL REGISTRO ANTE LAS CAMARAS DE COMERCIO NO CONSTITUYE APROBACION DE ESTATUTOS. (DECRETO 2150 DE 1995 Y DECRETO 427 DE 1996).

LA PERSONA JURIDICA DE QUE TRATA ESTE CERTIFICADO SE ENCUENTRA SUJETA A LA INSPECCION, VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS AUTORIDADES QUE EJERCEN ESTA FUNCION, POR LO TANTO DEBERA PRESENTAR ANTE LA AUTORIDAD CORRESPONDIENTE, EL CERTIFICADO DE REGISTRO RESPECTIVO, EXPEDIDO POR LA CAMARA DE COMERCIO, DENTRO DE LOS 10 DIAS HABILES SIGUIENTES A LA FECHA DE INSCRIPCION, MAS EL TERMINO DE LA DISTANCIA CUANDO EL DOMICILIO DE LA PERSONA JURIDICA SIN ANIMO DE LUCRO QUE SE REGISTRA ES DIFERENTE AL DE LA CAMARA DE COMERCIO QUE LE CORRESPONDE. EN EL CASO DE REFORMAS ESTATUTARIAS ADEMAS SE ALLEGARA COPIA DE LOS ESTATUTOS.

TODA AUTORIZACION, PERMISO, LICENCIA O RECONOCIMIENTO DE CARACTER OFICIAL, SE TRAMITARA CON POSTERIORIDAD A LA INSCRIPCION DE LAS PERSONAS JURIDICAS SIN ANIMO DE LUCRO EN LA RESPECTIVA CAMARA DE COMERCIO.

CERTIFICA :

NOTARIA VEINTISIETE

Maria Eugenia Rojas de Uruea

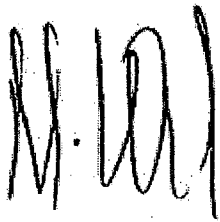
DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

VALOR : \$ 3,200.00

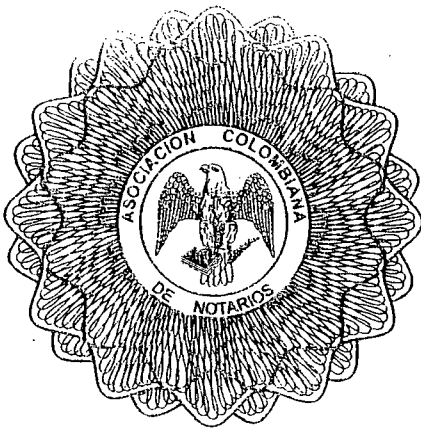
DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES.



ESPACIO EN BLANCO

WK

6301790



motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.-----

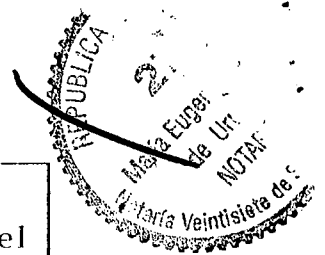
Presentes CARLOS OLARTE, J. IAN RAISBECK y JUAN GUILLERMO MOURE, de las condiciones civiles ya anotadas y manifestaron: que aceptan el poder que mediante esta escritura se les otorga. (HASTA AQUÍ LA MINUTA PRESENTADA EN DISCO) -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos el número(s) de su documento de identidad. Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asume la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conoce la ley y sabe que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.-----

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre la obligación de pagar el impuesto de Registro (Art.226 y s.s. ley 223 del 1995) y también sobre la formalidad del registro dentro del término perentorio de 2 meses contados a partir de la fecha de otorgamiento de este instrumento, cuyo incumplimiento causará intereses moratorios por mes o fracción de mes de retardo, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los

NOTARIA VENTISIEIE

Maria Eugenia Rojas de Suelto



otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, la(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. - Se extendió el presente instrumento público en las hojas de papel Notarial Nos. WK 6301800, WK 6301760, WK 6301804 - - - - -

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCIÓN No. 8850 DE 2007

I.V.A \$ 12.557.00



LUIS GENARO MUÑOZ ORTEGA

CC. 10.536.679 de Popayán

TELÉFONO:

CARLOS OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

TP No 74.295

TELÉFONO: 6017700

J. IAN RAISBECK

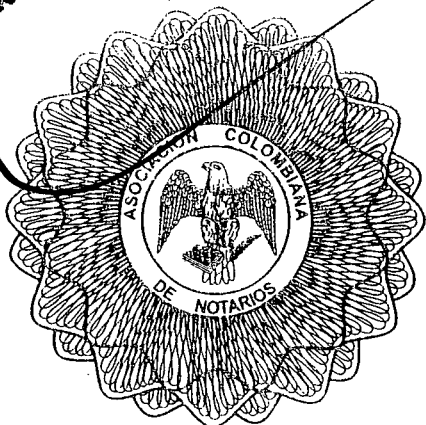
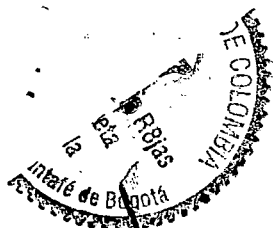
C.C. No. 79'376.996 de Bogotá

TP No. 135.799

TELÉFONO: 6017700

WK

6301804



ESTA HOJA HACE PARTE DE LA
ESCRITURA PUBLICA NÚMERO = = = =
DEL 21 DE ENERO DE 2008 = = = = =
NOTARIA 27 DE BOGOTÁ = = = = =
REFERENTE AL PODER DE
FEDERACIÓN NACIONAL DE
CAFETEROS DE COLOMBIA A:

CARLOS OLARTE, J. IAN RAISBECK y/o JUAN
GUILLERMO MOURE

Juan Guillermo Moure
JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ

C.C. No. 80.412.281 de Usaquén

TP No. 67.343

TELEFONO: 6017700



NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urueta

María Eugenia Rojas de Urueta

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA VEINTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.

Es fiel y Primera (1°)

fotocopia de la Escritura Pública No. 40

de fecha 21 de Enero de 2008

tomada de su original que expido en

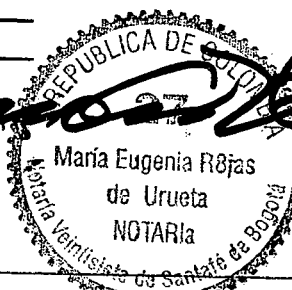
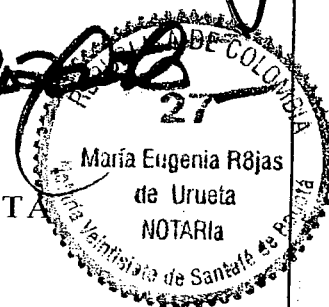
Nueve (9) hojas útiles de papel

común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 ENE 2008

El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá.



ESPACIO EN BLANCO

ESPACIO EN BLANCO

[Handwritten signature]

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 May 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/062317 A2

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/435 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2007/004288
- (22) International Filing Date:
21 November 2007 (21.11.2007)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/866,705 21 November 2006 (21.11.2006) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): FED-
ERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE
COLOMBIA [CO/CO]; Calle 73 No. 8-13, Bogotá, D.C.
(CO).
- (72) Inventors: ACUÑA ZORNOSA, Ricardo; Plan Alto,
Chinchina, Caldas Colombia (CO). ROSE, Jocelyn; 34
Autumn Ridge Circle, Ithaca, New York (US).
- (74) Agent: OLARTE, Carlos R.; Calle 100 No. 8A-37, Torre
A piso 10, Bogotá (CO).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report



WO 2008/062317 A2

(54) Title: BETA-MANNANASE FROM COFFEE BERRY BORER, HYPOTHENEMUS HAMPEI, AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to an isolated Beta-mannanase protein having an amino acid sequence which is 90% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, as well as isolated polynucleotides encoding the Beta-mannanase protein, and isolated expression systems and host cells containing the polynucleotides. The present invention also relates to a method of recombinantly producing Beta-mannanase protein. Also disclosed is a method of degrading mannans and polysaccharides in plant material, which involves providing plant material and contacting the plant material with the Beta-mannanase protein of the present invention under conditions effective to degrade mannans and polysaccharides in the plant material.

**BETA-MANNANASE FROM COFFEE BERRY BORER, HYPOTHENEMUS
HAMPEI, AND USES THEREOF**

5

[0001] This application claims the priority benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/866,705, filed November 21, 2006, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

10

FIELD OF THE INVENTION

[0002] This invention relates to an isolated β -mannanase protein and uses thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

[0003] Mannanases are enzymes that hydrolyze mannans and related hemicellulosic polysaccharides, such as galactomannan and glucogalactomannan (also termed galactoglucomannan). These polysaccharides are characteristic components of plant cell walls and, so, an important potential commercial use of mannanases is in the degradation of hemicellulosic materials from plant biomass, thus providing a means to recover soluble sugars from these biopolymers. Mannan polysaccharides are also found as storage polymers in the seeds of some plant species, such as those of leguminous plants, and coniferous trees.

20

[0004] In coffee bean, galactomannans accumulate to extremely high concentrations and represent approximately 24% of the dry weight of the bean

25

(Bradbury et al., "Chemical Structures of Green Coffee Bean Polysaccharides," *J. Agric. Food Chem.* 38:389-392 (1990)). These polysaccharides consist of a linear chain of mannosyl residues that are linked to each other via beta 1,4 glycosyl linkages, to which are attached alpha-galactosyl residue monomers. It is known that endo-beta-mannanases (EC 3.2.1.78) hydrolyze mannan polymers during seed germination, thus facilitating the exit of the rootlet during germination and releasing small oligosaccharides which are then used as a source of energy for the growth of the young plant. Indeed, in several plants, it has been shown that endo- β -mannanase activity is mainly detected in the endosperm of seeds undergoing germination

30

(Bewley, "Breaking Down the Walls—A Role for Endo- β -Mannanase In Release from Seed Dormancy?" *Trends Plant Sci.* 2:464-469 (1997)).

[0005] Mannanases are produced by microorganisms such as molds, yeasts, and fungi, as well as *Bacillus subtilis*, *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, and Streptomyces. Some higher plants or animals can also produce mannanases; however, no report exists in the literature describing a β -mannanase from insects. Microorganisms that are typically used for commercial production of mannanases include *Trichoderma* or *Aspergillus* spp.

[0006] In industrial processes, during the treatment of coffee, mannans and their derivatives constitute a considerable portion of the insoluble sediments. In addition, during the first extraction step in coffee production only approximately 50% of the mannans are soluble and these polymers are therefore responsible for the majority of the secondary precipitations which occur during the subsequent steps. European Patent No. 0676145A demonstrated that it is possible to hydrolyse coffee galactomannans using an immobilized mannanase extracted from *Aspergillus niger*.

[0007] The present invention is directed to overcoming these and other limitations in the art.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 [0008] One aspect of the present invention is directed to an isolated β -mannanase protein having an amino acid sequence which is 90% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1. The present invention also relates to an isolated polynucleotide encoding the β -mannanase protein, and an isolated expression system and host cell containing the polynucleotide.

25 [0009] Another aspect of the present invention is directed to a method of recombinantly producing β -mannanase protein. This method involves providing a host cell containing the polynucleotide of the present invention and culturing the host cell under conditions effective for the host cell to express β -mannanase protein. The β -mannanase protein is recovered.

30 [0010] A further aspect of the present invention is directed to a method of degrading mannans and polysaccharides in plant material. This method involves providing plant material and contacting the plant material with the β -mannanase

protein of the present invention under conditions effective to degrade mannans and polysaccharides in the plant material.

- [0011] The present invention relates to an isolated polynucleotide sequence which encodes a mannanase enzyme involved in the hydrolysis of mannan polysaccharides, including unbranched or branched mannan molecules linked to each other via a beta 1,4 glycosyl linkage. The polynucleotide is isolated from an insect (coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*) genome.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- 10 [0012] Figure 1 is a photograph showing SDS-PAGE analysis of the recombinant β -mannanase protein according to one embodiment of the present invention expressed in recombinant baculovirus. Lane 1: molecular mass markers (kDa); Lane 2: Speed-vac concentrated protein; Lane 3: 6x-His tagged mannanase purified using paramagnetic particles.
- 15 [0013] Figure 2 is a graph showing time course of AZC-galactomannan hydrolysis with soluble recombinant β -mannanase from *H. hampei*. Enzymatic activity was determined by blue color increase of absorbance across time. β -mannanase activity is mean $\pm$ SE for three reactions.
- [0014] Figure 3 is a graph showing the effect of pH on the activity of recombinant β -mannanase from *H. hampei*, according to the present invention. The buffer was 200 mM sodium acetate pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, and 11.0.
- 20 [0015] Figure 4 is a graph showing the effect of temperature on the activity of the recombinant β -mannanase from *H. hampei*. Enzyme solutions in 200 mM sodium acetate buffer pH 5.0 were incubated at various temperatures for 120 minutes and the activities were measured as described in the Examples (*infra*).
- 25

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- [0016] One aspect of the present invention relates to an isolated β -mannanase protein from coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) having an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, as follows:
- 30



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

[0017] The present invention is also directed to isolated β -mannanase proteins having an amino acid sequence which is at least 90% similar, at least 91% similar, at least 92% similar, at least 93% similar, at least 94% similar, at least 95% similar, at least 96% similar, at least 97% similar, at least 98% similar, and/or at least 99% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[0018] The polynucleotide encoding the β -mannanase protein of SEQ ID NO:1 has a sequence of SEQ ID NO:2, as follows:

30 gctgatcggg tgtgtactca attctttaag gagtttataa tatgaccgct gatacattaa 60
 cgcgggcact gctgctgttg ctgttggtgc gcgctgctgc tgctgtaccc ggattcacgg 120
 35 tttccggtac tcgaatttta gatgctaacg gtcaggaatt tatgataaga ggggtcagtc 180
 acgcacatac ctggtataag gatgatatta atggggccat cacatccatc gctgctgctg 240
 gcgccaacac ggttcgcatt gtactttcta atggcggaaca gtggacaaaa gacaacctgg 300
 40 attcagttca gaacattctg tccctctgtg agagccataa gcttattgcc atgctggaag 360
 ttcacgatgc caccggcaat gacagccaag aaacactgga aaatgccgtg aattactgga 420
 45 aagagcttcg ggacttgctc attggtaagg aagacagagt tattatcaat atagccaatg 480
 agtggttcgg tacctgggat actgctggct gggccgacgg ttataaagtt gtcattccgg 540
 aactacgtaa cgccggactg gaacacctgc tggttgtaga cacagcggga tacggacaat 600
 50 atcctcaagc tatttttgaa aaaggtaagg aggttttcca gacagacctt cttgcccga 660
 cgggtgtttc cattcacatg tatgaatatg cagcgacgga tgtaacaatg ataaaaggaa 720

atattgactc ggccctgaat acaggcatcc cggtgattat tggagaatTTT ggtgaccgaa 780
aaccggagtc gcagcatggt gatatcgata ccatcatgag ctacactcgc gagaaatccg 840
taggctgggt ggccctggtc tggtaggta acggtaacga tgaatcaatt cttgacctga 900
cgaacggacc tagcggagat tacagtctta ctaacgtggg gagtcaaatt gttgacagtg 960
agaacggcat tcgcaaaacc tccacaatct gttcaatatt caattaaaaa aaaagatggt 1020
tgtttgtgca tttttgttat aataaacggt tcatttgcat att 1063

[0019] Isolated polynucleotides having at least 90% similarity, at least 91% similarity, at least 92% similarity, at least 93% similarity, at least 94% similarity, at least 95% similarity, at least 96% similarity, at least 97% similarity, at least 98% similarity, and/or at least 99% similarity to SEQ ID NO:2 are also encompassed by the present invention.

[0020] The genomic sequence from which the isolated polynucleotide of SEQ ID NO:2 is derived has a sequence of SEQ ID NO:3, as follows:

atggttgagt tcaccaatca agaatatgca gacatgcatt tgatttatgg ccaagccaat 60
ggcaattcct acgaagcgcg cagactctac gcacgtagat atcctaactg gagactacct 120
gatccaaaaa catttcctaaa tattcacatt cgactatgtg aaactggaac atataaacag 180
ttcagtgggt tcgaaggagt acatcaaate gcgagaactc cagaaatcga agaagccgtt 240
ctaaatagtg ttgaagccga tctgtctacg agcagaagga aaattgcaat aacattgaac 300
atttcattta tgcttgcttg aagaattctg actgataacc ttttgatatcc ttaccacctt 360
acaagggttc aagctcttct cccacgagac tttccttttag gcgtaaattt ttgcgagtag 420
ttcttataaa tgctggctca aaatccgtcg tttgcatcgt ttgcgtcgtt ttgtttattt 480
tatttacgga tgaagcaaat tttcaagaa attccatccg aaattttcat aatgaacatt 540
tttggggaga agaaaatcca catttagtac gagaaaacaa ttttcaacat caattttctg 600
tcaacgtttg ggcaggaatt attggcgatt atttaatagg accatttttt ctgtcgaaga 660
ggttgaatgg tggctattat catcggtttt tcgaagagga acttcccgtc ctttttagatg 720
aggtagcgct tcttttgaga aaccaaattg ggctaatagca cgatggtgcg ccagtccatt 780
ttagtggga agtaaggaggt ttcctaaatg aacattatca caaccgttgg attgatcgag 840
ggggaaactca gtcattggccc ccgaggtccc cggacctgaa tagtctggat ttttttttct 900
agggacatct caaatccttg gtgtacaaaa cccaattaa cacagtggag gaattgcgaa 960

20

acagaatagt cgattcatgt aacgtcattc gcaatactcc tggatatttt gaaagagtcc 1020
gccgggtctat gaggcacaga gcggaatctt gcatcttagc aagaggagga cattttcaac 1080
5 agttcctata gtcttgtttt atttagatta aattactttt actgttacct tacgaattta 1140
atacataaga ttcattgtac tcttttggtg tacgttttcc ttaatatgca tcggtaactg 1200
10 tttatgcaaa tttttcgcaa atgataaaag atacgagaaa aatgcaagag atcaaaaagt 1260
aagagaaata gacaaggaat ctaaagtga aatcaaaatt tatacatagt gttccaaaaa 1320
aaagttagga agcaaaaaat agcacatgac ccaagaaaac ataagacct gtatatggag 1380
15 agcaacgatt ttgccatttt catatagagg ctcttaaaaa atatagatat accaaatttc 1440
attaaattat ctttaggcat aagaaagaaa atagtagaaa atttaaaaaa aatcaaaact 1500
20 tatcacctg tatatcaaaa atgggtgcgtt tttcccata ggtgtattag catttttttc 1560
ttattttgcc gaatactatc accccctgaa atatctccat gatgatctgt tacaccctgt 1620
acacctaaaa agtaaaataa taaaacgttt aaattttatc ttttaacgta gataagattt 1680
25 tgcgtccttt gtttccttct aagttttaat cgagatttcg cctcattttc gtcatttcgc 1740
cagaagacct cagtgaagc gattcattaa gtctgaaatt taactttgtt cctaccgaa 1800
30 tattcttttt ctgacgatag acgatagctg atcgggtgtg tactcaattc ttaaggagt 1860
ttacaatatg accgtgata cattaacgcg ggcactgctg ctggtgctgt tgtgcgcg 1920
tgctgctgct gtaccggat tcacggtttc cgttactcga attttagatg ctaacggta 1980
35 ggaatttatg ataagagggg tcagtcacgc acatacctgg tataaggatg atattaatgg 2040
ggccatcaca tccatcgctg ctgctggcgc caacacggtt cgcattgtac tttctaattg 2100
40 cggacagtgg acaaaagaca acctggatc agttcagaac attctgtccc tctgtgagag 2160
ccataagctt attgccatgc tggaagtcca cgatgccacc ggcaatgaca gccaagaaac 2220
actggaaaat gccgtgaatt actggaaaga gttcgggac ttgctcattg gtaaggaaga 2280
45 cagagttatt atcaatatag ccaatgagtg gttcgtacc tgggatactg ctggtgggc 2340
cgacggttat aaagttgtca ttccggaact acgtaacgcc ggactggaac acctgctggt 2400
50 tgtagacaca gcgggatacg gacaatatcc tcaagctatt ttgaaaaag gtaaggaggt 2460
tttccagaca gaccttctg cccgcacggt gttttccatt cacatgtatg aatatgcagc 2520
gacggatgta acaatgataa aaggaaatat tgactcgcc ttgaatacag gcatcccggt 2580
55 gattattgga gaatttggtg accgaaaacc ggagtcgcag catgttgata tcgataccat 2640
catgagctac actcgcgaga aatccgtagg ctggttgcc tggctctggt acggtaacgg 2700
60 taacgatgaa tcaattcttg acctgacgaa cggacctagc ggagattaca gtcttactaa 2760

cgtggggagt caaatgttg acagtgagaa cggcattcgc aaaacctcca caatctgttc 2820
aatattcaat taaaaaaaa gatgtttgtt tgtgcatttt tgttataata aacgtttcat 2880
5 ttgcatatta aatatactaa tccaatatat atttatagac aatagattat taaaaagta 2940
aattttaaaa taacttcttc aaaaaagaac atttacgctc aaagtgcctc atagacgtca 3000
10 ataatttaaa atgtcactct tcgcacattg acaataacct gcatagacgt ctatgaacgt 3060
cgttgtctat agacgtgttc ctttaattgt tttctaaagc tttgatcaat tggttcagaa 3120
aaacggttca atagattcat ttaataattt acaggactat tgggggtaca ttaggctata 3180
15 aaacggcctc tcaatatttg tcttcccatc aatatttaaa aagtaatagt agatttgta 3240
aaggactgta aatgttaatt ttttagtagt tttccaaat taaagctaag agtaaaaaa 3300
20 acggtttttc tacaaaagtc atggaagggt tttgtaggga atttaacag gtttttaaaa 3360
ctatccttga aattaaagtt tacttaagcg atcactgggt gctgagatat cgatgatcaa 3420
agataaaagg atcctttttc tttcaaagtt agatgtctca gcaagggtt gacgtagatg 3480
25 tatgaaaaaa aaaacaaaat gaagctgaat aaacaaggta accgaccact gtacgacaag 3540
ggttcaaatg gaaaaaaatt tctgagacct atggagactt tagaagaaga agaaaatttt 3600
30 gaaaaatgtt tacctcgcgc catttcttgg gattgcgcgg taaccataac tccaaaggaa 3660
attccgatgt aagatctgaa aactataaaa cattaagctt caaatgctt ttttctcaa 3720
ctcgatacga cgtttttttc acaagatac tcaaagaaca ctaaaaaaaa taaaaaagg 3780
35 tttttacttt aattttttgg attagtatta ttaacattat ttaatctaaa ataatactga 3840
tattggtatt aactttcacc aggtacactg gtttcaatag aaacggtacc aatttagtta 3900
40 catagcatca aagaaaagaa tgacattatg atcatcaatt ataattgatt gttcgattat 3960
aatataacta ttattgatta ttatattatt ataattctct taggtattaa gcccttaagt 4020
caaaaatcgt agttttctac aaaacgagat taaaaatttt ataacgctat gcaacagaaa 4080
45 aaaaaattca ctgggtttac agtacgtggt gatgatacct cactatttac tcaattaata 4140
tttatatata aaatagtccc atcaattatt taaattttca aaaaaaaaaa ttattaaatt 4200
50 gttcaacaaa gagttaacaa taatttcaca atagttaaga actaatttct taattttcaa 4260
tatggcccc ttctgtaaa atacacttat ctattcggtt tctgatgtgt tgcacaactt 4320
aaataataaa tgttgtaata tttcttgaaa atttaattaa ggttaccaga tgtcactttt 4380
55 ttacaattat tctaacaaga gttgagtgat agtttagggt tcgatccctg ctacctccga 4440
tatttttttt tttcgttttt tttttgttaa taacaatagt aataattgtc aaaataatta 4500
60 aaaacgataa aaataattta tttgacgcat tttacagtta tttaaagctt gtaatgagag 4560

aatttatatg attcgcatat taaattaagg attttcacta caaatttcat atttcaaaaa 4620
5 caattggtcc tattttaata aaattatcta ccaggagggtt ttgatgatg ctctttcata 4680
atatgttaaa aaaatgcgtt taaaattacc ctaatacatt tttctgtaa atctacccta 4740
atatttaact ataaaaacgt acgccaatga cgaagggaaa ccatttttagg caaatcacia 4800
10 tcggaattca aagatacaca actgatccaa atttgaagtg aatcggctaa acagtttttg 4860
agatacaaaa gtggctccat gaatcgtgcg acatactata tgcatcaaaa ataagacttt 4920
tttttctat aaacatgtgc cctaaaatgc accccctcca aactacagcc attctaagtt 4980
15 gcgcgacaaa aatcaattat tttaaatttt gactacagtt atggatcaaa tttttgaaaa 5040
attgcacatc cgtttttctt aaacactgta ttcatttctt gctttaaaaa taacgtaacc 5100
20 ctaatttttag agaagatgga gagggatcca cttattgctt aaataaaatt taatgtttcc 5160
aacgagaaat cctaacttta accatcagca tctagtagac catggaaaaa tctaaaattt 5220
atctctagca ttttcttaat gcaactaatc gaatctttac aggacctgac ataaaaaaat 5280
25 taattgatga tacctctttt ttatcaagtc tcattttacat agaataacag gcatgattag 5340
catttggtga cgtcacaaaa aattttctcg gcaattacaa atcaacagat ttctgtgaaa 5400
30 aaattaattt aatgttgaat gcctatcaga aattaggggtg caatatatca ctgaaaattc 5460
atttcttgca atatcactta agttttttcc gaaaaatatg gattcagtta gtaatgaact 5520
aggatatatg gcggtaaatt tatgttgcaa aaaaatgtac gcagattacc tgaattataa 5580
35 caacaaagtt gtcgaaaaat gtcgaaacac ctccgaaaat tgaaacatag caaaaattat 5640
ccgagtcatt tatgcacttg aattcgtgat ttcttttact catttcacaa atttattaca 5700
40 tgattaaaat taaattattt attaaattac aagagaatga taaaaaaaat aattaaggct 5760
tttaaattgt gtatatgaac tgtcacaccg taacagattt gtcaacatat taacaattga 5820
cagtaaaaat ttcaaattta taattcggtc atccattaga aaattcataa cttcactatt 5880
45 tatccataaa ttgcatcca aagtaacttg ttcttttcat gaatgtgtca gctctacata 5940
aaacaattga aactggacct atctttgcga tttctatttt ttccagggcc atatgggaaa 6000
50 ctttgcaata aatcttgtgc aataaattat gacaattagg aaattttggt gcggtgtaca 6060
tattatatac aggttgaaga aaatacctcc ccataaaaag ggocctcaaa atagtctaatt 6120
acaattttgc ccttaaacga acagggaaga taatattaaa ggatattgaa atttatatgg 6180
55 gttttctat tgtcggtcog gaggggcaac atccaatata ctatatgaaa taaagttgtc 6240
tatagttagt acattgttaa taatttgatt ttcatatatt ctgtattcag tttctaccgt 6300
60 acaagtagcg gcggagatgt ggatgtcatg tattattaaa cttgtatgga aaaaaaggat 6360

aaaaaggac acttatatct ccaccattga tgaatggta aagctggtaa ttttttgaa 6420
5 tacacctacc gatatgctaa actcatatac gaaatttggt taaaaaatct taagccgttt 6480
tggaatttaa aaaataaaga aatgttcttt tttttaact ttaacaccct gtatctcgga 6540
aacggtgcgt ttgcgggcc atgttcataa aaactttttt gcttattttt gtctgaagaa 6600
10 tcatcccttg aaatttatgc acgtacttaa ttaacaccct gtatttcacg taccatgtcc 6660
tactatacct aaactcaaca gttggcgaga aattttgttg tcgtacctgg tttttgggcc 6720
atcctgtata catggattta tcatcacaaa aacctcaacc aaaaaataaa attgacgtgt 6780
15 atgagcggtt ttttttttg aaaaacaaat ttctgaattt taaatgaatg tattccttat 6840
tttatcataa acctgtatat aaatttataa aaaacgtgat gtgatacgtg aaaactaagt 6900
20 tgttatttgg attcagcagg acaaaattta tatgttttat ctataattat gcaaaaaata 6960
ttttcatcgc agaccogtgt tatcaatgta aaaattaatt aaacccctc gtaaaagcca 7020
gcgttttgac atttgaatgt ttccgcccc atgttgaagg gaaaaataaa aagttactag 7080
25 aatgtaacta gttaggctgc catatttga gtaacatgtt ccctctctct ctetaacaca 7140
cgtgaacata actttgcggt actgtataga ttagtgact gtacctacat agtcatacgt 7200
30 atggaaactt atacagtga tcaatttaaa aactagcaat ggagaatata ttctaaatga 7260
aaagtgtat caggacgatc tcaaaaacgt atcgggggat tcgaaaagga accaaaatga 7320
tatattaatc aatccgtttt cacttatccc ctgcgccca accaccccaa cgttcagaat 7380
35 ttcaaatggc accatctgtc atgtaatacc tcaaatggaa ggtatttcaa aactgcattt 7440
aggggtataa ttagatttta atttattgat tcgttttga gaaaaagtgc ctcaaaaagg 7500
40 taaaattaaa aattttaata ttgtttctta caaaaacaat taggttttca atacatgttg 7560
ttaggaacag ggccggattt agggcagggc aggcggggct actgcccgg ggccccaca 7620
aggaaggggc cccacaata gagaaaaata aatatcgaaa ttctgacggg tcagcaactt 7680
45 ttaatttttt ttagtttttt caatacttaa gtgtctttcg ggaccogtg agcgaattgg 7740
ggtgctgggt ggggtaaaca actagctccg agtggtgctaa ttgcggcgtt ctttaaaaaa 7800
50 aataatttat ttttgtttct ttttttcatt ttctggcgtt tcctggatgc caaaaatatg 7860
ttttttttct caaaactgta aatgtcgta aagcgttacg gacccaagt ttccatttac 7920
tgtcaatttt ttattttatc aagcatctcg gtggcaatac tttttttta atgtgtaatt 7980
55 tgtaatttgt gctcatgagt taaaagaaa taaaataagt aaaaagaaat tccaaggttt 8040
tataaaaagt atatatggta accgggtgac tattaataatt tcttctcaag taggctttgg 8100
60 aattatttga caccgagtcc gtatgtctta gatttattaa cagattcgta ttttaagtga 8160

gttgggttta tttgtttata ttcgaaacta agtaaagaac atatcaaaga cttacggact 8220
cgctgtcaaa taattccaca gcctacttga gaagaaattt taatagtcac ccgttataaa 8280
5 tacgatttaa atcttacggt tggcaacact gtcgtggtta agaagtgtcc gagtgtagcg 8340
tgctcgaagc ggggaatccc taaattttat tagaagctac ggacgtattg caacaaaagt 8400
10 aaaatcttct gaatttatat ctacaaacac acgtaagtat tttcgtattt atcttgtgat 8460
ctataagata taatgaattt tatatttcat tgtgcaatta cgaaaatttg ttttttttcc 8520
ttaaaggagc gatatgcttt aaagagcaaa aacgtaaaca gaggttatgg aggtttttatt 8580
15 ccacgactac attcttattt tcttaagatt tctttttacaa tgggtattatg agtgatcgcc 8640
ataaaactcc tcgagttttc gctagtggat cccaaaaaag gaaattgcaa acagaacgtg 8700
20 aaaaaaaaaa agtgaagaaa atttagctaa aatacccaaa ttgaccaact attttacatc 8760
gacacccaaa caaaaacttc cgcaagatcc tgaaaaatca gcagaagatt cagcagtaga 8820
tggagatggg gttgatagta atcaagataa tccagctggt acatcaggcg acaccatagg 8880
25 atcttcaaaa acttgtagtc acaatcaaga ggaagtagat tttcgtggtt tcaaaaatga 8940
cattggtctt tggcctgacg tcataacaga agaatgatc aaatattggg cgaagaaggg 9000
30 ttccacaaaa ctgcaaaact gtgatgaagt ttctctgcag aattcagttc tccaagacca 9060
gtcgcaagat aataaaaaact ttgttcggaa atgttcaaag aatatgttta cacgtcgcaa 9120
tcaaaatcaa gagactgtta atcgattctg gctttgtttt tctccaacta agggaaaagt 9180
35 atattgctat gcatgtaaat taatgtccac tcaaaaacga agctaagtgg ggaaggcttc 9240
agtgactgga aacatgcacg tgagcggctg tacgagcatg agatttcaaa aactcatttg 9300
40 gaatcagtga tgaatttagt gcaacgagga gaagtcacag gacgtatcga tcaagagtta 9360
acgatacaag aggcacaaca aattgaatat tggcgaaaaa ttcttacaat tgtcgtcagt 9420
acgattaaat tcattgctga acgcggatta gcctttcgag gagacgatga aattattgga 9480
45 tcatcgagaa atggcaattt tctgggtatt ttagaattgc tagccgagta cgaaccaatc 9540
ttggcagctc atttaaaaca gcatgcaaac aaaggagag gtcacgtcaa ttatctttct 9600
50 tctacgatct gcgaagaact gacaaattcc atgggtgatc aagtgttcaa tgaaatcgta 9660
gcaaggatta aaaaatcaaa gtactattct gtttcagtgg actctactcc tgacgaatct 9720
catatcgatc aacttactat agttattcgc tatattgaag gatcgatgcc aaaggaacga 9780
55 tttcttattt ttaccaaaat tgcggtcata ctggtgaagc cacagcaaaa gctttactac 9840
aatttttaag ttaccatcaa attgacatcc ttaattgccg aggtcaatcg tacgacaatg 9900
60 ctgcaaatat gagtggtaaa tatcaaggga tgcaagctct tattttgcag aaaaatcatt 9960

tatctacgtt tgtaccatgt tgtggtcact cactcaactt agttggaaag gcagctgcta 10020
actcttgtgc atcggcagtt caattctttg atttcgttca gaatttatat acgtttttta 10080
5 cagcaagtac acaacgatac cgaattctgt ctgaaaaatt atcagagaaa aaaagcggac 10140
agtcatatgt tttaaaaaat cttagcgata ctgctggtc atgtagggtt gcagccacga 10200
10 aggccattgt tatgggatat tctgaaatcg aagaagctct aaccagcata tcttctgata 10260
aggaacagaa agat 10274

[0021] The determination of percent identity, *i.e.* sequence similarity, between
15 two amino acid sequences or two nucleotide sequences can be accomplished using a
mathematical algorithm. A preferred, non-limiting example of a mathematical
algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin et
al., "Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence
Features by Using General Scoring Schemes," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2264-2268
20 (1990), which is hereby incorporated by reference in its entirety, modified as in Karlin
et al., "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular
Sequences," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877 (1993), which is hereby
incorporated by reference in its entirety. Another non-limiting example of a
mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences is the algorithm of
25 Myers et al., CABIOS (1989). Such an algorithm can be incorporated into the
ALIGN program (version 2.0) which is part of the CGC sequence alignment software
package. Additional algorithms for sequence analysis are known in the art and
include ADVANCE and ADAM as described in Torellis et al. "ADVANCE and
ADAM: Two Algorithms for the Analysis of Global Similarity between Homologous
30 Informational Sequences," *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5 (1994), which is hereby
incorporated by reference in its entirety, and FASTA described in Pearson et al.,
"Improved Tools for Biological Sequence Comparison," *Proc. Natl. Acad. Sci.*
85:2444-8 (1988), which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0022] The isolated β -mannanase protein of the present invention is preferably
35 produced in purified form by conventional techniques. For example, to isolate the
protein, a protocol involving a host cell such as *Escherchia coli* may be used, in
which the *E. coli* host cell carrying a recombinant plasmid is propagated,
homogenized, and the homogenate is centrifuged to remove bacterial debris. The

ab

supernatant is then subjected to sequential ammonium sulfate precipitation. The fraction containing the β -mannanase protein can be subjected to gel filtration in an appropriately sized dextran or polyacrylamide column to separate the protein or polypeptide. If necessary, the protein fraction may be further purified by HPLC.

- 5 Isolated β -mannanase proteins of the present invention may also be produced according to a protocol involving insect host cells, preferably Sf9 insect cell lines.

[0023] The present invention is also directed to fragments of the β -mannanase protein of the present invention. Fragments of the β -mannanase protein can be produced by digestion of a full-length protein with proteolytic enzymes like
10 chymotrypsin or *Staphylococcus* proteinase A, or trypsin. Different proteolytic enzymes are likely to cleave the β -mannanase protein at different sites based on the amino acid sequence of the protein.

[0024] In another approach, based on knowledge of the primary structure of the protein, fragments of the genes encoding the protein may be synthesized by using
15 a PCR technique together with specific sets of primers chosen to represent particular portions of the protein of interest. These then would be cloned into an appropriate vector for expression of a truncated peptide or protein.

[0025] Chemical synthesis can also be used to make suitable fragments. Such a synthesis is carried out using known amino acid sequences for the protein being
20 produced. Alternatively, subjecting a full length β -mannanase protein of the present invention to high temperatures and pressures will produce fragments. These fragments can then be separated by conventional procedures (e.g., chromatography, SDS-PAGE).

[0026] Variants may also (or alternatively) be made, for example, by the
25 deletion or addition of amino acids that have minimal influence on the properties, secondary structure and hydrophobic nature of the protein. For example, a protein may be conjugated to a signal (or leader) sequence at the N-terminal end of the protein which co-translationally or post-translationally directs transfer of the protein. The protein may also be conjugated to a linker or other sequence for ease of synthesis,
30 purification, or identification of the protein.

[0027] The protein of the present invention is preferably produced in purified form (preferably at least about 80%, more preferably 90%, pure) by conventional techniques. Typically, the protein of the present invention is secreted into the growth



medium of *Helicobacter* cells or host cells which express a functional type III secretion system capable of secreting the protein of the present invention.

Alternatively, the protein of the present invention is produced but not secreted into growth medium of recombinant host cells (e.g., *Escherichia coli*). In such cases, to
5 isolate the protein, the host cell (e.g., *E. coli*) carrying a recombinant plasmid may be propagated, lysed by sonication, heat, differential pressure, or chemical treatment, and the homogenate is centrifuged to remove bacterial debris. The supernatant is then subjected to sequential ammonium sulfate precipitation. The fraction containing the polypeptide or protein of the present invention is subjected to gel filtration in an
10 appropriately sized dextran or polyacrylamide column to separate the proteins. If necessary, the protein fraction may be further purified by HPLC.

[0028] The present invention also relates to an isolated polynucleotide encoding the β -mannanase protein, and an isolated expression system and host cell containing the polynucleotide.

15 [0029] Another aspect of the present invention is directed to a method of recombinantly producing β -mannanase protein. This method involves providing a host cell containing the polynucleotide of the present invention and culturing the host cell under conditions effective for the host cell to express β -mannanase protein. The β -mannanase protein is recovered.

20 [0030] The polynucleotide of the present invention may be inserted into any of the many available expression vectors using reagents that are well known in the art. In preparing a DNA vector for expression, the DNA sequence may normally be inserted or substituted into a bacterial plasmid. Any convenient plasmid may be employed, which will be characterized by having a bacterial replication system, a
25 marker which allows for selection in a bacterium, and generally one or more unique, conveniently located restriction sites. Numerous plasmids, referred to as transformation vectors, are available for plant transformation. The selection of a vector will depend on the preferred transformation technique and target species for transformation. A variety of vectors are available for stable transformation using
30 *Agrobacterium tumefaciens*, a soilborne bacterium that causes crown gall. Crown gall is characterized by tumors or galls that develop on the lower stem and main roots of the infected plant. These tumors are due to the transfer and incorporation of part of the bacterium plasmid DNA into the plant chromosomal DNA. This transfer DNA

(T-DNA) is expressed along with the normal genes of the plant cell. The plasmid DNA, pTi, or Ti-DNA, for "tumor inducing plasmid," contains the *vir* genes necessary for movement of the T-DNA into the plant. The T-DNA carries genes that encode proteins involved in the biosynthesis of plant regulatory factors, and bacterial nutrients (opines). The T-DNA is delimited by two 25 bp imperfect direct repeat sequences called the "border sequences." By removing the oncogene and opine genes, and replacing them with a gene of interest, it is possible to transfer foreign DNA into the plant without the formation of tumors or the multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* (Fraley et al., "Expression of Bacterial Genes in Plant Cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 80:4803-4807 (1983), which is hereby incorporated by reference in its entirety).

[0031] Further improvement of this technique led to the development of the binary vector system (Bevan, "Binary *Agrobacterium* Vectors for Plant Transformation," *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721 (1984), which is hereby incorporated by reference in its entirety). In this system, all the T-DNA sequences (including the borders) are removed from the pTi, and a second vector containing T-DNA is introduced into *Agrobacterium tumefaciens*. This second vector has the advantage of being replicable in *E. coli* as well as *A. tumefaciens*, and contains a multiclonal site that facilitates the cloning of a transgene. An example of a commonly used vector is pBin19 (Frisch et al., "Complete Sequence of the Binary Vector Bin19," *Plant Molec. Biol.* 27:405-409 (1995), which is hereby incorporated by reference in its entirety). Any appropriate vectors now known or later described for genetic transformation are suitable for use with the present invention.

[0032] Suitable vectors for practicing the present invention may also include, but are not limited to, the following viral vectors such as lambda vector system gt11, gtWES.tB, Charon 4, and plasmid vectors such as pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pKC37, pKC101, SV 40, pBluescript II SK +/- or KS +/- (see "Stratagene Cloning Systems" Catalog (1993), which is hereby incorporated by reference in its entirety), pQE, pIH821, pGEX, pET series (Studier et al., "Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes," *Methods in Enzymology* 185:60-89 (1990), which is hereby incorporated by reference in its entirety), and any derivatives thereof.

[0033] U.S. Patent No. 4,237,224 issued to Cohen and Boyer, which is hereby incorporated by reference in its entirety, describes the production of expression systems in the form of recombinant plasmids using restriction enzyme cleavage and ligation with DNA ligase. These recombinant plasmids are then introduced by means of transformation and replicated in unicellular cultures including prokaryotic organisms and eukaryotic cells grown in tissue culture.

[0034] A variety of host-vector systems may be utilized to express the protein-encoding sequence(s) of the present invention. Primarily, the vector system must be compatible with the host cell used. Host-vector systems include but are not limited to the following: bacteria transformed with bacteriophage DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA; microorganisms such as yeast containing yeast vectors; mammalian cell systems infected with virus (e.g., vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems infected with virus (e.g., baculovirus); and plant cells infected by bacteria. The expression elements of these vectors vary in their strength and specificities. Depending upon the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements can be used.

[0035] The protein according to the present invention can be incorporated into an appropriate vector in the sense direction, such that the open reading frame is properly oriented for the expression of the encoded protein under control of a promoter of choice. This involves the inclusion of the appropriate regulatory elements into the DNA-vector construct. These include non-translated regions of the vector, useful promoters, and 5' and 3' untranslated regions which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements may vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used.

[0036] A constitutive promoter is a promoter that directs expression of a gene throughout the development and life of an organism. Examples of some constitutive promoters that are widely used for inducing expression of transgenes include the nopaline synthase (NOS) gene promoter, from *Agrobacterium tumefaciens* (U.S. Patent No. 5,034,322 issued to Rogers et al., which is hereby incorporated by reference in its entirety), the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S and 19S promoters (U.S. Patent No. 5,352,605 issued to Fraley et al., which is hereby

incorporated by reference in its entirety), those derived from any of the several actin genes, which are known to be expressed in most cells types (U.S. Patent No. 6,002,068 issued to Privalle et al., which is hereby incorporated by reference in its entirety), and the ubiquitin promoter, which is a gene product known to accumulate in many cell types.

5 [0037] An inducible promoter is a promoter that is capable of directly or indirectly activating transcription of one or more DNA sequences or genes in response to an inducer. In the absence of an inducer, the DNA sequences or genes will not be transcribed. The inducer can be a chemical agent, such as a metabolite, growth
10 regulator, herbicide, or phenolic compound, or a physiological stress directly imposed upon the plant such as cold, heat, salt, toxins, or through the action of a pathogen or disease agent such as a virus or fungus. A plant cell containing an inducible promoter may be exposed to an inducer by externally applying the inducer to the cell or plant such as by spraying, watering, heating, or by exposure to the operative pathogen. An
15 example of an appropriate inducible promoter for use in the present invention is a glucocorticoid-inducible promoter (Schena et al., "A Steroid-Inducible Gene Expression System for Plant Cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10421-5 (1991), which is hereby incorporated by reference in its entirety). Expression of the transgene-encoded protein is induced in the transformed plants when the transgenic plants are
20 brought into contact with nanomolar concentrations of a glucocorticoid, or by contact with dexamethasone, a glucocorticoid analog (Schena et al., "A Steroid-Inducible Gene Expression System for Plant Cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-5 (1991); Aoyama et al., "A Glucocorticoid-Mediated Transcriptional Induction System in Transgenic Plants," *Plant J.* 11: 605-612 (1997), and McNellis et al.,
25 "Glucocorticoid-Inducible Expression of a Bacterial Avirulence Gene in Transgenic Arabidopsis Induces Hypersensitive Cell Death," *Plant J.* 14(2):247-57 (1998), which are hereby incorporated by reference in their entirety). In addition, inducible promoters include promoters that function in a tissue specific manner to regulate the gene of interest within selected tissues of the plant. Examples of such tissue specific
30 or developmentally regulated promoters include seed, flower, fruit, or root specific promoters as are well known in the field (U.S. Patent No. 5,750,385 issued to Shewmaker et al., which is hereby incorporated by reference in its entirety). In the preferred embodiment of the present invention, a heterologous promoter is linked to

the nucleic acid of the construct, where "heterologous promoter" is defined as a promoter to which the nucleic acid of the construct is not linked in nature.

[0038] The expression system of the present invention can also include an operable 3' regulatory region, selected from among those which are capable of providing correct transcription termination and polyadenylation of mRNA for expression in the host cell of choice, operably linked to a DNA molecule which encodes for a protein of choice.

[0039] The vector of choice, promoter, and an appropriate 3' regulatory region can be ligated together to produce the DNA construct of the present invention using well known molecular cloning techniques as described in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, NY (1989), and Ausubel, F. M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York, N.Y: John Wiley & Sons, (1989), which are hereby incorporated by reference in their entirety.

[0040] The efficiency of expression can be enhanced by the inclusion of appropriate transcription or translation enhancer elements (e.g., elements disclosed in Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:516 (1987), which is hereby incorporated by reference in its entirety). Additionally, the gene sequence can be modified for optimal codon usage in the appropriate expression system or, alternatively, the expression host can be modified to express specific tRNA molecules to facilitate expression of the desired gene.

[0041] In addition, the recombinant expression vector can contain additional nucleotide sequences. For example, the recombinant expression vector may encode a selectable marker gene to identify host cells that have incorporated the vector. Moreover, to facilitate secretion of the protein from a host cell, the recombinant expression vector can encode a signal sequence linked to the amino-terminus of the protein, such that upon expression, the protein is synthesized with the signal sequence fused to its amino terminus. This signal sequence directs the protein into the secretory pathway of the cell and is then usually cleaved, allowing for release of the protein without the signal sequence from the host cell. Use of a signal sequence to facilitate secretion of proteins or peptides from mammalian host cells is well known in the art.

[0042] Once an expression system containing a polynucleotide according to the present invention has been prepared, it is ready to be incorporated into a host cell. Basically, this method can be carried out by transforming a host cell with the expression system of the present invention under conditions effective to yield transcription of the DNA molecule in the host cell. Recombinant molecules can be introduced into cells via transformation, particularly transduction, conjugation, mobilization, or electroporation. The DNA sequences are cloned into the host cell using standard cloning procedures known in the art, as described by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, New York (1989), which is hereby incorporated by reference in its entirety. Suitable host cells include, but are not limited to, bacteria, virus, yeast, mammalian cells, insect, plant, and the like. Methods of transformation may result in transient or stable expression of the nucleic acid under control of the promoter. In one embodiment, a nucleic acid construct of the present invention is stably inserted into the genome of the recombinant plant cell as a result of the transformation, although transient expression can serve an important purpose, particularly when the plant under investigation is slow-growing.

[0043] Plant tissue suitable for transformation include leaf tissue, root tissue, meristems, zygotic and somatic embryos, callus, protoplasts, tassels, pollen, embryos, anthers, and the like. The means of transformation chosen is that most suited to the tissue to be transformed.

[0044] Transient expression in plant tissue is often achieved by particle bombardment (Klein et al., "High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids Into Living Cells," *Nature* 327:70-73 (1987), which is hereby incorporated by reference in its entirety). In this method, tungsten or gold microparticles (1 to 2 μm in diameter) are coated with the DNA of interest and then bombarded at the tissue using high pressure gas. In this way, it is possible to deliver foreign DNA into the nucleus and obtain a temporal expression of the gene under the current conditions of the tissue. Biologically active particles (e.g., dried bacterial cells containing the vector and heterologous DNA) can also be propelled into plant cells. Other variations of particle bombardment, now known or hereafter developed, can also be used.

[0045] An appropriate method of stably introducing the nucleic acid construct into plant cells is to infect a plant cell with *Agrobacterium tumefaciens* or

37

Agrobacterium rhizogenes previously transformed with the nucleic acid construct. As described above, the Ti (or RJ) plasmid of *Agrobacterium* enables the highly successful transfer of a foreign nucleic acid molecule into plant cells. Another approach to transforming plant cells with a gene which imparts resistance to pathogens is particle bombardment (also known as biolistic transformation) of the host cell, as disclosed in U.S. Patent Nos. 4,945,050, 5,036,006, and 5,100,792, all to Sanford et al., and in Emerschad et al., "Somatic Embryogenesis and Plant Development from Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinifera*)," *Plant Cell Reports* 14:6-12 (1995), which are hereby incorporated by reference in their entirety. Yet another method of introduction is fusion of protoplasts with other entities, either minicells, cells, lysosomes, or other fusible lipid-surfaced bodies (Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1859-63 (1982), which is hereby incorporated by reference in its entirety). The nucleic acid molecule may also be introduced into the plant cells by electroporation (Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824 (1985), which is hereby incorporated by reference in its entirety). In this technique, plant protoplasts are electroporated in the presence of plasmids containing the expression cassette. Electrical impulses of high field strength reversibly permeabilize biomembranes allowing the introduction of the plasmids. Electroporated plant protoplasts reform the cell wall, divide, and regenerate. The precise method of transformation is not critical to the practice of the present invention. Any method that results in efficient transformation of the host cell of choice is appropriate for practicing the present invention.

[0046] After transformation, the transformed plant cells must be regenerated. Plant regeneration from cultured protoplasts is described in Evans et al., *Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. 1*: (MacMillan Publishing Co., New York, 1983); Vasil I.R. (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I, 1984, and Vol. III (1986), and Fitch et al., "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryos of Papaya (*Carica papaya* L.)," *Plant Cell Rep.* 9:320 (1990), which are hereby incorporated by reference in its entirety.

[0047] Means for regeneration varies from species to species of plants, but generally a suspension of transformed protoplasts or a petri plate containing explants is first provided. Callus tissue is formed and shoots may be induced from callus and subsequently rooted. Alternatively, embryo formation can be induced in the callus

tissue. These embryos germinate as natural embryos to form plants. The culture media will generally contain various amino acids and hormones, such as auxin and cytokinins. Efficient regeneration will depend on the medium, on the genotype, and on the history of the culture. If these three variables are controlled, then regeneration is usually reproducible and repeatable.

[0048] Preferably, transformed cells are first identified using a selection marker simultaneously introduced into the host cells along with the nucleic acid construct of the present invention. Suitable selection markers include, without limitation, markers encoding for antibiotic resistance, such as the nptII gene which confers kanamycin resistance (Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807 (1983), which is hereby incorporated by reference in its entirety), and the genes which confer resistance to gentamycin, G418, hygromycin, streptomycin, spectinomycin, tetracycline, chloramphenicol, and the like. Cells or tissues are grown on a selection medium containing the appropriate antibiotic, whereby generally only those transformants expressing the antibiotic resistance marker continue to grow. Other types of markers are also suitable for inclusion in the expression cassette of the present invention. For example, a gene encoding for herbicide tolerance, such as tolerance to sulfonyleurea is useful, or the dhfr gene, which confers resistance to methotrexate (Bourouis et al., *EMBO J.* 2:1099-1104 (1983), which is hereby incorporated by reference in its entirety). Similarly, "reporter genes," which encode for enzymes providing for production of an identifiable compound are suitable. The most widely used reporter gene for gene fusion experiments has been *uidA*, a gene from *Escherichia coli* that encodes the β -glucuronidase protein, also known as GUS (Jefferson et al., "GUS Fusions: β Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants," *EMBO J.* 6:3901-3907 (1987), which is hereby incorporated by reference in its entirety). Similarly, enzymes providing for production of a compound identifiable by luminescence, such as luciferase, are useful. The selection marker employed will depend on the target species; for certain target species, different antibiotics, herbicide, or biosynthesis selection markers are preferred.

[0049] Plant cells and tissues selected by means of an inhibitory agent or other selection marker are then tested for the acquisition of the viral gene by Southern blot hybridization analysis, using a probe specific to the viral genes contained in the given

33

cassette used for transformation (Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press (1989), which is hereby incorporated by reference in its entirety).

5 [0050] After the fusion gene containing a nucleic acid construct of the present invention is stably incorporated in transgenic plants, the transgene can be transferred to other plants by sexual crossing. Any of a number of standard breeding techniques can be used, depending upon the species to be crossed. Once transgenic plants of this type are produced, the plants themselves can be cultivated in accordance with conventional procedure so that the nucleic acid construct is present in the resulting
10 plants. Alternatively, transgenic seeds are recovered from the transgenic plants. These seeds can then be planted in the soil and cultivated using conventional procedures to produce transgenic plants.

[0051] The present invention can be utilized in conjunction with a wide variety of plants or their seeds. Suitable plants include dicots and monocots. Useful
15 crop plants can include: alfalfa, rice, wheat, barley, rye, cotton, sunflower, peanut, corn, potato, sweet potato, bean, pea, chicory, lettuce, endive, cabbage, brussel sprout, beet, parsnip, turnip, cauliflower, broccoli, turnip, radish, spinach, onion, garlic, eggplant, pepper, celery, carrot, squash, pumpkin, zucchini, cucumber, apple, pear, melon, citrus, strawberry, grape, raspberry, pineapple, soybean, tobacco, tomato,
20 sorghum, papaya, sugarcane, and coffee.

[0052] A further aspect of the present invention is directed to a method of degrading mannans and polysaccharides in plant material. This method involves providing plant material and contacting the plant material with the β -mannanase protein of the present invention under conditions effective to degrade mannans and
25 polysaccharides in the plant material.

[0053] In a preferred embodiment, the plant material which is contacted with the β -mannanase protein of the present invention is coffee beans, although other plant materials where degradation of mannans and polysaccharides is desired may also be contacted.

30 [0054] It may also be desirable, pursuant to this method of the present invention, to recover soluble sugars from the degraded plant material, particularly those that result from the step of contacting the plant matter with the β -mannanase protein.

26

[0055] These aspects of the present invention are further illustrated by the examples below.

EXAMPLES

- 5 [0056] The following examples are provided to illustrate embodiments of the present invention, but they are by no means intended to limit its scope.

Example 1 - β -Mannanase Cloning from Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) Midgut

10

Sample Preparation

- [0057] Coffee seeds were infected with adult insects of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) as described in Rubio et al., "Morfologia Del Sistema Digestivo de *Hypothenemus hampei* (Ferrari)," *Cenicafe (Columbia)* 58:66-74 (2007),
- 15 which is hereby incorporated by reference in its entirety. Briefly, infected coffee beans were dissected using a stereomicroscope and the larvae were collected in a Petri dish. Each larva was stored at 4°C for at least 10 minutes to decrease physical activity and then placed in a glass slide with a drop of sterile distilled water and dissected under a Zeiss Estemi 2000 stereomicroscope using small forceps and
- 20 0.15 mm teasing needles. In order to isolate the midgut tissue, each larva was dissected with an incision at the prothorax and the mesothorax level, then a large incision along the larvae length to expose all the alimentary canal. Finally, after the removal of fat tissue, the midgut region was dissected and immediately deposited into
- 25 0.1% RNA Later™ reagent. All the dissected midgut tissues were stored at -80°C until protein and RNA extraction.

Coffee Berry Borer YSST Library Construction

- [0058] RNA was extracted from the midgut tissues and stored at -80°C.
- 30 Polyadenylated RNA was isolated from the total RNA using Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The first-strand cDNA were synthesized from mRNA using N6-*NotI* primer:

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

with a cDNA Synthesis Kit (Stratagene). After second-strand synthesis, the cDNAs were prepared for unidirectional cloning by ligation with *EcoRI* adapters according to the manufacturer's instructions, followed by *NotI* digestion. The cDNAs were then fractionated on a 1% agarose gel by electrophoresis and those within an estimated size range of 300-1,000 bp excised from the gel and purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). The fragments were ligated to an equipartite mixture of the three vectors, PYSST0, pYSST1, and pYSST2, digested with *EcoRI* and *NotI*. Electrocompetent TOP10F' *Escherichia coli* cells (Invitro, Carlsbad, CA) were transformed with approximately 1 µg of the resulting YSST library by electroporation (Micropulser Electroporator, Bio-Rad, Hercules, CA) and spread on 10-15 large LB plates. Plasmid DNA was isolated from a pooled sample of the resulting transformants using the Perfectprep Plasmid Midi kit (Eppendorf). Fifty micrograms of the YSST library was transformed into the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain DBYα2445 (*MATα*, *suc2Δ-9*, *lys2-801*, *ura3-52*, *ade2-101*) using the YEASTMAKER Yeast Transformation System2 (BD Biosciences, San Jose, CA). Transformants were spread on YP sucrose plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% sucrose, 2% agar, pH 6.5), incubated at 30°C for 4-9d, and visible colonies were re-streaked on sucrose plate followed by incubation at 30°C for 2-3d. Plasmids were isolated from visible colonies as described in Hoffmann and Winston, "A Ten-Minute DNA Preparation from Yeast Efficiently Releases Autonomous Plasmids for Transformation of *Escherichia coli*," *Gene* 57:267-272 (1987), which is hereby incorporated by reference in its entirety, transformed into XL1-blue electrocompetent *E. coli*, and purified using a Qiaprep kit (Qiagen). Plasmid inserts were sequenced using a primer corresponding to ADH1 promoter of pYSST0, pYSST1, pYSST2 (5'-TCCTCGTCATTGTTCTCGTTCC-3') (SEQ ID NO:5) at the Bio Resource Center, Cornell University, Ithaca, NY (<http://www.brc.cornell.edu>).

30 RACE Amplification

[0059] An oligonucleotide primer derived from the DNA sequence corresponding to the predicted signal sequences of isolated mannanase YSST clone

was used in 3'RACE with the primer as an adapter primer. To obtain the full-length cDNA sequence, 'touchdown' PCR was performed using a program with 35 cycles of 94°C for 1 min, 63°C for 1 min, 72°C for 2.5 min with the annealing temperature decreasing by 1°C every second cycle to 60°C, followed by final extension of 72°C for 10 min. The PCR products were subcloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI). DNA sequences were determined as describes *supra*. β -mannanase from *H. hampei* is an endoglycanase (endo- β -1,4-D-glucanase, EC 3.2.1.4). It is a single polypeptide chain of 320 aminoacids, with a predicted molecular mass of 35.62 kDa and the theoretical pI is 4.72, calculated from amino-acid composition.

Example 2 - Heterologous Expression of β -mannanase in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Cells

Construction of Fusion Protein Expression Plasmid

[0060] For the construction of C-terminal Mannanase-HIS-tagged expression plasmid, the cDNAs were reamplified by PCR using a mannanase cDNA in pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI) as a template with the following primers:

5'-CACCATGGAACCTTTTGTGGTC-3' (SEQ ID NO:6) and

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

The underlined portion of SEQ ID NO:6 was introduced for directional TOPO cloning. The latter reverse primer lacks the stop codon in the native β -mannanase cDNA. The resulting cDNA was cloned into pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and designated pENTR/ β -Mann.

DNA Baculovirus Recombination and Transfection

[0061] Baculovirus construction and protein expression in Sf9 cells were performed according to the BaculoDirect Baculovirus Expression System protocol from Invitrogen (Carlsbad, CA). *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells were transfected with recombinant bacmid DNA for production of the baculovirus particles. Cells were cultured at 27°C in SF900-II medium (Life Technologies) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. For transfection, 9×10^5 cells were

plated in 35-mm tissue culture flasks and incubated for 1 h in 2 ml Sf900-II SFM (Life Technologies) without antibiotics to allow adhesion of the cells to the dish. The medium was then changed to 1 ml serum-free Sf900-II without antibiotics, containing recombinant bacmid DNA (5 µl of a standard mini-preparation of plasmid DNA) that had been pre-incubated for 30 min at room temperature with CellFectin (6 µl) (Life Technologies). Cells were incubated with the liposome-DNA complex at 27°C for 5 h. The transfection medium was removed and 2 ml of SF900-II medium, containing antibiotics, was added. pENT™/Man plasmid was transfected into Sf9 cells and nonrecombinant bacmid (Bd) DNA and pENT™/CAT were used as, respectively, negative and positive controls. Transfected cells were incubated at 27°C for 72 h allowing baculovirus production and release into the culture medium. The culture medium from each transfection was collected, clarified (500 g for 5 min), and stored at 4°C as a master virus stock. Transfection efficiency, recombinant baculovirus (Bv-Man) and nonrecombinant baculovirus (Bv) production were monitored by visualization of the cytopathic effect displayed by transfected cells within 48 h after subculturing under a phase contrast microscope and assaying the presence of baculovirus DNA through PCR analysis. To this end, baculovirus present in 50 µl of infected culture supernatant was sedimented at 12 000 g for 10 min in a microcentrifuge tube, and a volume (25 µl) of proteinase K buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA; 0.5% SDS) containing 50 µg/ml of proteinase K (Sambrook *et al.*, 1989) was added to the pellet to digest viral proteins for 1 h at 56°C. An additional heating at 95°C for 20 min was included in order to inactivate the enzyme before proceeding to the PCR step. Viral DNA amplification was carried out using 2 µl of this DNA preparation as the template at the same conditions and primers described above. The cells were selected with ganciclovir for 120 hours, and the resulting viral stock was amplified twice by infecting the Sf9 cells.

Amplification of Baculovirus Stocks

[0062] For amplification of the baculovirus master stocks, 1×10^6 Sf9 cells were plated in a 25-cm² flask and incubated for 1 h with 10 µl of baculovirus master stock in 1 ml of SF900-II medium containing antibiotics (corresponding to an MOI of 0.01–0.1). After this period, the medium was completed to 4.5 ml and the infected

cells were incubated for 48 h at 27°C. The culture medium was collected, clarified (500 g for 5 min), and stored at 4°C as viral stocks for recombinant protein production.

5 **Scale up production of recombinant β -mannanase**

- [0063] Cells of *S. frugiperla* were plated in a 225 cm² with 50 ml of culture medium and incubated as above. Cells were transfected at log phase using 500 μ L of a viral stock P3 (titer 3.44×10^6 pfu/ml). After 96 hours, the culture medium was collected, clarified (500 g for 5 min), and the recombinant β -mannanase was purified
- 10 using the MagneHis System[®] (Promega, Madison, WI). This resulted in the production of 2.4 mg of purified β -mannanase per 100 ml of culture.

Example 3 - Purification of Recombinant β -Mannanase

- 15 [0064] MagneHis Ni-Particles[®] (Promega, Madison, WI) pull-down assays were performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10 ml of culture medium after removing cells was mixed with 300 μ L of MagneHis Ni-Particles[®] and incubated at room temperature for 2 min with gentle shaking. After incubation, the tube was placed in a magnetic stand for 30 seconds to allow the MagneHis Ni-
- 20 Particles[®] to be captured by the magnet, and the supernatant was removed. The MagneHis Ni-Particles[®] were washed three times with the binding/wash buffer. Pure β -mannanase-6xHis-tagged protein was subjected to SDS/PAGE (Figure 1) and functional assay (Figure 2).

25 **Example 4 - Determination of Enzyme Activity Using β -Galactomannans from Carob Tree Seeds**

- [0065] Azurine-crosslinked-Galactomannan was prepared by dyeing and crosslinking galactomannan polysaccharide extracted from carob seed flour (AZCL-galactomannan[®]; Megazyme International Ireland Ltd.). The Carob tree, *Ceratonia siliqua*, is an evergreen shrub or tree, native to the Mediterranean region, cultivated for its edible seed pods. This substrate is insoluble in buffered solutions, but rapidly hydrates to form gel particles which are readily and rapidly hydrolysed by specific
- 30

endo-hydrolases releasing soluble dye-labeled fragments according to Marraccini et al., "Molecular and Biochemical Characterization of ENDO- β -MANNANASEs from Germinating Coffee (*Coffea arabica*) Grains," *Planta* 213:296-308 (2001), which is hereby incorporated by reference in its entirety. An aliquot of 20 μ L of the

- 5 recombinant β -mannanase-6xHis-tagged protein mixed in substrate solution [1% (w/v) AZCL-galactomannan[®] in 0.2 M acetate buffer (pH 5.0)] was incubated at 37°C with gentle shaking. Aliquots of 200 μ L were removed every 30 min and heated at 100°C for 5 min to stop the reaction. Each aliquot was centrifuged at 13k rpm for 5 min and the absorbance was measured at λ_{595} nm (Figure 2).

10

Example 5 - Determination of Enzyme Activity Using β -Galactomannan from Coffee Beans

Coffee β -Galactomannan Purification

- 15 [0066] A sequential fractionation procedure based on a delignification treatment, an acid wash, and subsequent alkali extraction (as in Bradbury et al., "Chemical Structures of Green Coffee Bean Polysaccharides," *J. Agric. Food Chem.* 38:389-392 (1990), which is hereby incorporated by reference in its entirety) was used to isolate pure β -mannan from green coffee beans. Ground green *Coffea arabica*
- 20 coffee beans were Soxhlet-extracted with chloroform/methanol (2:1) and petroleum ether (5h) to remove lipids and with aqueous ethanol (95%, overnight) to remove low molecular weight carbohydrate. Defatted beans were hot water extracted and then delignified with weakly acidic sodium chloride solution, according to the method of Wolfrom and Patin, "Carbohydrates of the Coffee Bean. IV. An Arabinogalactan," *J.*
- 25 *Org. Chem.* 30:4060-4063 (1965), which is hereby incorporated by reference in its entirety, to give a white holocellulose product. Most of the arabinogalactan polymer was solubilized, in a partially hydrolyzed form, by washing with dilute hydrochloric acid (1%, 80°C). The mannan was then isolated in discrete fractions by extraction (overnight, 4°C) with 2.5 and 10% sodium hydroxide solutions. Addition of ethanol
- 30 to the 2.5% NaOH extracts led to a precipitate containing arabinogalactan and mannan. Neutralization of the 10% NaOH extracts led to rapid formation of a white precipitate, which was removed by filtration after the mixture was allowed to stand overnight at 4°C. A further fraction was obtained by addition of ethanol to the

42

filtrate. The precipitates were all washed with ethanol and diethyl ether before drying. The mannan substrate used in this work was the fraction precipitated by neutralization of the 10% NaOH extracts, which contained 94% mannan by weight.

5 **Effect of pH and Temperature on the Activity of the Recombinant β -Mannanase from *H. hampei***

[0067] In order to test enzyme activity against coffee galactomannans, the β -mannanase activity was determined by the dinitrosalicylic acid assay of Bernfeld, P. In: Colowick S.P. and Kaplan N.O. (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press, New York, pp. 149-158 (1955), which is hereby incorporated by reference in
10 its entirety. The optimal pH of the enzyme activity against coffee galactomannan was determined at different pH values ranging from 4.0 to 11.0. The buffer was 200 mM sodium-acetate and 100 mM Sodium chloride at 37°C. The highest enzyme activity was observed at pH 6.0 (Figure 3). The effect of temperature on activity of the
15 recombinant β -mannanase against coffee galactomannan was examined in the temperature range of 15°C to 70°C using the same buffer at pH 6.0 (Figure 4). The enzyme showed maximum activity around 50°C. The activity of the enzyme decreased sharply with further increases in temperature.

[0068] Although the invention has been described in detail for the purpose of
20 illustration, it is understood that such detail is solely for that purpose, and variations can be made therein by those skilled in the art without departing from the spirit and scope of the invention which is defined by the following claims.

yB

WHAT IS CLAIMED:

1. An isolated β -mannanase protein having an amino acid sequence which is 90% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
2. The isolated β -mannanase protein of claim 1, wherein the protein has an amino acid sequence which is 95% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
3. The isolated β -mannanase protein of claim 1, wherein the protein has an amino acid sequence which is 99% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
4. The isolated β -mannanase protein of claim 1, wherein the protein has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
5. An isolated polynucleotide encoding the β -mannanase protein of claim 1.
6. The isolated polynucleotide of claim 5, wherein the polynucleotide encodes a protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
7. The isolated polynucleotide of claim 5, wherein the polynucleotide has a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 2.
8. An isolated expression system containing the polynucleotide of claim 5.
9. An isolated host cell containing the polynucleotide of claim 5.

cpd

10. The host cell of claim 9, wherein the host cell is selected from the group consisting of plant cells, insect cells, bacterial cells, and other eukaryotic cells.

11. A method of recombinantly producing β -mannanase protein, said method comprising:

providing the host cell of claim 9;

culturing the host cell under conditions effective for the host cell to express β -mannanase protein; and

recovering the β -mannanase protein.

12. A method of degrading mannans and polysaccharides in plant material, said method comprising;

providing plant material and

contacting the plant material with the β -mannanase protein of claim 1 under conditions effective to degrade mannans and polysaccharides in the plant material.

13. The method of claim 12, wherein the plant material is coffee beans.

14. The method of claim 12 further comprising:

recovering soluble sugars from the degraded plant material, resulting from said contacting the plant matter with the β -mannanase protein.

af

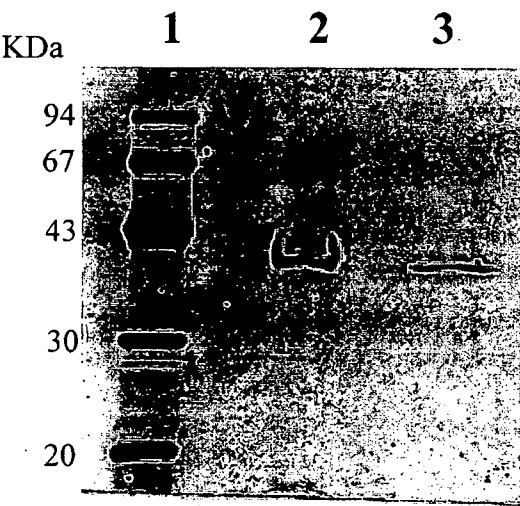


Figure 1

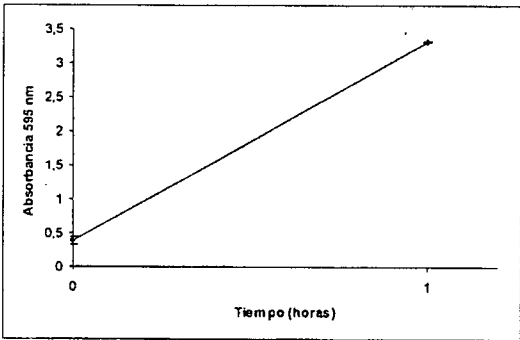


Figure 2

up

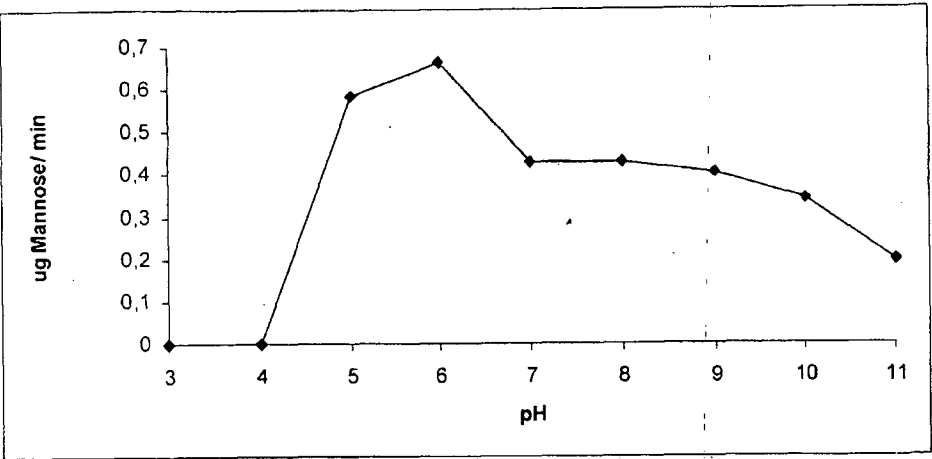


Figure 3

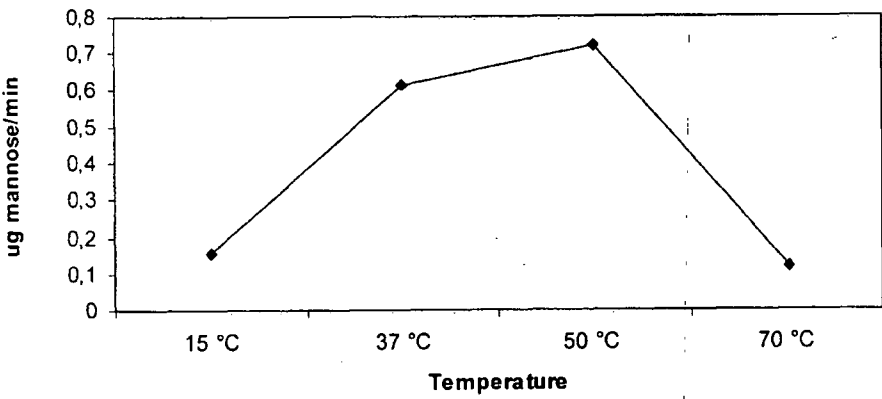


Figure 4

BETA-MANANASA DE LA BROCA DEL CAFÉ, HYPOTHENEMUS HAMPEI, Y USOS DE LA MISMA

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional U.S. No. 60/866,705 presentada el 21 de noviembre de 2006, incorporada en su totalidad en la presente como referencia.

CAMPO DEL INVENTO

Este invento se relaciona con una proteína β -mananasa aislada y usos de la misma.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

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

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

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

En procesos industriales, durante el tratamiento del café, los mananos y sus derivados constituyen una porción considerable de los sedimentos insolubles. Adicionalmente, en el primer paso de extracción durante la producción del café solamente un 50% aproximadamente de los mananos son solubles y estos polímeros por lo tanto son responsables de la mayoría de las precipitaciones secundarias que ocurren durante los pasos subsiguientes. La Patente Europea No.

0676145A demuestra que es posible hidrolizar galactomananos del café usando una mananasa inmovilizada extraída del *Aspergillus niger*.

El presente invento está relacionado con el intento de solucionar estas y otras limitaciones en el estado de la técnica.

RESUMEN DEL INVENTO

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto del pH sobre la actividad de la β -mananasa recombinante del *H. hampei*, según el presente invento. El amortiguador era 200 mM acetato de sodio pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

yd

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

5

SECUENCIAS p. 4

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

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

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

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

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

Asn

10

El presente invento también está relacionado con proteínas aisladas de β -mananasa con una secuencia de aminoácidos la cual es por lo menos un 90% similar, por lo menos un 91% similar, por lo menos un 92% similar, por lo menos un 93% similar, por lo menos un 94% similar, por lo menos un 95% similar, por lo menos un 96% similar, por lo menos un 97% similar, por lo menos un 98% similar, y/o por lo menos un 99% similar a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

15

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

gctgatcggg tgtgtactca attctttaag gagtttacia tatgaccgct gatacattaa 60
 cgcgggcact gctgctgttg ctgttggtgc gcgctgctgc tgcgtgtacc ggattcacgg 120
 tttccggtac tcgaatttta gatgctaacg gtcaggaatt tatgataaga ggggtcagtc 180
 acgcacatac ctggtataag gatgatatta atggggccat cacatccatc gctgctgctg 240
 gcgccaacac ggcttcgcatt gtactttcta atggcggaca gtggacaaaa gacaacctgg 300
 attcagttca gaacattctg tccctctgtg agagccataa gcttattgcc atgctggaag 360
 ttcacgatgc caccggcaat gacagccaag aaacactgga aaatgccgtg aattactgga 420
 aagagcttcg ggacttgctc attggtaagg aagacagagt tattatcaat atagccaatg 480
 agtggttcgg tacctgggat actgctggct gggccgacgg ttataaagtt gtcattccgg 540
 aactacgtaa cgcgggactg gaacacctgc tgggtgtaga cacagcggga tacggacaat 600
 atcctcaagc tatttttgaa aaaggtaagg aggttttcca gacagacctt cttgcccgca 660
 cgggtgttttc cattcacatg tatgaatatg cagcgacgga tgtaacaatg ataaaaggaa 720
 atattgactc ggccttgaat acaggcatcc cggtgattat tggagaattt ggtgaccgaa 780
 aaccggagtc gcagcatggt gatatcgata ccatcatgag ctacactcgc gagaaatccg 840
 taggetggtt ggcctggctc tggtaggta acggtaacga tgaatcaatt cttgacctga 900
 cgaacggacc tagcggagat tacagtctta ctaacgtggg gagtcaaatt gttgacagtg 960
 agaacggcat tcgcaaaacc tccacaatct gttcaatatt caattaaaaa aaaagatggt 1020
 tgtttggtca tttttgttat aataaacggt tcatttgcatt att 1063

Los polinucleótidos aislados con una similitud de por lo menos un 90%, una similitud de por lo menos un 91%, una similitud de por lo menos un 92%, una similitud de por lo menos un 93%, una similitud de por lo menos un 94%, una similitud de por lo menos un 95%, una similitud de por lo menos un 96%, una similitud de por lo menos un 97%, una similitud de por lo menos un 98%, y/o una similitud de por lo menos un 99% a la SEQ ID NO:2 también son contemplados por el presente invento.

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

atggttgagt tcaccaatca agaatatgca gacatgcatt tgatttatgg ccaagccaat 60
 ggcaattcct acgaagcgcg cagactctac gcacgtagat atcctaatacg gagactacct 120
 gatccaaaaa catttccaaa tattcacatt cgactatgtg aaactggaac atataaacag 180
 ttcagtggtt tcgaaggagt acatcaaate gcgagaactc cagaaatcga agaagccgtt 240
 ctaaatagtg ttgaagccga tcctgctacg agcacaagga aaattgcaat aacattgaac 300
 atttcattta tgcttgtctg aagaattctg actgataacc ttttgtatcc ttaccacctt 360
 acaagggttc aagctcttct cccacgagac tttcctttag gcgtaaattt ttgcgagtag 420
 ttottacaaa tgctggctca aaatccgtcg tttgcatcgt ttgcgtcgtt ttgtttattt 480
 tttttacgga tgaagcaaat ttttcaagaa attccatccg aaattttcat aatgaacatt 540
 tttggggaga agaaaatcca catttagtac gagaaaacaa ttttcaacat caattttctg 600
 tcaacgtttg ggcaggaatt attggcgatt atttaatagg accatttttt ctgtcgaaga 660
 ggttgaatgg tggctattat catcggtttt tcgaagagga acttcccgtc ctttttagatg 720
 aggtaccgct tcttttgaga aaccaaattg ggctaattgca cgatgggtgc ccagtccatt 780
 ttagtcggga agtaaggag ttctaaatg aacattatca caaccgttg attgatcgag 840
 ggggaactca gtcattggccc ccgaggtccc cggacctgaa tagtctggat ttttttttct 900
 agggacatct caaatccttg gtgtaccaa cccaattaa cacagtggag gaattgcgaa 960

SECUENCIAS p. 7-11

tatctaogtt tgtaccatgt tgtggtaact cactcaactt agttggaaag gcagctgcta 10020
 actottgtgc atcggcagtt caattctttg atttcgttca gaatttatat acgtttttta 10080
 cagcaagtac acaacgatac cgaattctgt ctgaaaaatt atcagagaaa aaaagcggac 10140
 agtcatatgt tttaaaaaat cttagcgata ctgctgggtc atgtaggggt gcagccacga 10200
 aggccattgt tatgggatat tctgaaatcg aagaagctct aaccagcata tcttctgata 10260
 aggaacagaa agat 10274

5 La determinación de la identidad porcentual, es decir la similitud de secuencias, entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias nucleótidas puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin et al., "Métodos para evaluar el significado estadístico de las características de secuencias moleculares usando esquemas de valoración general", Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2264-2268 (1990), incorporada en su totalidad en la presente como referencia, modificado en Karlin et al., "Aplicaciones y Estadística para Segmentos múltiples de alta valoración en secuencias moleculares", Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873-5877 (1993), incorporada en su totalidad en la presente como referencia. Otro ejemplo

52

no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Myers et al., CABIOS (1989). Tal algoritmo puede incorporarse en el programa ALIGN (versión 2.0) parte del paquete de software de alineación de secuencias CGC. Se conocen en el estado de la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias e incluyen por ejemplo ADVANCE y ADAM tal como lo describe Torellis et al., "ADVANCE y ADAM: Dos algoritmos para el análisis de similitud global entre secuencias homólogas informativas", Comput. Appl. Biosci. 10:3-5 (1994), incorporada en su totalidad en la presente como referencia, y FASTA descrito en Pearson et al., "Herramientas mejoradas para la comparación de de secuencias biológicas", Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448 (1988), incorporada en su totalidad en la presente como referencia.

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

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

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

La síntesis química también puede usarse para fabricar fragmentos adecuados. Tal síntesis es llevada a cabo usando secuencias aminoácidas conocidas para la proteína siendo producida. De manera alterna, someter la proteína de β -mananasa de longitud completa del presente invento a altas temperaturas y presiones produciría fragmentos. Estos fragmentos pueden luego ser separados mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, cromatografía, SDS-PAGE).

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

La proteína del presente invento es preferiblemente producida en forma purificada (preferiblemente por lo menos un 80% de pureza aproximadamente, más preferiblemente un 90%

59

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

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

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

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

Mejoras adicionales de esta técnica conllevó al desarrollo del sistema binario de vectores (Bevan, "Vectores Binarios de *Agrobacterium* para Transformación Vegetal", Nucleic Acids Res.

12:8711-8721 (1984), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia). En este sistema, todas las secuencias de ADN-T (incluyendo las fronteras) son removidas del pTi, y un segundo vector que contiene ADN-T es introducido en el *Agrobacterium tumefaciens*. Este segundo vector tiene la ventaja de ser replicable en *E. coli* como también *Agrobacterium*

5 *tumefaciens*, y contiene un sitio multiclonal el cual facilita la clonación de un transgén. Un ejemplo de un vector comúnmente usado es el pBin19 (Frisch et al., "Secuencia completa del Vector Binario Bin19", Plant Molec. Biol. 27:405-409 (1995), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia). Cualquier vector apropiado conocido ahora o descrito más adelante para la transformación genética es adecuado para ser usado con el presente invento.

10 Los vectores adecuados para llevar a cabo el presente invento también podrán incluir, pero no están limitados a los siguientes vectores virales tales como el sistema vector lambda gt11, gtWES.tb, Charon 4, y vectores de plásmido tales como el pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pKC37, pKC101, SV40, pBluescript II SK +/- ó KS +/- (ver catálogo "Stratagene Cloning Systems" (1993), el cual está

15 incorporado en su totalidad en la presente como referencia), pQE, pIH821, pGEX, pET series (Studier et al., "Uso de la T7 ARN polimerasa para expresión directa de genes clonadas", Métodos de Enzimología 185:60-89 (1990), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia), y cualquier derivado de los mismos.

20 La Patente U.S. No. 4,237,224 otorgada a Cohen y Boyer, la cual está incorporada en su totalidad en la presente como referencia, describe la producción de los sistemas de expresión en forma de plásmidos recombinantes utilizando cortes con enzimas de restricción y ligados con ADN ligasa. Estos plásmidos recombinantes luego son introducidos por medio de transformación y replicados en cultivos unicelulares incluyendo organismos procarióticos y células eucarióticas cultivadas en cultivo tisular.

25 Una gama de sistemas huésped-vector pueden utilizarse para expresar la(s) secuencia(s) codificadoras de proteínas del presente invento. Principalmente, el sistema de vectores debe ser compatible con la célula hospedera (huésped) usada. Los sistemas huésped-vector incluyen pero no se limitan a los siguientes: bacterias transformadas con ADN de bacteriófagos, ADN de plásmidos, o ADN de cósmidos; microorganismos tales como las levaduras que contienen

30 vectores de levaduras; sistemas celulares mamíferos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); y células vegetales infectadas con bacterias. Los elementos de expresión de estos vectores varían en su resistencia y sus especificidades. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, cualquier elemento de transcripción o de traducción puede ser usado.

35 La proteína según el presente invento puede ser incorporada dentro de un vector adecuado en dirección de sentido, de tal manera que el marco de lectura abierta esté adecuadamente orientado para la expresión de la proteína codificada bajo control de un promotor de escogencia. Esto involucra la inclusión de los elementos regulatorios adecuados dentro del constructo ADN-vector. Estos incluyen regiones no traducidas del vector, promotores útiles, y regiones no traducidas 5' y 3' las cuales interactúan con proteínas celulares hospederas para llevar a cabo la

40 transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Dependiendo del sistema vectorial y el huésped utilizado, cualquier elemento adecuado de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, pueden ser usados.

45 Un promotor constitutivo es un promotor que orienta la expresión de un gen a través del desarrollo y vida de un organismo. Ejemplos de algunos promotores constitutivos ampliamente utilizados para inducir la expresión de transgenes incluyen el promotor del gen nopalina sintasa (NOS) del *Agrobacterium tumefaciens* (Patente U.S. No. 5,034,322 otorgada a Rogers et al., la cual está incorporada en su totalidad en la presente como referencia), los promotores 35S y 19S

del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Patente U.S. No. 5,352,605 otorgada a Fraley et al., la cual está incorporada en su totalidad en la presente como referencia), aquellos derivados a partir de cualquiera de los distintos genes de actina, los cuales son reconocidos por expresarse en la mayoría de tipos celulares (Patente U.S. No. 6,002,068 otorgada a Privalle et al., la cual está incorporada en su totalidad en la presente como referencia), y el promotor de la ubiquitina, el cual es un producto génico conocido por acumularse en muchos tipos de células.

Un promotor inducible es un promotor el cual es capaz de activar de manera directa o indirecta la transcripción de una o más secuencias de ADN en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias de ADN o genes no serían transcritos. El inductor puede ser un agente químico, como por ejemplo un metabolito, un regulador del crecimiento, un herbicida, un compuesto fenólico, o un estrés fisiológico directamente impuesto sobre la planta tal como el frío, calor, sal, toxinas, o por medio de un patógeno o agente de enfermedad como por ejemplo un virus u hongo. Una célula vegetal que contiene un promotor inducible puede estar expuesta a un inductor al aplicar externamente el inductor a la célula o planta como por ejemplo mediante una atomización, riego, calentamiento, o mediante exposición al patógeno operativo. Un ejemplo de un promotor inducible adecuado para uso en el presente invento es un promotor inducible con glucocorticoide (Schena et al., "Un Sistema de Expresión Génico Inducible con Esteroides para Células Vegetales", Proc. Natl. Acad. Sci. 88:10421-5 (1991), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia). La expresión de la proteína codificada con transgenes es inducida en las plantas transformadas cuando las plantas transgénicas entran en contacto con concentraciones nanomolares de un glucocorticoide, o al entrar en contacto con dexametasona, un análogo glucocorticoide (Schena et al., "Un Sistema de Expresión Génico Inducible con Esteroides para Células Vegetales", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-5 (1991); Aoyama et al., "Un Sistema de Inducción de la Transcripción mediada por glucocorticoides en plantas transgénicas", Plant J. 11:605-612 (1997), y McNellis et al., "Expresión Inducible por Glucocorticoides de un Gen de Avirulencia Bacteriana en Arabidopsis induce Muerte celular por hipersensibilidad", Plant J. 14(2):247-57 (1998), los cuales están incorporados en su totalidad en la presente como referencia). Adicionalmente, los promotores inducibles incluyen promotores que funcionan de manera específica para tejidos para así regular el gen de interés entre tejidos seleccionados de una planta. Ejemplos de tales promotores específicos para tejidos o regulados en el desarrollo incluyen aquellos promotores específicos para semillas, flor, fruta o raíz bien conocidos en el estado de la técnica (Patente U.S. No. 5,750,385 otorgada a Shewmaker et al., la cual está incorporada en su totalidad en la presente como referencia). En la realización preferida del presente invento, un promotor heterólogo es enlazado al ácido nucleico del constructo, en donde "promotor heterólogo" es definido como un promotor al cual el ácido nucleico del constructo no está unido en la naturaleza.

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

El vector de escogencia, el promotor y la adecuada región regulatoria 3' pueden ligarse entre si para producir el constructo de ADN del presente invento usando técnicas de clonación molecular bastante conocidas según se describen en Sambrook et al., Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press, NY (1989), y Ausubel, F.M. et al., Protocolos Actuales en Biología Molecular, New York, N.Y: John Wiley & Sons, (1989), los cuales están incorporados en su totalidad en la presente como referencia.

56

La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de los adecuados elementos mejoradores de la transcripción o traducción (por ejemplo, elementos divulgados en Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:516 (1987), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia). Adicionalmente, la secuencia génica puede ser modificada para un

Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede contener secuencias nucleótidas adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión recombinante puede codificar un gen marcador seleccionable para identificar células hospederas que hayan incorporado el vector. Además, para facilitar la secreción de la proteína a partir de una célula hospedera, el vector de expresión recombinante puede codificar una secuencia de señal enlazada al extremo amino de la proteína, de tal manera que al expresarse, la proteína es sintetizada con la secuencia de señal fusionada sobre su extremo amino. Esta secuencia señal dirige la proteína hacia la vía secretora de la célula y luego es usualmente cortada, permitiendo así la liberación de la proteína sin la secuencia señal desde la célula hospedera. El uso de una secuencia señal para facilitar la secreción de proteínas o péptidos a partir de células hospederas mamíferas es bastante conocido en el estado de la técnica.

Una vez preparado un sistema de expresión que contenga un polinucleótido según el presente invento, está listo para incorporarse en una célula hospedera. Básicamente, este método puede llevarse a cabo mediante la transformación de una célula hospedera con el sistema de expresión del presente invento bajo condiciones efectivas para darse la transcripción de la molécula de ADN en la célula hospedera. Las moléculas recombinantes pueden introducirse dentro de las células por medio de transformación, particularmente transducción, conjugación, movilización, o electroporación. Las secuencias de ADN son clonadas dentro de la célula hospedera usando procedimientos de clonación estándares conocidos en el estado de la técnica, según se describe en Sambrook et al., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press, NY (1989), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia. Células hospederas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a bacterias, virus, levaduras, células mamíferas, insectos, plantas, y similares. Los métodos de transformación pueden resultar en una expresión transitoria o estable del ácido nucleico bajo el control del promotor. En una realización, un constructo de ácido nucleico del presente invento es insertado de manera estable dentro del genoma de la célula vegetal recombinante como resultado de la transformación, aunque una expresión transitoria puede ser importante, particularmente cuando la planta siendo investigada es de crecimiento lento.

Los tejidos vegetales adecuados para una transformación incluyen los tejidos de follaje, tejidos de raíces, meristemos, embriones cigóticos y somáticos, callos, protoplastos, borlas, polen, embriones, anteras y similares. El medio de transformación escogido es aquel que es más adecuado para el tejido que va sufrir la transformación.

La expresión transitoria en tejido vegetal usualmente se logra mediante bombardeo con partículas (Klein et al., "Micro-proyectiles de alta velocidad para distribuir ácidos nucleicos en células vivas", *Nature* 327:70-73 (1987), el cual está incorporado en su totalidad como referencia). En este método, micropartículas de tungsteno y oro (entre 1 y 2 μm de diámetro) son revestidas con el ADN de interés y luego bombardeadas sobre el tejido usando gas altamente presurizado. De esta manera, es posible distribuir ADN foráneo dentro del núcleo y obtener una expresión temporal del gen bajo las condiciones actuales del tejido. También pueden distribuirse de manera propelente dentro de células vegetales partículas biológicamente activas (como por

ejemplo, células bacterianas secas que contienen el vector y el ADN heterólogo). Otras variaciones del bombardeo de partículas conocidas actualmente o desarrolladas posteriormente podrán ser utilizadas.

Un método adecuado para introducir de manera estable el constructo de ácido nucleico dentro de células vegetales es el de infectar una célula vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* previamente transformados con el constructo de ácido nucleico. Como se describió anteriormente, el plásmido Ti (ó RI) del *Agrobacterium* permite la transferencia altamente exitosa de una molécula de ácido nucleico foráneo hacia células vegetales. Otro enfoque con respecto al de transformar células vegetales con un gen el cual otorga resistencia a patógenos es el bombardeo de partículas (también conocido como transformación biolística) de la célula hospedera, según se divulga en las Patentes U.S. Nos. 4,945,050, 5,036,006 y 5,100,792, todas otorgadas a Sanford et al., y en Emershad et al., "Embriogénesis somática y desarrollo vegetal a partir de embriones cigóticos inmaduros de uvas sin semillas (*Vitis vinifera*)", Plant Cell Reports 14:6-12 (1995), los cuales están incorporados en la presente en su totalidad como referencia. Aún otro método de introducción es la fusión de protoplastos con otros elementos, bien sea minicélulas, células, lisosomas, u otros cuerpos fusionables de superficie lipídica (Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79:1859-63 (1982), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia). La molécula de ácido nucleico también ser introducida en células vegetales mediante la electroporación (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:5824 (1985), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia). En esta técnica, los protoplastos vegetales son electroporados en presencia de plásmidos que contienen el casete de expresión. Impulsos eléctricos de alta intensidad del campo permeabilizan de manera reversible las biomembranas permitiendo así la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales electroporados reforman la pared celular, se dividen y se regeneran. El método preciso de transformación no es crítico para la práctica del presente invento. Cualquier método que resulte en una transformación eficiente de la célula hospedera de escogencia es adecuado para la práctica del presente invento.

Luego de la transformación, las células vegetales transformadas deben regenerarse. La regeneración vegetal a partir de protoplastos cultivados está descrito en Evans et al., Manual de Cultivos Celulares Vegetales, Vol. I: (MacMillan Publishing Co., New York, 1983); Vasil I.R. (ed.), Cultivo Celular y Genética Vegetal de Células Somáticas, Acad. Press, Orlando, Vol. I, 1984, y Vol. III (1986), y Fitch et al., "Embriogénesis somática y regeneración vegetal a partir de embriones cigóticos inmaduros de la papaya (*Carica papaya* L.)", Plant Cell Rep. 9:320 (1990), los cuales están incorporados en la presente en su totalidad como referencia.

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

Preferiblemente, las células transformadas son primero identificadas usando un marcador de selección introducido de manera simultánea dentro de las células hospederas junto con el constructo de ácido nucleico del presente invento. Los marcadores de selección adecuados incluyen, sin limitación, marcadores que codifican para resistencia antibiótica, como por ejemplo

54

el gen nptII el cual confiere resistencia a la kanamicina (Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:4803-4807 (1983), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia), y los genes que confieren resistencia a la gentamicina, G418, higromicina, estreptomycin, espectinomycin, tetraciclina, cloramfenicol, y similares. Las células y tejidos son cultivados sobre un medio de selección que contiene el antibiótico apropiado, en donde por lo general solamente aquellos transformantes que expresen el marcador de resistencia antibiótica continúen creciendo. Otros tipos de marcadores también son adecuados para su inclusión en el casete de expresión del presente invento. Por ejemplo, un gen que codifique una tolerancia a los herbicidas, como por ejemplo una tolerancia a la sulfonilurea es útil, o el gen dhfr, el cual confiere resistencia a la metotrexato (Bourouis et al., EMBO J. 2:1099-1104 (1983), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia). De manera similar, los "genes reporteros" que codifican para enzimas que dan para la producción de un compuesto identificable son adecuados. El gen reportero más ampliamente usado para experimentos de fusión génica ha sido el uidA, un gen de la Escherichia coli que codifica la proteína β -glucuronidasa, también conocida como GUS (Jefferson et al., "Fusiones GUS: β -glucuronidasa como marcador de fusión génica sensible y versátil en plantas más desarrolladas", EMBO J. 6:3901-3907 (1987), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia). De manera similar, aquellas enzimas que dan para la producción de un compuesto identificable por luminiscencia, como por ejemplo la luciferasa, son útiles. El marcador de selección empleado dependerá de la especie diana; para ciertas especies diana, se prefieren diferentes antibióticos, herbicidas o marcadores de selección de biosíntesis.

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

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

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

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

5M

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

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

Estos aspectos del presente invento están adicionalmente ilustrados por los ejemplos a continuación.

EJEMPLOS

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

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

Preparación de muestra

Las semillas fueron infectadas con insectos adultos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) según se describe en Rubio et al., “Morfología del Sistema Digestivo de *Hypothenemus hampei* (Ferrari)”, Cenicafe (Colombia) 58:66-74 (2007), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia. De manera breve, los granos de café infectados fueron disecados utilizando un estereomicroscopio y las larvas fueron recolectadas en un plato Petri. Cada larva fue almacenada a 4°C por al menos 10 minutos para disminuir actividad física y luego colocada en una lámina de vidrio con una gota de agua destilada estéril y disecada bajo un estereomicroscopio Zeiss Estemi 2000 usando pequeños fórceps y agujas *teasing* de 0.15 mm. Para aislar el tejido del ciego gástrico, cada larva fue disecada con una incisión a nivel del protórax y el mesotórax, luego una gran incisión a lo largo de la larva para exponer todo el canal alimenticio. Finalmente, después de la remoción del tejido graso, la región del ciego gástrico fue disecado e inmediatamente depositado en un tubo de microcentrífuga pre-enfriado con 100 μ l de agua destilada estéril que contenía el reactivo ARN Later™ al 0.1%. Todos los tejidos del ciego gástrico disecados fueron almacenados a -80°C hasta lograr la extracción de ARN y proteica.

Construcción de la Biblioteca YSST de la Broca

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

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

con un Kit de Síntesis de ADNc (Stratagene). Luego de la síntesis de segunda hebra, los ADNc's fueron preparados para clonación unidireccional mediante ligación con adaptadores *EcoRI* según las instrucciones del fabricante, seguido por digestión con *NotI*. Los ADNc's fueron luego fraccionados sobre un gel de agarosa al 1% usando electroforesis y aquellos con un tamaño

estimado oscilando entre 300 y 1,000 pares de bases escindidos del gel y purificados usando un kit de extracción de gel QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). Los fragmentos fueron ligados a una mezcla de partes iguales de los tres vectores, PYSST0, Pysst1, y pYSST2, digeridos con *EcoRI* y *NotI*. Células electrocompetentes TOP10F' de *Escherichia coli* (Invitro, Carlsbad, CA) fueron transformadas con 1 µg aproximadamente de la biblioteca YSST resultante mediante electroporación (Micropulser Electroporator, Bio-Rad, Hercules, CA) y extendidas sobre 10 a 15 placas LB grandes. El ADN del plásmido fue aislado a partir de una muestra agrupada de los transformantes resultantes utilizando el Perfectprep Plasmid Midi kit (Eppendorf). Cincuenta microgramos de la biblioteca YSST fue transformada en la cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) DBYα2445 (MATα, suc2Δ-9, lys2-801, ura3-52, ade2-101) usando el YEASTMAKER Yeast Transformation System 2 (BD Biosciences, San José, CA). Los transformantes fueron extendidos sobre placas de sucrosa YP (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, sucrosa al 2%, agar 2%, pH 6.5), incubados a 30°C por 4 a 9 días, y las colonias visibles fueron trazadas nuevamente sobre la placa de sucrosa seguido de una incubación a 30°C por 2 a 3 días. Los plásmidos fueron aislados a partir de las colonias visibles tal cual se describe en Hoffman y Winston, "A Ten-Minute DNA Preparation from Yeast Efficiently Releases Autonomous Plasmids for Transformation of *Escherichia coli*," *Gene* 57:267-272 (1987), el cual está incorporado en su totalidad en la presente como referencia, transformados en *E. coli* electrocompetente XL1-azul y purificados usando un Quiaprep kit (Qiagen). Los insertos de plásmidos fueron secuenciados usando un cebador correspondiente al promotor ADH1 de PYSST0, Pysst1, pYSST2 (5'-TCCTCGTCATTGTTCTCGTTCC-3') (SEQ ID NO:5) en el Bio Resource Center, Cornell University, Ithaca, NY (<http://www.brc.cornell.edu>).

Amplificación RACE

Un cebador oligonucleótido derivado de la secuencia de ADN correspondiente a las secuencias de señal predichas del clon YSST mananasa aislado fue usado en 3'RACE con el cebador como cebador adaptador. Para obtener la secuencia de ADNc de longitud completa, se realizó un PCR 'touchdown' usando un programa con 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 2.5 minutos con la temperatura de recocido disminuyendo en 1°C cada segundo ciclo hasta 60°C, seguido por una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos PCR fueron subclonados dentro del vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). Las secuencias de ADN fueron determinadas tal cual se describe anteriormente. La β-mananasa del *H. hampei* es una endoglicanasa (endo- β-1,4-D-glucanasa, EC 3.2.1.4). Es una cadena polipeptídica sencilla de 320 aminoácidos, con una masa molecular pronosticada de 35.62 kDa y el pI teórico es de 4.72, calculado a partir de la composición aminoácida.

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

Construcción del plásmido de expresión proteica de fusión

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

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

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

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

Recombinación y Transfección de ADN de Baculovirus

Se realizó una construcción de baculovirus y expresión proteica en células Sf9 según el protocolo del BaculoDirect Baculovirus Expression System de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las células de *Spodoptera frugiperla* (Sf9) fueron transfectadas con ADN bacmid recombinante para la producción de las partículas del baculovirus. Las células fueron cultivadas a 27°C en medio SF900-II (Life Technologies) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Para la transfección, 9×10^5 células fueron transferidas a matraces de cultivo de tejidos de 35 mm e incubadas por una hora en 2 ml de medio Sf900-II SFM (Life Technologies) sin antibióticos para permitir así la adhesión de las células a la placa. El medio fue luego cambiado a 1 ml de Sf900-II libre de suero sin antibióticos, que contenía ADN bacmid recombinante (5 μ l de una mini-preparación estándar de ADN del plásmido) que había sido pre-incubado por 30 minutos a temperatura ambiente con CellFectin (6 μ l) (Life Technologies). Las células fueron incubadas con el complejo liposoma-ADN a 27°C por 5 horas. El medio de transfección fue removido y se añadió 2 ml del medio SF900-II que contenía antibióticos. El plásmido pENTTM/Man fue transfectado en células Sf9 y se utilizaron como controles negativo y positivo, respectivamente, ADN bacmid (Bd) recombinante y pENTTM/CAT. Las células transfectadas fueron incubadas a 27°C por 72 horas permitiendo la producción del baculovirus y su liberación en el medio de cultivo. El medio de cultivo de cada transfección fue recolectado, clarificado (500 g por 5 minutos) y almacenado a 4°C como una solución concentrada master viral. Para analizar la eficiencia de la transfección, la producción de baculovirus recombinante (Bv-Man) y baculovirus no recombinante (Bv) fue monitoreada mediante una visualización del efecto citopático demostrado por las células transfectadas dentro de las 48 horas seguidas al proceso de subcultivo bajo un microscopio de contraste de fase y evaluando la presencia del ADN de baculovirus a través de análisis por PCR. Para este efecto, el baculovirus presente en 50 μ l de sobrenadante del cultivo infectado fue sedimentado a 12000 g por diez minutos en un tubo de microcentrífuga, y un volumen (25 μ l) de buffer de proteinasa K (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA; 0.5% SDS) que contenía 50 μ g/ml de proteinasa K (Sambrook et al., 1989) fue añadido al pellet para digerir las proteínas virales por una hora a 56°C. Un calentamiento adicional a 95°C por 20 minutos fue incluido con el fin de inactivar la enzima antes de seguir con el paso de PCR. La amplificación del ADN viral fue llevada a cabo usando 2 μ l de esta preparación de ADN como plantilla en las mismas condiciones y con los mismos cebadores descritos anteriormente. Las células fueron seleccionadas con ganciclovir por 120 horas, y la solución concentrada viral resultante fue amplificada dos veces al infectar las células Sf9.

Amplificación de Soluciones Concentradas de Baculovirus

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

52
MOI de 0.01-0.1). Luego de este periodo, el medio fue completado hasta 4.5 ml y las células infectadas fueron incubadas por 48 horas a 27°C. El medio de cultivo fue recolectado, clarificado (500 g por 5 minutos) y almacenado a 4°C como soluciones concentradas virales para la producción de proteínas recombinantes.

Producción de aumento progresivo de la β -mananasa recombinante

Las células de *S. frugiperla* fueron sembradas en una placa de 225 cm² con 50 ml de medio de cultivo e incubado según la descripción anterior. Las células fueron transfectadas en fase logarítmica usando 500 μ L de una solución concentrada P3 viral (titulación 3.44×10^6 pfu/ml). Luego de 96 horas, el medio de cultivo fue recolectado, clarificado (500 g por 5 minutos) y la β -mananasa recombinante fue purificada usando el MagneHis System[®] (Promega, Madison, WI). Esto resultó en la producción de 2.4 mg de β -mananasa purificada por cada 100 ml de cultivo.

Ejemplo 3 – Purificación de β -mananasa recombinante

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

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

El galactomanano entrecruzado con azurina fue preparado al tinturar y entrecruzar un polisacárido de galactomanano extraído de harina de semilla de algarrobo (AZCL-galactomannan[®]; Megazyme International Ireland Ltd.). El algarrobo, *Ceratonia siliqua*, es un árbol de hoja perenne, nativo de la región Mediterránea, cultivado por sus vainas de semilla comestibles. Este sustrato es insoluble en soluciones amortiguadas, pero se hidrata rápidamente para formar partículas de gel las cuales son fácil y rápidamente hidrolizadas por endo-hidrolasas específicas las cuales liberan fragmentos solubles rotulados por tintes según Marraccini et al., “Caracterización Molecular y Bioquímica de ENDO- β -MANANASAS a partir de granos de café en germinación (*Coffea arabica*)”, Planta 213:296-308 (2001), el cual es incorporado en la presente en su totalidad como referencia. Una alícuota de 20 μ L de la proteína β -mananasa etiquetada con 6x-His mezclada en una solución de sustrato [1% (w/v) AZCL-galactomannan[®] en 0.2M buffer de acetato (pH 5.0)] fue incubada a 37°C con una leve agitación. Alícuotas de 200 μ L fueron removidas cada 30 minutos y calentadas a 100°C por cinco minutos para detener la reacción. Cada alícuota fue centrifugada a 13k rpm por 5 minutos y la absorbancia fue medida a λ_{595} nm (Figura 2).

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

Purificación del β -Galactomanano del café

Un procedimiento de fraccionamiento secuencial con base en un tratamiento de deslignificación, un lavado ácido, y subsiguiente extracción alcalina (como en Bradbury et al., "Estructuras Químicas de Polisacáridos de Café Verde", J. Agric. Food Chem. 38:389-392 (1990), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia) fue usado para aislar β -manano puro a partir de granos de café verdes. Granos de café *Coffea arabica* verdes molidos fueron extraídos mediante Soxhlet con cloroformo/metanol (2:1) y éter de petróleo (5h) para remover lípidos y con etanol acuoso (95% de un día a otro) para remover carbohidratos de bajo peso molecular. Los granos desprovistos de grasa fueron extraídos usando agua caliente y luego deslignificados con solución de cloruro de sodio débilmente ácida, según el método de Wolfrom y Patin, "Carbohidratos del Grano de Café. IV. Un Arabinogalactano", J. Org. Chem. 30:4060-4063 (1965), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia, para dar un producto blanco de holocelulosa. La mayor parte del polímero de arabinogalactano fue solubilizado, de manera parcialmente hidrolizado, al lavar con ácido hidrocórico diluido (1%, 80°C). El manano luego fue aislado en fracciones discretas mediante extracción (de un día para otro, 4°C) con soluciones de hidróxido de sodio al 2.5% y 10%. Adición de etanol a los extractos de NaOH al 2.5% conllevó a una rápida formación de un precipitado blanco, el cual fue removido mediante filtración luego de permitir a la mezcla reposar de un día para otro a 4°C. Se obtuvo una fracción adicional mediante la adición al filtrado. Los precipitados fueron todos lavados con etanol y éter dietílico antes de secar. El sustrato de manano utilizado en esta investigación fue la fracción precipitada mediante neutralización de los extractos de NaOH al 10%, los cuales contenían manano en un 94% por peso.

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

Con el fin de evaluar la actividad enzimática contra los galactomananos del café, la actividad de la β -Mananasa fue determinada mediante el ensayo del ácido dinitrosalicílico de Bernfeld, P. In: Colowick S.P. y Kaplan N.O. (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, Nueva York, páginas 149-158 (1955), el cual está incorporado en la presente en su totalidad como referencia. El pH óptimo de la actividad enzimática en contra del galactomanano del café fue determinado a diferentes valores de pH en un rango entre 4.0 y 11.0. El buffer era 200 mM de acetato de sodio y 100 mM cloruro de sodio a 37°C. La actividad enzimática más alta fue observada a un pH de 6.0 (Figura 3). El efecto de la temperatura sobre la actividad de la β -Mananasa recombinante en contra del galactomanano del café fue examinado en un rango de temperatura entre 15°C a 70°C usando el mismo buffer a un pH de 6.0 (Figura 4). La enzima mostró una máxima actividad alrededor de los 50°C. La actividad de la enzima disminuyó fuertemente con aumentos adicionales de temperatura.

Aunque el invento ha sido descrito en detalle con fines ilustrativos, se entiende que tal detalle tiene solamente tal propósito, y variaciones pueden realizarse en la presente por aquellos expertos en el estado de la técnica sin apartarse del espíritu y alcance del invento el cual está definido por las siguientes reivindicaciones.

64

REIVINDICACIONES:

1. Una proteína de β -mananasa aislada con una secuencia de aminoácidos la cual es un 90% similar a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

2. La proteína de β -mananasa aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos la cual es un 95% similar a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

3. La proteína de β -mananasa aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos la cual es un 99% similar a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

4. La proteína de β -mananasa aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

5. Un polinucleótido aislado que codifica la proteína de β -mananasa de la reivindicación 1.

6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en donde el polinucleótido codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

7. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en donde el polinucleótido tiene una secuencia nucleótida de la SEQ ID NO: 2.

8. Un sistema de expresión aislado que contiene el polinucleótido de la reivindicación 5.

9. Una célula hospedera aislada que contiene el polinucleótido de la reivindicación 5.

10. La célula hospedera de la reivindicación 9, en donde la célula hospedera es seleccionada a partir del grupo que consiste de células vegetales, células de insectos, células bacterianas, y otras células eucarióticas.

11. Un método de producir de manera recombinante una proteína de β -mananasa, dicho método comprende:
proporcionar la célula hospedera de la reivindicación 9;
cultivar la célula hospedera bajo condiciones efectivas para que la célula hospedera exprese la proteína de β -mananasa; y
recuperar la proteína de β -mananasa.

12. Un método de degradar mananos y polisacáridos en material vegetal, dicho método comprende:
proporcionar material vegetal y
contactar el material vegetal con la proteína de β -mananasa de la reivindicación 1 bajo condiciones efectivas para degradar mananos y polisacáridos en el material vegetal.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el material vegetal son granos de café.

14. El método de la reivindicación 12 el cual además comprende:

recuperar azúcares solubles a partir del material vegetal degradado, como resultado de dicho contacto entre la materia vegetal y la proteína de β -mananasa.

10

cb

1 / 2

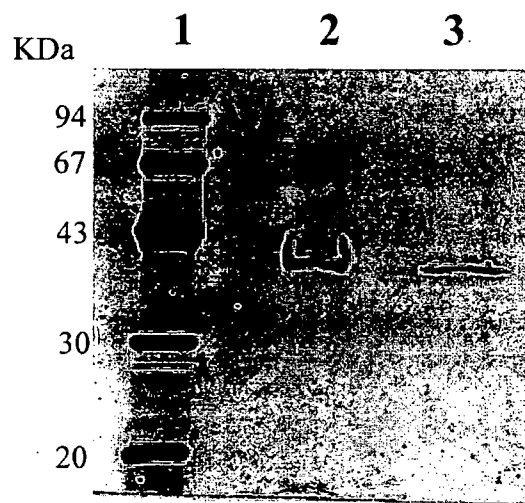


Figure 1

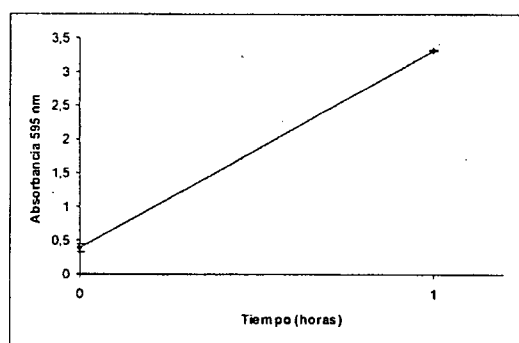


Figure 2

2 / 2

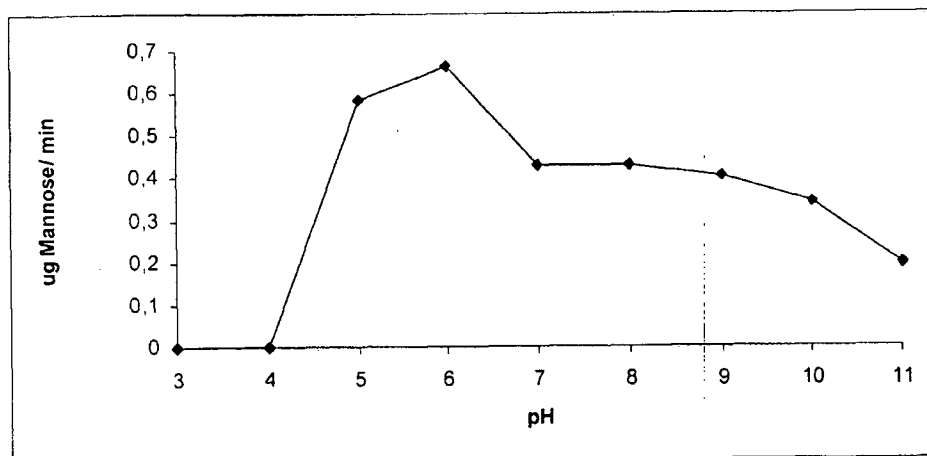


Figure 3

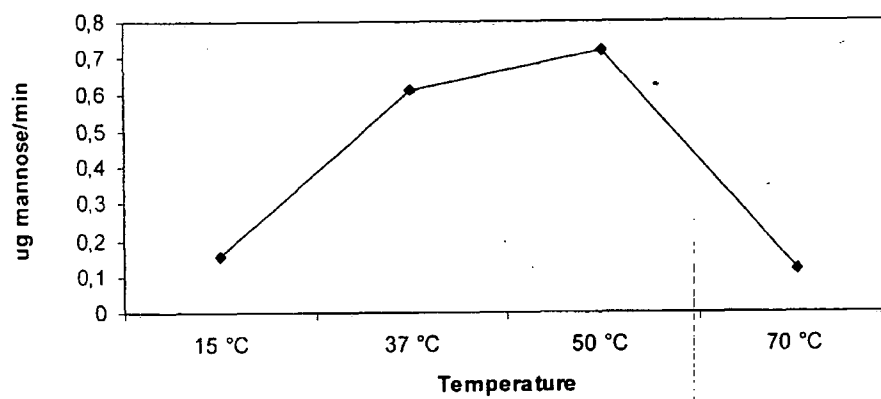


Figure 4

SEQUENCE LISTING

<110> Rose, Jocelyn
Acuna, Ricardo

<120> BETA-MANNANASE FROM COFFEE BERRY BORER, HYPOTHENEMUS HAMPEI, AND
USES THEREOF

<130> 19603/5501

<140> 11/943,015

<141> 2007-11-20

<150> 60/866,705

<151> 2006-11-21

<160> 7

<170> ' PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 321

<212> PRT

<213> Hypothenemus hampei

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

<210> 2
<211> 1063
<212> DNA

20

<213> Hypothenemus hampei

<400> 2

gctgatcggg tgtgtactca attctttaag gagtttacia tatgaccgct gatacattaa	60
cgcgggcaact gctgctgttg ctgttggtgc gcgctgctgc tgctgtaccc ggattcacgg	120
tttccggtac tcgaatttta gatgctaacg gtcaggaatt tatgataaga ggggtcagtc	180
acgcacatac ctggtataag gatgatatta atggggccat cacatccatc gctgctgctg	240
gcgccaacac ggttcgcatt gtactttcta atggcggaca gtggacaaaa gacaacctgg	300
attcagttca gaacattctg tccctctgtg agagccataa gcttattgcc atgctggaag	360
ttcacgatgc caccggcaat gacagccaag aaacactgga aaatgccgtg aattactgga	420
aagagcttcg ggacttgctc attggttaagg aagacagagt tattatcaat atagccaatg	480
agtgttcgg tacctgggat actgctggct gggccgacgg ttataaagtt gtcattccgg	540
aactacgtaa cgccggactg gaacacctgc tggttgtaga cacagcggga tacggacaat	600
atcctcaagc tatttttgaa aaaggttaagg aggttttcca gacagacctt cttgcccgca	660
cggtgttttc cattcacatg tatgaatatg cagcgacgga tgtaacaatg ataaaaggaa	720
atattgactc ggccttgaat acaggcatcc cggtgattat tggagaattt ggtgaccgaa	780
aaccggagtc gcagcatggt gatatcgata ccatcatgag ctacactcgc gagaaatccg	840
taggctggtt ggcctgggtc tggtaggta acggttaacga tgaatcaatt cttgacctga	900
cgaacggacc tagcggagat tacagtctta ctaacgtggg gagtcaaatt gttgacagtg	960
agaacggcat tcgcaaaacc tccacaatct gttcaatatt caattaaaaa aaaagatggt	1020
tgtttgatga tttttgttat aataaacggt tcatttgcatt att	1063

<210> 3

<211> 10274

<212> DNA

<213> Hypothenemus hampei

<400> 3

atggttgagt tcaccaatca agaatatgca gacatgcatt tgatttatgg ccaagccaat	60
ggcaattcct acgaagcgcg cagactctac gcacgtagat atcctaatacg gagactacct	120
gatccaaaaa catttccaaa tattcacatt cgactatgtg aaactggaac atataaacag	180
ttcagtgggt tcgaaggagt acatcaaata gcgagaactc cagaaatcga agaagccgtt	240
ctaaatagtg ttgaagccga tctgtctacg agcacaagga aaattgcaat aacattgaac	300
atttcattta tgcttgctctg aagaattctg actgataacc tttgtatcc ttaccacctt	360

acaaggggttc aagctcttct cccacgagac tttccttttag gcgtaaattt ttgcgagtag 420

ttcttacaaa tgctgggtca aaatccgtcg tttgcatcgt ttgcgtcgtt ttgtttattt 480

tatttacgga tgaagcaaatt ttttcaagaa attccatccg aaattttcat aatgaacatt 540

tttggggaga agaaaatcca catttagtac gagaaaacaa ttttcaacat caattttctg 600

tcaacgtttg ggcaggaatt attggcgatt atttaatagg accatttttt ctgtcgaaga 660

ggttgaatgg tggctattat catcggtttt tcgaagagga acttcccgtc ctttttagatg 720

aggtaccgct tcttttgaga aaccaaattg ggctaattgca cgatgggtgc ccagtcatt 780

ttagtcggga agtaaggag ttcctaaatg aacattatca caaccgttgg attgatcgag 840

ggggaactca gtcattggccc ccgaggtccc cggacctgaa tagtctggat ttttttttct 900

agggacatct caaatccttg gtgtaccaa cccaattaa cacagtggag gaattgcgaa 960

acagaatagt cgattcatgt aacgtcattc gcaatactcc tggatatttt gaaagagtcc 1020

gccggtctat gaggcacaga gcggaatctt gcatcttagc aagaggagga cattttcaac 1080

agttcctata gtcttgtttt atttagatta aattactttt actgttacct tacgaattta 1140

atacataaga ttcattgtac tcttttgttg tacgttttcc ttaatatgca tcggtaactg 1200

tttatgcaaa tttttcgcaa atgataaaag atacgagaaa aatgcaagag atcaaaaagt 1260

aagagaaata gacaaggaat ctaaatgtga aatcaaaatt tatacatagt gttccaaaaa 1320

aaagttagga agcaaaaaat agcacatgac ccaagaaaac ataagaccct gtatatggag 1380

agcaacgatt ttgccatttt catatagagg ctcttaaaaa atatagatat accaaatttc 1440

attaaattat ctttaggcat aagaaagaaa atagtagaaa atttaaaaaa aatcaaactt 1500

tatcaccttg tatatcaaaa atgggtgcgtt tttcccata ggtgtattag catttttttc 1560

ttattttgcc gaatactatc accccctgaa atatctccat gatgatctgt tacaccctgt 1620

acacctaata agtaaaataa taaaacgttt aaattttatc ttttaacgta gataagattt 1680

tgcgctcttt gtttcttct aagttttaat cgagatttcg cctcattttc gctcattcgc 1740

cagaagacct cagtgaagc gattcattaa gtctgaaatt taactttgtt ccctaccgaa 1800

tattcttttt ctgacgatag acgatagctg atcgggtgtg tactcaattc ttttaaggagt 1860

ttacaatatg accgctgata cattaacgcg ggcactgctg ctgttgctgt tgttgcgcg 1920

tgctgctgct gtaccgggat tcacggtttc cggtaactga atttttagatg ctaacggtca 1980

ggaatttatg ataagagggg tcagtcacgc acatacctgg tataaggatg atattaatgg 2040

ggccatcaca tccatcgctg ctgctggcgc caacacgggt cgcatgttac tttctaattg 2100
cggacagtgg acaaaaagaca acctggattc agttcagaac attctgtccc tctgtgagag 2160
ccataagctt attgccatgc tggaagttca cgatgccacc ggcaatgaca gccaaagaaac 2220
actggaaaat gccgtgaatt actggaaaga gcttcgggac ttgctcattg gtaaggaaga 2280
cagagttatt atcaatatag ccaatgagtg gttcgggtacc tgggatactg ctggctgggc 2340
cgacggttat aaagttgtca ttccggaact acgtaacgcc ggactggaac acctgctggt 2400
tgtagacaca gcgggatacg gacaatatcc tcaagctatt tttgaaaaag gtaaggaggt 2460
tttccagaca gaccttcttg cccgcacggg gttttccatt cacatgtatg aatatgcagc 2520
gacggatgta acaatgataa aaggaaatat tgactcggcc ttgaatacag gcatcccggg 2580
gattattgga gaatttggtg accgaaaacc ggagtcgcag catgttgata tcgataccat 2640
catgagctac actcgcgaga aatccgtagg ctgggtggcc tggtcctggt acggtaacgg 2700
taacgatgaa tcaattcttg acctgacgaa cggacctagc ggagattaca gtcttactaa 2760
cgtggggagt caaattggtg acagtgagaa cggcattcgc aaaacctcca caatctgttc 2820
aatattcaat taaaaaaaaa gatgtttgtt tgtgcatttt tgttataata aacgtttcat 2880
ttgcatatta aatatactaa tccaatatat atttatagac aatagattat taaaaaagta 2940
aattttaaaa taacttcttc aaaaaagaac atttacgctc aaagtgcct atagacgtca 3000
ataatttaaa atgtcactct tcgcacattg acaataacct gcatagacgt ctatgaacgt 3060
cgttgtctat agacgtgttc ctttaattgt tttctaaagc tttgatcaat tggttcagaa 3120
aaacggttca atagattcat ttaataattt acaggactat tgggggtaca ttaggctata 3180
aaacggcctc tcaatatttg tcttcccatc aatatttaaa aagtaatagt agatttgta 3240
aaggactgta aaatgtaatt ttttagtagt ttttccaaat taaagctaag agtaaaaaaa 3300
acggtttttc taaaaaagtc atggaagggt tttgtaggga atttaatcag gtttttaaaa 3360
ctatccttga aattaaagtt tacttaagcg atcactgggt gctgagatat cgatgatcaa 3420
agataaaaag atcctttttc tttcaaagtt agatgtctca gcaagggtt gacgtagatg 3480
tatgaaaaaa aaaacaaaat gaagctgaat aaacaaggta accgaccact gtacgacaag 3540
ggttcaaatg gaaaaaaatt tctgagaccc atggagactt tagaagaaga agaaaatttt 3600
gaaaaatggt tacctcgcgc ctttcttggt gattgcgcgg taaccataac tccaaaggaa 3660
attccgatgt aagatctgaa aactataaaa cattaagctt caaatgctt ttttctccaa 3720
ctcgatacga ccgttttttc acaaagatac tcaaagaaca ctaaaaaaa taaaaaaagg 3780

tttttacttt aatttttttg attagtatta ttaacattat ttaatctaaa ataatactga 3840
 tattggtatt aactttcacc aggtacactg gtttcaatag aaacgttacc aatttagtta 3900
 catagcatca aagaaaaagaa tgacattatg atcatcaatt ataattgatt gttcgattat 3960
 aatataacta ttattgatta ttatattatt ataattctct taggtattaa gcccttaagt 4020
 caaaaatcgt agttttctac aaaacgagat taaaaatttt ataacgctat gcaacagaaa 4080
 aaaaaattca ctgggtttac agtacgtggt gatgatacct cactatttac tcaattaata 4140
 tttatatata aaatagtcct atcaattatt taaattttca aaaaaaaaaat ttattaaatt 4200
 gttcaacaaa gagttaacaa taatttcaca atagttaaga actaatttct taattttcaa 4260
 tatggccccc ttctgtataa atacacttat ctattcgttt tctgatgtgt tgcacaactt 4320
 aaataataaa tgttgtaata tttcttgaaa atttaattaa ggttaccaga tgtcactttt 4380
 ttacaattat tctaacaaga gttgagtgat agtttagggt tcgatccctg ctacctccga 4440
 tatttttttt tttcgttttt tttttgttaa taacaatagt aataattgtc aaaataatta 4500
 aaaacgataa aaataattta tttgacgcat tttacagtta tttaaagctt gtaatgagag 4560
 aatttatatg attcgcatat taaattaagg attttacta caaatttcat atttcaaaaa 4620
 caattggtcc tattttaata aaattatcta ccaggagggt tttgatgatg ctctttcata 4680
 atatgttaaa aaaatgcgtt taaaattacc ctaatacatt tttctgtaaa atctacccta 4740
 atatttaact ataaaaacgt acgccaatga cgaagggaag ccattttagg caaatcacaa 4800
 tcggaattca aagatacaca actgatccaa atttgaagtg aatcggctaa acagtttttg 4860
 agatacaaaa gtggctccat gaatcggtcg acatactata tgcgatcaaa ataagacttt 4920
 tttttcctat aaacatgtgc cctaaaatgc accccctcca aactacagcc attctaagtt 4980
 gcgcgacaaa aatcaattat tttaaatttt gactacagtt atggatcaaa tttttgaaaa 5040
 attgcacatc cgtttttctt aaacactgta ttcatttctt gcttttaaaa taacgtaacc 5100
 ctaatttttag agaagatgga gagggatcca cttattgcgt aaataaaaatt taatgtttcc 5160
 aacgagaaat cctaacttta accatcagca tctagtagac catggaaaaa tctaaaattt 5220
 atctctagca ttttcttaat gcaactaatc gaatctttac aggacctgac ataaaaaaat 5280
 taattgatga tacctctttt ttatcaagtc tcatctacat agaataacag gcatgattag 5340
 catttggtga cgtcacaaaa aattttctcg gcaattacaa atcaacagat ttctgtgaaa 5400
 aaattaattt aatgttgaat gcctatcaga aattagggtg caatatatca ctgaaaattc 5460

atttcttgca atatcactta agttttttcc gaaaaatatg gattcagtta gtaatgaact 5520
 aggtatatgt gcggtaaatt tatgttgcaa aaaaatgtac gcagattacc tgaattataa 5580
 caacaaagt gtcgaaaaat gtcgaaacac ctccgaaaat tgaaacatag caaaaattat 5640
 ccgagtcatt tatgcacttg aattcgtgat ttcttttact catttcacaa atttattaca 5700
 tgattaaaat taaattatatt attaaattac aagagaatga taaaaaaaat aattaaggct 5760
 tttaaagt gttatatgaac tgtcacaccg taacagattt gtcaacatat taacaattga 5820
 cagtaaaaaat ttcaaattta taattcggtc atccattaga aaattcataa cttcactatt 5880
 tatccataaa ttgcatcca aagtaacttg ttcttttcat gaatgtgtca gctctacata 5940
 aaacaattga aactggacct atctttgcca ttctattttt ttccagggcc atatgggaaa 6000
 ctttgcaata aatcttgtgc aataaattat gacaattagg aatatttggg gcggtgtaca 6060
 tattatatac aggttgaaga aaatacctcc ccataaaaag ggccttcaaa atagtctaatt 6120
 acaattttgc ccttaaacga acaggaaga taatattaaa ggatattgaa atttatatgg 6180
 gttttcctat tgtcgggtccg gaggggcaac atccaatata ctatatgaaa taaagttgtc 6240
 tatagttagt acattgttaa taatttgatt ttcatatatt ctgtattcag ttctaccgt 6300
 acaagtagcg gcggagatgt ggatgtcatg tattattaaa cttgtatgga aaaaaaggat 6360
 aaaaaaggac acttatatct ccaccattga tgaatggta aagctggtaa ttttttgaa 6420
 tacacctacc gatatgctaa actcatatac gaaatttggg taaaaaatct taagccgttt 6480
 tggaatttaa aaaataaaga aatgttcttt tttttaaact ttaacaccct gtatctcgga 6540
 aacgggtgctg ttgcggggccc atgttcatat aaactttttt gcttattttt gtctgaagaa 6600
 tcatcccttg aaatttatgc acgtacttaa ttaacaccct gtatttcacg taccatgtcc 6660
 tactatacct aaactcaaca gttggcgaga aattttgttg tcgtacctgg tttttgggcc 6720
 atcctgtata catggattta tcatcacaaa aacctcaacc aaaaataaaa attgacgtgt 6780
 atgagcggtt ttttttttg aaaaacaaat ttctgaattt taaatgaatg tattccttat 6840
 tttatcataa acctgtatat aaatttaaaa aaaacgtgat gtgatacgtg aaaactaagt 6900
 tgttatttgg attcagcagg acaaaattta tatgttttat ctaaaattat gcaaaaaata 6960
 tttcatcgc agaccctgt tatcaatgta aaaattaatt aaaccctc gtaaaagoca 7020
 gcgttttgac atttgaatgt ttccgcccc atgttgaagg gaaaaataaa aagttactag 7080
 aatgtaacta gttaggctgc catatttgga gtaacatgtt ccctctctct ctctaacaca 7140
 cgtgaacata actttgcggg actgtataga ttagtgact gtacctacat agtcatacgt 7200

7d

atggaaactt atacagtgtg tcaattttaa aactagcaat ggagaatatc ttctaaatga 7260
 aaagtgtctat caggacgatc tcaaaaacgt atcgggggat tcgaaaagga accaaaatga 7320
 tatattaatc aatccgtttt cacttatccc ctgcgcccca accaccccaa cgttcagaat 7380
 ttcaaatggc accatctgtc atgtaatacc tcaaatggaa ggtatttcaa aactgcattt 7440
 aggggtataa ttagatttta atttattgat tcgtttttga gaaaaagtgc ctcaaaaagg 7500
 taaaattaaa aattttaata ttgtttctta caaaaacaat taggttttca atacatgttg 7560
 ttaggaacag ggccggattt agggcagggc aggcggggct actgccccgg ggcctccaca 7620
 aggaaggggc cccacaata gagaaaaata aatatcgaaa ttctgacggg tcagcaactt 7680
 ttaatttttt ttagtttttt caataactta gtgtctttcg ggaccctgtg agcgaattgg 7740
 ggtgctgggt ggggtaaaca actagctccg agtgtgctaa ttgcggcggt ctttaaaaaa 7800
 aataatttat ttttgtttct ttttttcatt ttctggcggt tcctggatgc caaaaatatg 7860
 ttttttttct caaaactgta aatgtcgta aagcgttacg gacccaagt ttccatttac 7920
 tgtcaatttt ttattttatc aagcatctcg gtggcaatac ttttttttta atgtgtaatt 7980
 tgtaatttgt gctcatgagt taaaaagaaa taaaataagt aaaaagaaat tccaaggttt 8040
 tataaaaagt atatatggta accgggtgac tattaataatt tcttctcaag taggcttttg 8100
 aattatttga caccgagtcc gtatgtctta gatttattaa cagattcgta ttttaagtga 8160
 gttgggttta tttgtttata ttcgaaacta agtaaagaac atatcaaaga ctacggact 8220
 cgctgtcaaa taattccaca gcctacttga gaagaaattt taatagtcac ccgttataaa 8280
 tacgatttaa atcttacggg tggcaacact gtcgtggta agaagtgtcc gagtgtagcg 8340
 tgctcgaagc ggggaatccc taaattttat tagaagctac ggacgtattg caacaaaagt 8400
 aaaatcttct gaatttatat ctacaaacac acgtaagtat tttcgtattt atcttgtgat 8460
 ctataagata taatgaattt tatatttcat tgtgcaatta cgaaaatttg ttttttttc 8520
 ttaaaggagc gatatgcttt aaagagcaaa aacgtaaaca gaggttatgg aggttttatt 8580
 ccacgactac attcttattt tcttaagatt tcttttaca tggattatg agtgatcgcc 8640
 ataaaactcc tcgagttttc gctagtggat cccaaaaaag gaaattgcaa acagaacgtg 8700
 aaaaaaaaaa agtgaagaaa atttagctaa aatacccaaa ttgaccaact attttacatc 8760
 gacacccaaa caaaaacttc cgcaagatcc tgaaaaatca gcagaagatt cagcagtaga 8820
 tggagatggg gttgatagta atcaagataa tccagctgtt acatcaggcg acaccatagg 8880

atcttcaaaa acttgtagtc acaatcaaga ggaagtagat tttcgtgggt tcaaaaatga 8940
 cattgggtctt tggcctgacg tcataacaga agaaatgatc aaatattggg cgaagaaggg 9000
 ttccacaaaa ctgcaaaaact gtgatgaagt ttctctgcag aattcagttc tccaagacca 9060
 gtcgcaagat aataaaaact ttgttcggaa atgttcaaag aatatgttta cacgtcgcaa 9120
 tcaaaatcaa gagactgtta atcgattctg gctttgtttt tctccaacta agggaaaagt 9180
 atattgctat gcatgtaaat taatgtccac tcaaaaacga agctaagtgg ggaaggcttc 9240
 agtgactgga aacatgcatc tgagcggctg tacgagcatg agatttcaaa aactcatttg 9300
 gaatcagtga tgaatttagt gcaacgagga gaagtcacag gacgtatcga tcaagagtta 9360
 acgatacaag aggcacaaca aattgaatat tggcgaaaaa ttcttacaat tgtcgtcagt 9420
 acgattaaat tcattgctga acgcggtta gcctttcgag gagacgatga aattattgga 9480
 tcatcgagaa atggcaattt tctgggtatt ttagaattgc tagccgagta cgaaccaatc 9540
 ttggcagctc atttaaaaca gcatgcaaac aaaggagag gtcacgtcaa ttatctttct 9600
 tctacgatct gcgaagaact gacaaattcc atgggtgatc aagtgttcaa tgaaatcgta 9660
 gcaaggatta aaaaatcaaa gtactattct gtttcagtgg actctactcc tgacgaatct 9720
 catatcgatc aacttactat agttattcgc tatattgaag gatcgatgcc aaaggaacga 9780
 tttcttattt ttaccaaaat tgcggtcata ctgggtgaagc cacagcaaaa gctttactac 9840
 aatttttaag ttaccatcaa attgacatcc ttaattgccg aggtcaatcg tacgacaatg 9900
 ctgcaaatat gagtggtaaa tatcaaggga tgcaagctct tattttgcag aaaaatcatt 9960
 tatctacgtt tgtaccatgt tgtggctact cactcaactt agttggaaag gdagctgcta 10020
 actcttgatc atcggcagtt caattctttg atttcgttca gaatttatat aggtttttta 10080
 cagcaagtac acaacgatac cgaattctgt ctgaaaaatt atcagagaaa aaaagcggac 10140
 agtcatatgt tttaaaaaat cttagcgata ctgctgggtc atgtaggggt gdagccacga 10200
 aggccattgt tatgggatat tctgaaatcg aagaagctct aaccagcata tcttctgata 10260
 aggaacagaa agat 10274

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N6-NotI primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(36)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 4
gagagagaga gagagaaccg cgcggccgcc nnnnnn

36

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer corresponding to ADH1 promoter of pYSST0, pYSST1, pYSST2

<400> 5
tcctcgtcat tgttctcggt cc

22

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer sequence

<400> 6
caccatggaa ccttttgtgg tc

22

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer sequence

<400> 7
gacagggatg aagcagatct gg

22

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OLARTE, Carlos R.
Calle 100 No. 8A-37
Torre A piso 10
Bogotá
COLOMBIE

Date of mailing (day/month/year)
19 August 2008 (19.08.2008)

Applicant's or agent's file reference
P2007/000065

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2007/004288

International filing date (day/month/year)
21 November 2007 (21.11.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

CORNELL RESEARCH FOUNDATION INC.
Cornell Business & Technology Park
Suite 105
20 Thornwood Drive
Ithaca, NY 14850
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sayegh Nadine

Facsimile No. +41 22 910 06 10

e-mail ro.ib@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 92 22

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 May 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/062317 A4

- (51) International Patent Classification:
C12N 9/42 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2007/004288
- (22) International Filing Date:
21 November 2007 (21.11.2007)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/866,705 21 November 2006 (21.11.2006) US
- (71) Applicants (for all designated States except US):
FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA [CO/CO]; Calle 73 No. 8-13, Bogotá, D.C. (CO). **CORNELL RESEARCH FOUNDATION INC.** [US/US]; Cornell Business & Technology Park, Suite 105, 20 Thornwood Drive, Ithaca, NY 14850 (US).
- (72) Inventors: **ACUÑA ZORNOSA, Ricardo**; Plan Alto, Chinchina, Caldas Colombia (CO). **ROSE, Jocelyn**; 34 Autumn Ridge Circle, Ithaca, New York (US).
- (74) Agent: **OLARTE, Carlos R.**; Calle 100 No. 8A-37, Torre A piso 10, Bogotá (CO).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- with amended claims

(88) Date of publication of the international search report:
27 November 2008

Date of publication of the amended claims: 5 February 2009

WO 2008/062317 A4

(54) Title: BETA-MANNANASE FROM COFFEE BERRY BORER, HYPOTHENEMUS HAMPEI, AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to an isolated Beta-mannanase protein having an amino acid sequence which is 90% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, as well as isolated polynucleotides encoding the Beta-mannanase protein, and isolated expression systems and host cells containing the polynucleotides. The present invention also relates to a method of recombinantly producing Beta-mannanase protein. Also disclosed is a method of degrading mannans and polysaccharides in plant material, which involves providing plant material and contacting the plant material with the Beta-mannanase protein of the present invention under conditions effective to degrade mannans and polysaccharides in the plant material.

**AMENDED CLAIMS****[Received by the International Bureau on 18 September 2008 (18.09.08)]**

1. An isolated β -mannanase protein having an amino acid sequence which shares 90% identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
2. The isolated β -mannanase protein of claim 1, wherein the protein has an amino acid sequence which shares 95% identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
3. The isolated β -mannanase protein of claim 1, wherein the protein has an amino acid sequence which shares 99% identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
4. The isolated β -mannanase protein of claim 1, wherein the protein has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
5. An isolated polynucleotide encoding the β -mannanase protein of claim 1.
6. The isolated polynucleotide of claim 5, wherein the polynucleotide encodes a protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
7. The isolated polynucleotide of claim 5, wherein the polynucleotide has a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 2.
8. An isolated expression system containing the polynucleotide of claim 5.
9. An isolated host cell containing the polynucleotide of claim 5.
10. The host cell of claim 9, wherein the host cell is selected from the group consisting of plant cells, insect cells, bacterial cells, and other eukaryotic cells.
11. A method of recombinantly producing β -mannanase protein, said method comprising:
 - providing the host cell of claim 9;
 - culturing the host cell under conditions effective for the host cell to express β -mannanase protein; and
 - recovering the β -mannanase protein.
12. A method of degrading mannans and polysaccharides in plant material, said method comprising:
 - providing plant material and

AMENDED SHEET (ARTICLE 19)



- contacting the plant material with the β -mannanase protein of claim 1 under conditions effective to degrade mannans and polysaccharides in the plant material.
13. The method of claim 12, wherein the plant material is coffee beans.
14. The method of claim 12 further comprising: recovering soluble sugars from the degraded plant material, resulting from said contacting the plant matter with the β -mannanase protein.

AMENDED SHEET (ARTICLE 19)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 May 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/062317 A3

(51) International Patent Classification:
C12N 9/42 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/004288

(22) International Filing Date:
21 November 2007 (21.11.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/866,705 21 November 2006 (21.11.2006) US

(71) Applicants (for all designated States except US):
FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA [CO/CO]; Calle 73 No. 8-13, Bogotá, D.C. (CO). CORNELL RESEARCH FOUNDATION INC. [US/US]; Cornell Business & Technology Park, Suite 105, 20 Thornwood Drive, Ithaca, NY 14850 (US).

(72) Inventors: ACUÑA ZORNOSA, Ricardo; Plan Alto, Chinchina, Caldas Colombia (CO). ROSE, Jocelyn; 34 Autumn Ridge Circle, Ithaca, New York (US).

(74) Agent: OLARTE, Carlos R.; Calle 100 No. 8A-37, Torre A piso 10, Bogotá (CO).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
27 November 2008

(54) Title: BETA-MANNANASE FROM COFFEE BERRY BORER, HYPOTHENEMUS HAMPEI, AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to an isolated Beta-mannanase protein having an amino acid sequence which is 90% similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, as well as isolated polynucleotides encoding the Beta-mannanase protein, and isolated expression systems and host cells containing the polynucleotides. The present invention also relates to a method of recombinantly producing Beta-mannanase protein. Also disclosed is a method of degrading mannans and polysaccharides in plant material, which involves providing plant material and contacting the plant material with the Beta-mannanase protein of the present invention under conditions effective to degrade mannans and polysaccharides in the plant material.

WO 2008/062317 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/004288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/42 C12N9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL [Online] 28 April 1998 (1998-04-28), "Bacillus circulans gene for mannanase, complete cds." XP002487608 retrieved from EBI accession no. EMBL:AB007123 Database accession no. AB007123 the whole document ----- -/-	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2008

Date of mailing of the international search report

28/07/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/004288

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JIANG ET AL: "High-level production, purification and characterization of a thermostable beta-mannanase from the newly isolated <i>Bacillus subtilis</i> WY34" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 66, no. 1, 5 October 2006 (2006-10-05), pages 88-96, XP005651799 ISSN: 0144-8617 page 88, left-hand column, paragraph 1 - page 89, left-hand column, paragraph 1 -----	1-14
A	US 5 714 183 A (NICOLAS PIERRE [CH] ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) "Hydrolysis of the galactomannans of coffee extract with immobilized beta-mannanase" the whole document -----	1-14
A	VALENCIA A ET AL: "Alpha-amylases of the coffee berry borer (<i>Hypothenemus hampei</i>) and their inhibition by two plant amylase inhibitors." INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY MAR 2000, vol. 30, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 207-213, XP002487607 ISSN: 0965-1748 the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/004288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5714183	A	03-02-1998	AT 183886 T 15-09-1999
		AU 681001 B2 14-08-1997	
		AU 1488595 A 19-10-1995	
		BR 9501477 A 07-11-1995	
		CA 2144707 A1 08-10-1995	
		CN 1117349 A 28-02-1996	
		DE 69420390 D1 07-10-1999	
		DE 69420390 T2 16-12-1999	
		DK 676145 T3 13-03-2000	
		EP 0676145 A1 11-10-1995	
		ES 2137277 T3 16-12-1999	
		FI 951568 A 08-10-1995	
		GR 3031962 T3 31-03-2000	
		JP 7274833 A 24-10-1995	
		NO 951224 A 09-10-1995	
		NZ 270694 A 26-01-1996	
		PH 31646 A 12-01-1999	
		RU 2157407 C2 10-10-2000	
		ZA 9502131 A 18-12-1995	

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

REFERENCIA	Radicación No.	9 62870
	Solicitud internacional	PCT/IB2007/004288
	Fecha inicio fase nacional	11/06/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	7119

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la traducción de la modificación a las reivindicaciones.
2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

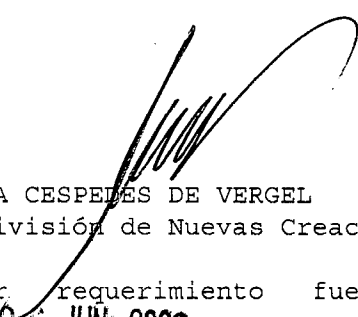
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 62870



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 26 JUN. 2009.
jfernand