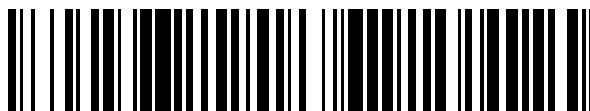


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 758**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2017** **E 17164901 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 3385361**

54 Título: **Composiciones de detergente que comprenden mananasa bacterianas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.10.2019

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

HERBST, DANIELA;
WIELAND, SUSANNE;
MUSSMANN, NINA;
LEINONEN, TAIJA;
VALTAKARI, LEENA;
RACHINGER, MICHAEL;
JUNTUNEN, KARI;
DOLLAK, DANIELA;
LORENZ, PATRICK;
VEHMAANPERÄ, JARI;
OJAPALO, PENTTI;
PURANEN, TERHI y
JÄRVINEN, KRISTIINA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 728 758 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de detergente que comprenden mananasas bacterianas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a nuevas composiciones de detergente que comprenden enzimas mananasas bacterianas. Las composiciones de detergente que comprenden mananasas bacterianas son útiles en aplicaciones de lavandería y limpieza en las que se desea la degradación o modificación de manano. La invención también se refiere al uso de
10 dichas composiciones de detergente en aplicaciones de lavandería y limpieza, así como a un método para degradar el manano.

Antecedentes

15 Los mananos son polisacáridos que contienen manosa y se encuentran en varias plantas. Los mananos son poco solubles en un ambiente acuoso y sus propiedades fisicoquímicas dan lugar a dispersiones viscosas. Además, los mananos tienen una alta capacidad de unión con el agua. Todas estas características causan problemas en varias industrias, entre las que se incluyen, las de la elaboración de cerveza, panificación, nutrición animal, y aplicaciones de lavandería y limpieza.

20 En las dietas basadas en plantas, están presentes diferentes β -mananos y, dependiendo de sus cantidades y propiedades, pueden comprometer la digestión de nutrientes, la colonización microbiana y rendimiento del crecimiento. La degradación enzimática de los mananos reduce la viscosidad digestiva de los mananos con alta solubilidad en agua y conduce a la producción de manano-oligosacáridos que pueden formar mananos lineales insolubles en agua
25 presentes en las plantas leguminosas. La mananasa aumenta la ganancia diaria promedio, la eficiencia de la alimentación, la uniformidad de peso y la habitabilidad en todos los animales monogástricos.

Para aplicaciones de alimentación animal, tales como piensos para animales monogástricos con dietas de cereales, el manano es un factor que contribuye a la viscosidad del contenido intestinal y, por lo tanto, afecta negativamente a
30 la digestibilidad del alimento y a la tasa de crecimiento animal. Para los rumiantes, el manano representa un componente sustancial de la ingesta de fibra y una digestión más completa del manano facilitaría mayores eficiencias de conversión de los alimentos.

Para aplicaciones de lavandería y limpieza, las composiciones de detergente que comprenden mananasa pueden utilizarse para degradar el manano. Sin embargo, es difícil proporcionar mananasas que sean estables en diferentes
35 condiciones de almacenamiento y uso y que aún muestren una buena actividad degradativa de manano.

El documento WO 99/64619 A2 desvela y caracteriza varias mananasas y su posible uso supuesto en varias aplicaciones industriales.

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones de detergente que comprenden nuevas enzimas que presentan actividad mananasa cuando se aplican en estas composiciones de detergente. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar composiciones de detergente que tengan un rendimiento mejorado de eliminación de manchas en manchas que contienen manano.

45 Sumario

Según el primer aspecto de la invención, se proporciona una composición de detergente que comprende al menos una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 74 % de identidad de secuencia con la
50 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 (Man7), en la que al menos una enzima tiene actividad degradativa de manano.

En una realización de la invención, al menos una enzima tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un
55 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:16.

60 Las mananasas comprendidas en la composición de detergente de la invención son adecuadas para degradar y modificar materiales que contengan manano en diversos entornos químicos, preferentemente en composiciones de detergente.

En una realización de la presente invención, la composición de detergente comprende además una o más enzimas
65 adicionales seleccionadas del grupo que consiste en proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa,

pectinasa, pectato liasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, xantanasa, lacasa y/o peroxidasa, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas y lipasas.

5 En una realización adicional de la presente invención, la composición de detergente está en forma de una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido regular, compacto o concentrado. En una realización, la composición de detergente puede ser una composición de detergente de lavandería, preferentemente una composición de detergente de lavandería líquida o sólida.

10 La presente invención se refiere además al uso de la composición de detergente como se describe en el presente documento para la degradación de manano.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de la composición de detergente como se describe en el presente documento en un proceso de lavandería.

15 La presente invención se refiere además a un método para eliminar una mancha de una superficie, que comprende poner en contacto la superficie con una composición de detergente como se describe en el presente documento.

20 La presente invención también se refiere a un método para degradar manano que comprende aplicar al manano una composición de detergente como se describe en el presente documento, en el que, preferentemente, el manano está en la superficie de un textil.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 muestra una representación esquemática del vector pEV1 para la replicación en *Bacillus*

La figura 2 muestra esquemáticamente los casetes de expresión utilizados en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para la sobreproducción de la proteína mananasa Man7 recombinante según la presente invención, así como otras proteínas mananasas (Man6 y Man14) recombinantes. Los genes de mananasa estaban bajo el control del promotor *cel7A/cbh1* de *T. reesei* (*pcbh1*) y la terminación de la transcripción se garantizó utilizando la secuencia de terminación *cel7A/cbh1* de *T. reesei* (*tcbh1*). El gen de *amdS* se incluyó como un marcador de transformación.

35 La figura 3 muestra el perfil de temperatura de las mananasas Man6, Man7 y Man14 recombinantes (producidas por *Bacillus*) analizado en tampón de Britton-Robinson 40 mM, pH 7, utilizando un tiempo de reacción de 10 minutos, como sustrato se utilizó galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina. Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado. Los puntos de datos son promedios de mediciones individuales.

40 La figura 4 describe el efecto del pH sobre la actividad de las proteínas mananasas Man6, Man7 y Man14 recombinantes (producidas por *Bacillus*) en tampón de Britton-Robinson 40 mM, a un pH de 4 a 11. La temperatura de reacción fue de 50 °C y el tiempo de reacción fue de 10 min. Como sustrato se utilizó galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina. Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado. Los puntos de datos son promedios de mediciones individuales.

45 La figura 5 muestra un análisis SDS PAGE de mananasas bacterianas.

La figura 6 describe el rendimiento de la eliminación de manchas de Man 6 y Man7 (producidas en *Bacillus* y *Trichoderma*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 4 manchas) en presencia de 4,4 g/l de detergente A líquido comercial para uso industrial a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 8,3 y enzimas dosificadas como unidades de actividad. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

55 La figura 7 describe el rendimiento de eliminación de manchas de Man 6 y Man7 (producidas en *Bacillus*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 4 manchas) en presencia de 4,4 g/l de detergente A líquido comercial para uso industrial a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 8,3 y enzimas dosificadas como proteína enzimática activa (PEA). Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

60 La figura 8 describe el rendimiento de eliminación de manchas de Man 6 y Man7 (producidas en *Bacillus*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 4 manchas) en presencia de 3,8 g/l de detergente en polvo comercial para ropa de color a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 10 y enzimas dosificadas como unidades de actividad. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

65 La figura 9 describe el rendimiento de eliminación de manchas de Man 6 y Man7 (producidas en *Bacillus*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 4 manchas) en presencia de 3,8 g/l de detergente en polvo comercial para ropa de color a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 10 y enzimas dosificadas como proteína enzimática activa. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

La figura 10 describe el rendimiento de eliminación de manchas de Man 6 y Man7 (producidas en *Bacillus*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 3 manchas) en presencia de 4,2 g/l de detergente blanqueador en polvo para uso comercial a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 9,5 y enzimas dosificadas como proteína enzimática activa. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

La figura 11 describe el rendimiento de eliminación de manchas de Man14 (producida en *Bacillus*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 2 manchas) en presencia de 5 g/l de detergente B líquido comercial para uso industrial a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 8,3 y enzimas dosificadas como unidades de actividad. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

La figura 12 describe el rendimiento de eliminación de manchas de Man14 (producida en *Bacillus*) como un aumento de la luminosidad (suma de ΔL^* de 2 manchas) en presencia de 5 g/l de detergente B líquido comercial para uso industrial a 40 °C, 16 °dH, 60 min, pH de aprox. 8,3 y enzimas dosificadas como proteína enzimática activa. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

La figura 13 describe la estabilidad de Man 6 y Man7 (producidas en *Bacillus*) en detergente líquido (OMO para ropa de color) a 37 °C. Para establecer comparaciones se utilizaron 4,0 l de la preparación comercial Mannaway®.

La figura 14 describe la estabilidad de Man 6 (producida en *Bacillus*) detergente A líquido comercial para uso industrial. Para establecer comparaciones se utilizó la preparación comercial Mannaway® 4,0 l.

LISTADOS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 Secuencia del cebador oligonucleotídico Man6_1

SEQ ID NO: 2 Secuencia del cebador oligonucleotídico Man6_2

SEQ ID NO: 3 Secuencia del cebador oligonucleotídico Man7_1

SEQ ID NO: 4 Secuencia del cebador oligonucleotídico Man7_2

SEQ ID NO: 5 Secuencia del cebador oligonucleotídico Man14_1

SEC ID NO: 6 Secuencia del cebador oligonucleotídico Man14_2

SEC ID NO: 7 Secuencia del cebador oligonucleotídico Vec_1

SEC ID NO: 8 Secuencia del cebador oligonucleotídico Vec_2

SEQ ID NO: 9 La secuencia de nucleótidos de la *man6* de *Bacillus clausii*

SEQ ID NO: 10 La secuencia de nucleótidos de la *man6* de *Bacillus clausii* sin secuencia codificante de péptido señal y con optimización de codones para *Trichoderma reesei*

SEQ ID NO: 11 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man6 de *Bacillus clausii*

SEQ ID NO: 12 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man6 de *Bacillus clausii* sin péptido señal

SEQ ID NO: 13 La secuencia de nucleótidos de la *man7* de *Bacillus hemicellulosilyticus*

SEQ ID NO: 14 La secuencia de nucleótidos de la *man7* de *Bacillus hemicellulosilyticus* sin secuencia codificante de péptido señal y con optimización de codones para *Trichoderma reesei*

SEQ ID NO: 15 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man7 de *Bacillus hemicellulosilyticus*

SEQ ID NO: 16 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man7 de *Bacillus hemicellulosilyticus* sin péptido señal

SEQ ID NO: 17 La secuencia de nucleótidos de la *man14* de *Virgibacillus soli*

SEQ ID NO: 18 La secuencia de nucleótidos de la *man14* de *Virgibacillus soli* sin secuencia codificante de péptidos señal y con optimización de codones para *Trichoderma reesei*

SEQ ID NO: 19 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man14 de *Virgibacillus soli*

SEQ ID NO: 20 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man14 de *Virgibacillus soli* sin péptido señal

SEQ ID NO: 21 Secuencia del cebador oligonucleotídico BMAN1

SEQ ID NO: 22 Secuencia del cebador oligonucleotídico BMAN2

SEQ ID NO: 23 Secuencia del cebador oligonucleotídico BMAN3

SEQ ID NO: 24 Secuencia del cebador oligonucleotídico BMAN4

SEQ ID NO: 25 La secuencia de nucleótidos de *man31* de *Bacillus pumilus*

SEQ ID NO: 26 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man31 de *Bacillus pumilus*

SEQ ID NO: 27 La secuencia de nucleótidos de la *man32* de *Bacillus amyloliquefaciens*

SEQ ID NO: 28 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man32 de *Bacillus amyloliquefaciens*

SEQ ID NO: 29 La secuencia de nucleótidos de la *man33* de *Amphibacillus xylanus*

SEQ ID NO: 30 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man33 de *Amphibacillus xylans*

SEQ ID NO: 31 La secuencia de nucleótidos de la *man34* de *Paenibacillus polymyxa*

SEQ ID NO: 32 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man34 de *Paenibacillus polymyxa*

SEQ ID NO: 33 La secuencia de nucleótidos de la *man35* de *Bacillus hemicellulosilyticus*

SEQ ID NO: 34 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man35 de *Bacillus hemicellulosilyticus*

SEQ ID NO: 35 La secuencia de nucleótidos de la *man36* de *Bacillus alcalophilus*

SEQ ID NO: 36 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man36 de *Bacillus alcalophilus*

SEQ ID NO: 37 La secuencia de nucleótidos de la *man37* de *Bacillus* sp.

SEQ ID NO: 38 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man37 de *Bacillus* sp.

SEQ ID NO: 39 La secuencia de nucleótidos de la *man38* de *Bacillus circulans*

SEQ ID NO: 40 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man38 de *Bacillus circulans*

SEQ ID NO: 41 La secuencia de nucleótidos de la *man39* de *Paenibacillus* sp.

SEQ ID NO: 42 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man39 de *Paenibacillus* sp.

SEQ ID NO: 43 La secuencia de nucleótidos de la *man40* de *Bacillus circulans*

SEQ ID NO: 44 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man40 de *Bacillus circulans*

SEQ ID NO: 45 La secuencia de nucleótidos de la *man41* de *Bacillus nealsonii*

SEQ ID NO: 46 La secuencia de aminoácidos deducida de la Man41 de *Bacillus nealsonii*

SEQ ID NO: 47 La secuencia de nucleótidos de la *man42* de *Bacillus circulans*

SEQ ID NO: 48 La secuencia de nucleótidos de la Man42 de *Bacillus circulans*

Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, "aislada" significa una sustancia en una forma o entorno que no se produce en la naturaleza. Como ejemplos no limitativos de sustancias aisladas se incluyen (1) cualquier sustancia de origen no natural, (2) cualquier sustancia incluyendo cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se extrae, al menos parcialmente, de uno o más o de todos los constituyentes de origen natural con los que está asociado en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre relacionada con esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada al aumentar o disminuir la cantidad de la sustancia en relación con otros componentes con los que está asociada de forma natural (por ejemplo, producción recombinante

en una célula hospedadora); una o múltiples copias de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor alternativo al promotor asociado naturalmente con el gen que codifica la sustancia). En una realización un polipéptido, una enzima, un polinucleótido, una célula hospedadora o la composición de la invención está aislado(a).

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" incluye los significados más amplios de "que incluye", "que contiene" y "que comprende", así como las expresiones más limitadas "que consiste en" y "que consiste solo en".

- 10 Como se usa en el presente documento, "fragmento" significa una proteína o un polinucleótido que tiene delecionado uno o más aminoácidos o nucleótidos. En el contexto de ADN, un fragmento incluye tanto ADN monocatenario como bicatenario de cualquier longitud. Un fragmento puede ser un fragmento activo que tiene la función biológica, tal como actividad enzimática o actividad reguladora, de la proteína o del polinucleótido. Un fragmento también puede ser un fragmento inactivo, es decir, no tiene uno o más efectos biológicos de la proteína o polinucleótido natural.

- 15 Como se usa en el presente documento, "variante" significa un fragmento de secuencia (nucleótido o aminoácido) insertado o delecionado por uno o más nucleótidos/aminoácidos o que se modifica químicamente.

- 20 Como se usa en el presente documento, un "péptido" y un "polipéptido" son secuencias de aminoácidos que incluyen una pluralidad de restos de aminoácidos polimerizados consecutivos. Para los fines de la presente invención, los péptidos son moléculas que incluyen hasta 20 restos de aminoácidos, y los polipéptidos incluyen más de 20 restos de aminoácidos. El péptido o polipéptido puede incluir restos de aminoácidos modificados, restos de aminoácidos de origen natural no codificados por un codón, y restos de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en el presente documento, una "proteína" puede referirse a un péptido o a un polipéptido de cualquier tamaño. Una proteína puede ser una enzima, una proteína, un anticuerpo, una proteína de membrana, una hormona peptídica, un regulador, o cualquier otra proteína.

- 25 El término "polinucleótido" significa un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas.

- 30 Como se usa en el presente documento, "modificación", "modificado", y términos similares en el contexto de los polinucleótidos, se refieren a modificaciones en una región codificante o no codificante del polinucleótido, tal como una secuencia reguladora, una región 5' no traducida, una región 3' no traducida, un elemento genético de regulación positiva, un elemento genético de regulación negativa, un potenciador, un supresor, un promotor, una región exónica o intrónica. En algunas realizaciones la modificación puede ser solo estructural, sin efecto sobre el efecto, la acción o la función biológica del polinucleótido. En otras realizaciones, la modificación es una modificación estructural que proporciona un cambio en el efecto, la acción o la función biológica del polinucleótido. Dicha modificación puede potenciar, suprimir o cambiar la función biológica del polinucleótido.

- 35 Como se usa en el presente documento, "identidad" significa el porcentaje de coincidencias exactas de restos de aminoácidos entre dos secuencias alineadas sobre el número de posiciones donde hay restos presentes en ambas secuencias. Cuando una secuencia tiene un resto que no tiene resto correspondiente en la otra secuencia, el programa de alineación permite un espacio en la alineación, y esa posición no se cuenta en el denominador del cálculo de identidad. La identidad es un valor determinado con la herramienta de alineación de secuencias EMBOSS Needle en el sitio web de EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

- 40 Como se usa en el presente documento, "célula hospedadora" significa cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción, emparejamiento, cruce o similar con una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un polinucleótido. La expresión "célula hospedadora" abarca cualquier descendencia que no sea idéntica debido a las mutaciones que se producen durante la replicación. Son ejemplos no limitativos de una célula hospedadora las células fúngicas, las células fúngicas filamentosas de la División *Ascomycota* Subdivisión *Pezizomycotina*; preferentemente del grupo que consiste en miembros de la Clase *Sordariomycetes*, Subclase *Hypocreomycetidae*, Órdenes *Hypocreales* y *Microascales* y *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora* y *Humicola*; más preferentemente del grupo que consiste en las Familias *Hypocreaceae*, *Nectriaceae*, *Clavicipitaceae*, *Microascaceae*, y los géneros *Trichoderma* (anamorfo de *Hypocrea*), *Fusarium*, *Gibberella*, *Nectria*, *Stachybotrys*, *Claviceps*, *Metarhizium*, *Villosiclava*, *Ophiocordyceps*, *Cephalosporium* y *Scedosporium*; más preferentemente del grupo que consiste en *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), *T. citrinoviridae*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviridae*, *T. parareesei*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. venenatum*, *Gibberella fujikuroi*, *G. moniliformis*, *G. zeaeae*, *Nectria* (*Haematonectria*) *haematococca*, *Stachybotrys chartarum*, *S. chlorohalonata*, *Claviceps purpurea*, *Metarhizium acridum*, *M. anisopliae*, *Villosiclava virens*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Acremonium* (*Cephalosporium*) *chrysogenum*, y *Scedosporium apiospermum* y *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Myceliophthora thermophila*, *Humicola insolens*, y *Humicola grisea*, más preferentemente *Trichoderma reesei*. Son ejemplos no limitativos de una célula hospedadora, las células bacterianas, preferentemente bacilos grampositivos (por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*), *actinomycetales* (por ejemplo, *Streptomyces* sp.) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*)

En una realización de ejemplo de la célula hospedadora esta es una célula fúngica, preferentemente una célula fúngica filamentosa, tal como *Trichoderma* o *Trichoderma reesei*. En una realización de ejemplo de la célula hospedadora esta es una célula bacteriana, preferentemente una célula de *Bacillus* grampositivo, tal como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*.

Una "célula recombinante" o "célula hospedadora recombinante" se refiere a una célula o célula hospedadora que se ha modificado o alterado genéticamente para comprender una secuencia de ácido nucleico que no es natural para dicha célula o célula hospedadora. En una realización, la modificación genética comprende integrar el polinucleótido en el genoma de la célula hospedadora. En otra realización, el polinucleótido es exógeno en comparación con la célula hospedadora.

Como se usa en el presente documento, "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido en una célula hospedadora, incluyendo, pero sin limitación, transcripción, traducción, modificación postraducciona y secreción. La expresión puede ir seguida de la recolección, es decir, de la recuperación de las células hospedadoras o del producto expresado.

La expresión "vector de expresión" significa una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, un transportador y similares. Los vectores de expresión generalmente derivan de plásmidos o de ADN vírico, o pueden contener elementos de ambos. El vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión que esté convenientemente sujeto a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que se introducirá el vector. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en que se ha integrado.

La expresión "expresado recombinante" o "expresado de manera recombinante" utilizada en el presente documento en relación con la expresión de un polipéptido o proteína se define según la definición estándar en la técnica.

La expresión "obtenido de" y "obtenible" como se usa en el presente documento en relación con una fuente microbiana específica, significa que el polinucleótido y/o polipéptido se produce por la fuente específica (expresión homóloga), o por una célula en la que se ha insertado un gen de la fuente (expresión heteróloga).

La expresión "composición enzimática" significa un producto de fermentación enzimática convencional, posiblemente aislado y purificado, de una sola especie de un microorganismo, comprendiendo dicha preparación habitualmente diversas actividades enzimáticas diferentes; o una mezcla de enzimas monocomponentes, preferentemente enzimas derivadas de especies bacterianas o fúngicas utilizando técnicas recombinantes convencionales, cuyas enzimas se han fermentado y posiblemente aislado y purificado por separado y que pueden provenir de diferentes especies, preferentemente especies fúngicas o bacterianas o el producto de fermentación de un microorganismo que actúa como una célula hospedadora para la expresión de una mananasa recombinante, pero cuyo microorganismo produce simultáneamente otras enzimas.

La expresión "unidos operativamente", cuando se refiere a segmentos de ADN, significa que los segmentos están ordenados de modo que funcionen al unísono para sus propósitos previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento codificante hasta el terminador

El término "promotor" significa una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran, comúnmente, pero no siempre, en las regiones 5' no codificantes de los genes.

El término "secuencia señal secretora" significa una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como un componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula hospedadora en la que se sintetiza. La secuencia señal secretora puede ser natural o puede reemplazarse con una secuencia de señal secretora o secuencia transportadora de otra fuente. Dependiendo de la célula hospedadora, el péptido más grande puede escindirse para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

La expresión "región central" significa un dominio de una enzima que puede o no haberse modificado o alterado, pero que ha conservado su actividad original; el dominio catalítico tal como se conoce en la técnica ha permanecido funcional.

Por el término "enlazador" o "espaciador" se entiende un polipéptido que comprende al menos dos aminoácidos que pueden estar presentes entre los dominios de una proteína multidominio, por ejemplo, una enzima que comprende un

núcleo enzimático y un dominio de unión tal como un módulo de unión a carbohidratos (CBM, del inglés *carbohydrate binding module*) o cualquier otro híbrido de enzima, o entre dos proteínas o polipéptidos expresados como un polipéptido de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende dos enzimas núcleo. Por ejemplo, la proteína de fusión de un núcleo enzimático con un CBM se proporciona mediante la fusión de una secuencia de ADN que codifica el núcleo enzimático, una secuencia de ADN que codifica el enlazador y una secuencia de ADN que codifica el CBM secuencialmente en un marco de lectura abierto y que expresa esta construcción.

La expresión "composición de detergente", incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de lavado granulares o en polvo, multiuso o de uso industrial, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado líquidos, en gel o pasta, multiuso, especialmente los tipos de líquidos denominados de uso industrial (HDL, *heavy-duty liquid*); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes de lavado manual de vajilla o de lavado ligero de vajilla, especialmente los del tipo muy espumoso; agentes de lavavajillas, incluidos los diversos tipos de comprimidos, granulados, líquidos y ayudantes de aclarado de uso doméstico e institucional; agentes limpiadores líquidos y desinfectantes, champús para automóviles o alfombras, limpiadores de aseos; limpiadores de metales; así como auxiliares de limpieza, tales como los aditivos blanqueadores y los tipos de "barritas para manchas" o de tratamiento previo. Las expresiones "composición de detergente" y "formulación detergente" se utilizan en referencia a mezclas que están destinadas para su uso en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas realizaciones, las expresiones se utilizan en referencia a tejidos y/o prendas de lavado (por ejemplo, "detergentes de lavandería"). En realizaciones alternativas, las expresiones se refieren a otros detergentes, como los que se utilizan para lavar platos, cubertería, etc. (por ejemplo, "detergentes para lavavajillas"). No se pretende limitar la presente invención a ninguna formulación o composición de detergente particular. Se pretende que, además de las variantes según la invención, el término abarca detergentes que pueden contener, por ejemplo, tensioactivos, adyuvantes de detergencia, quelantes o agentes quelantes, sistemas o componentes blanqueadores, polímeros, acondicionadores de tejido, reforzadores de formación de espuma, supresores de espuma de jabón, tintes, perfumes, inhibidores de ennegrecimiento, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de la suciedad, agentes anticorrosivos, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, agentes azulantes y tintes fluorescentes, antioxidantes y solubilizantes.

El término "textil" significa cualquier material textil, incluyendo hilos, productos intermedios de hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos, y cualquier otro material textil, telas fabricadas de estos materiales y productos fabricados de telas (por ejemplo, prendas de vestir y otros artículos). El textil o la tela puede estar en forma de puntos, tejidos, telas vaqueras, tejidos no tejidos, fieltros, hilos y telas de toalla. El textil puede estar basado en celulosa, tal como celulosas naturales, incluyendo algodón, lino/tela de sábana, yute, ramio, sisal o celulosa de fibra de coco o artificial (por ejemplo, procedente de pulpa de madera), incluida la viscosa/el rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricel), lyocell o sus mezclas. El textil o la tela también puede tener una base no celulósica, como las poliamidas naturales, incluyendo lana, camello, cachemir, mohair, conejo y seda o polímeros sintéticos como el nailon, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y spandex/elastano, o mezclas de los mismos, así como una mezcla de fibras basadas y no basadas en celulosa. Son ejemplos de mezclas las mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales complementarios, como lana, fibras sintéticas (por ejemplo, fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de poli(cloruro de polivinilo), fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida) y fibras que contienen celulosa (por ejemplo, rayón/viscosa, ramio, lino/tela de sábana, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocell). La tela puede ser ropa convencional lavable, por ejemplo ropa de hogar sucia. Cuando se utiliza el término tela o prenda de vestir, se pretende incluir también los textiles en sentido más amplio.

El término "estabilidad" incluye estabilidad de almacenamiento y estabilidad durante el uso, por ejemplo, durante un proceso de lavado (en estabilidad de lavado) y refleja la estabilidad de la variante de proteasa según la invención en función del tiempo, por ejemplo, cuánta actividad se conserva cuando la proteasa se mantiene en solución, en particular en una solución de detergente. La estabilidad está influenciada por muchos factores, por ejemplo, el pH, la temperatura, la composición de detergente, por ejemplo, cantidad de adyuvante de detergencia, tensioactivos, etc. La estabilidad de la proteasa puede medirse utilizando el 'ensayo de estabilidad' descrito en el apartado de Materiales y Métodos del presente documento. La expresión "estabilidad mejorada" o "estabilidad aumentada", como se define en el presente documento, se refiere a una proteasa variante que muestra estabilidad aumentada en soluciones, en relación con la estabilidad de la proteasa precursora. Las expresiones "estabilidad mejorada" y "estabilidad aumentada" incluyen "estabilidad química mejorada", "estabilidad del detergente" o "estabilidad mejorada del detergente".

Composición de detergente

La presente invención se refiere a nuevas composiciones de detergente que comprenden enzimas mananasas bacterianas. Las composiciones de detergente que comprenden mananasas bacterianas son útiles en aplicaciones de lavandería y limpieza en las que se desea la degradación o modificación de manano. La invención también se refiere al uso de dichas composiciones de detergente en aplicaciones de lavandería y limpieza, así como a un método para degradar el manano.

Como se usa en el presente documento, el término "manano" se refiere a polisacáridos que consisten en una cadena principal de manosa ligadas entre sí por enlaces β -1,4 con cadenas laterales de galactosa fijadas a la cadena principal por enlaces α -1,6. Los mananos comprenden material vegetal, tal como goma guar y goma de algarrobo. Los glucomananos son polisacáridos que tienen una cadena principal de manosa y glucosa ligadas de manera alterna más o menos regularmente por enlaces β -1,4, los galactomananos y galactoglucomananos son mananos y glucomananos con ramificaciones laterales de galactosa unidas por enlaces alfa-1,6.

Como se usa en el presente documento, el término "mananasa" o "galactomananasa" significa una enzima mananasa definida según la técnica como manan endo-1,4-beta-manosidasa y que tiene los nombres alternativos beta-mananasa y endo-1,4-mananasa y cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-manosídicos en mananos, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos. Según la nomenclatura enzimática, las mananasas se clasifican como EC 3.2.1.78.

La "actividad mananasa", como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad degradativa de manano de un polipéptido. Degradar o modificar, como se usa en este documento, significa que la mananasa hidroliza las unidades de manosa del polisacárido de manano. La actividad degradativa de manano de los polipéptidos según la presente invención, puede someterse a ensayo según procedimientos de ensayo estándar conocidos en la técnica. El ejemplo 7 proporciona un ejemplo de un método estándar para determinar la actividad mananasa.

Según el primer aspecto, la composición de detergente de la presente invención comprende al menos una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 74 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 (Man7), en la que la al menos una enzima tiene actividad degradativa de manano.

En una realización de la invención, al menos una enzima tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

Las mananasas comprendidas en la composición de detergente de la invención son adecuadas para degradar y modificar materiales que contengan manano en diversos entornos químicos, preferentemente en composiciones de detergente.

En una realización de la presente invención, la composición de detergente comprende además una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, xantanasa, lacasa y/o peroxidasa, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas y lipasas.

En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deben ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debe(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

Celulasas

Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los siguientes géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* divulgadas en los documentos US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757 y WO 89/09259. Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Son ejemplos de dichas celulasas las celulasas descritas en los documentos EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, y WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa como las descritas en los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299. Son ejemplos de celulasas que exhiben actividad endo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) las que se describen en el documento WO02/099091. Otros ejemplos de celulasas incluyen la familia de celulasas 45 descrita en el documento WO96/29397, y especialmente variantes de las mismas que tienen sustituciones, inserciones y/o deleciones en una o más de las posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en la SEC ID N°: 8 del documento WO 02/099091: 2, 4, 7, 8, 10, 13, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 40, 42, 42a, 43, 44, 48, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 70, 72, 76, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 95d, 95h, 95j, 97, 100, 101, 102, 103, 113, 114, 117, 119, 121, 133, 136, 137, 138, 139, 140a, 141, 143a, 145, 146, 147, 150e, 150j, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160c, 160e, 160k, 161, 162, 164, 165, 168, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 188, 191, 192, 195, 196, 200 y/o 20, preferentemente seleccionadas entre P19A, G20K, Q44K, N48E, Q119H o Q146 R. Las celulasas disponibles en el comercio incluyen Celluclean™ Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500 (B)™ (Kao Corporation).

Proteasas

Las proteasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano, fúngico, vegetal, vírico o animal, por ejemplo, de origen vegetal o microbiano. Se prefieren las de origen microbiano. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede ser, por ejemplo, de la familia S1, tal como tripsina, o de la familia S8, tal como subtilisina. Una proteasa de las metaloproteasas puede ser, por ejemplo, una termolisina, por ejemplo, la familia M4 u otra metaloproteasa, tal como la de las familias M5, M7 o M8.

El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasas según Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las serina proteasas son un subgrupo de proteasas caracterizado por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas pueden dividirse en 6 subdivisiones, es decir, la familia Subtilisina, la familia Termitasa, la familia Proteinasa K, la familia de peptidasas Lantibióticas, la familia Kexina y la familia Pirolisina. Son ejemplos de subtilasas las derivadas de *Bacillus* tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en los documentos; US7262042 y WO09/021867, y *subtilisina lentus*, *subtilisina novo*, *subtilisina Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, *subtilisina BPN'*, *subtilisina 309*, *subtilisina 147* y *subtilisina 168* descritas en el documento WO89/06279 y proteasa PD138 descrita en el documento (WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser las descritas en los documentos WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Los ejemplos de proteasas del tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en los documentos WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372, y las proteasas de quimotripsina derivadas de *Cellomonas* descritas en los documentos WO05/052161 y WO05/052146. Una proteasa adicional preferida es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, que se describe, por ejemplo, en el documento WO95/23221, y variantes de la misma, que se describen en los documentos WO92/21760, WO95/23221, EP1921147 y EP1921148. Los ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra que se describe en el documento WO07/044993 (Genencor Int.) tal como las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Los ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en los documentos: WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración BPN'. Las variantes de subtilasas más preferidas pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S, R, *97E, A98S, S99G, D, A, S99AD, S101G, M, R S103A, V104I, Y, N, S106A, G118V, R, H120D, N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (utilizando la numeración BPN'). Las enzimas proteasas adecuadas, disponibles en el comercio, incluyen las comercializadas con las marcas registradas Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase® Ultra, Ovozime®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® y Esperase® (Novozymes A/S), las comercializadas con la marca registrada Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Purafect Prime®, Preferenz™, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Buen ase®, Effectenz™, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Opticlean® y Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (GistBrocades N.V.), BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 del documento US5352604) y variantes de las mismas (Henkel AG) y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus*) de Kao.

Lipasas y Cutinasas

Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen enzimas mutantes modificadas químicamente o modificadas por proteínas. Los ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (previamente denominada *Humicola lanuginosa*) como se describe en los documentos EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora han cambiado su nombre a *Burkholderia*), por ejemplo, *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272) *P. cepacia* (EP331376), cepa SD705 de *P. sp* (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas de *Streptomyces* de tipo GDLS (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US 5.389.536), lipasa de *Termobifida fusca* (WO11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaeae* (WO12/137147).

Otros ejemplos son variantes de lipasa, tales como las descritas en los documentos EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

Los productos de lipasa comerciales preferidos incluyen Lipolase™, Lipex™, Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

Otros ejemplos más son lipasas a veces denominadas aciltransferasas o perhidrolasas, por ejemplo, aciltransferasas con homología a lipasa A de *Candida antárctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis*, en

particular la variante S54V utilizada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

Amilasas

Las amilasas adecuadas que pueden utilizarse junto con variantes de subtilasa de la invención pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en el

documento GB 1.296.839. Las amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEQ ID NO: 3 en el documento WO 95/10603 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 3 de la misma. Las variantes preferidas se describen en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 y la SEQ ID NO: 4 del documento WO 99/019467, como variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444. Diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEC ID N°: 6 en el documento WO 02/010355 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la misma. Las variantes preferidas son las que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

Otras amilasas que son adecuadas, son las alfa-amilasas híbridas que comprenden los restos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrados en la SEC ID N°: 6 del documento WO 2006/066594 y los restos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. liqueniforme* mostrados en la SEC ID N°: 4 del documento WO 2006/066594 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la misma. Las variantes preferidas de esta alfa-amilasa híbrida son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, 1201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida que comprenden los restos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrados en la SEC ID N°: 6 del documento WO 2006/066594 y los restos 36-483 de la SEC ID N°: 4 del documento WO2006 / 066594 son las que tienen las sustituciones:

M197T;

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S; o

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S.

Otras amilasas que son adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 6 en el documento WO 99/019467 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 6. Las variantes preferidas de SEQ ID NO: 6 son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 y K269. Son amilasas particularmente preferidas las que tienen una delección en las posiciones R181 y G182, o en las posiciones H183 y G184. Otras amilasas que pueden utilizarse son las que tienen la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 del documento WO 96/023873 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7. Variantes preferidas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7 son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 y 476. Las variantes más preferidas son las que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 o en las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 son las que tienen una delección en las posiciones 183 y 184 y una sustitución en una o más de las posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

Otras amilasas que pueden utilizarse son amilasas que tienen la SEC ID N°: 2 del documento WO 08/153815, la SEQ ID NO: 10 en el documento WO 01/66712 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 08/153815 o una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 10 en el documento WO 01/66712. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 10 en el documento WO 01/66712 son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 y 264. Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 del documento WO 09/061380 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 2 de la misma. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 2 son las que tienen un truncamiento del extremo C y/o una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 y G475. Las variantes más preferidas de la SEQ ID NO: 2 son las que tienen la sustitución en una o más de las siguientes posiciones: Q87E,R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L, T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R, S243Q,A,E,D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E y G475K y/o la delección en la posición R180 y/o S181 o de T182 y/o G183. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 2 son las que tienen las sustituciones:

N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;

N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;

S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K; o

S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K en las que las variantes están truncadas en el extremo C y opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 243 y/o una delección en la posición 180 y/o posición 181.

Otras amilasas adecuadas son las alfa-amilasas que tienen la SEQ ID NO: 12 en el documento WO01/66712 o una variante que tiene al menos una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 12. Las variantes de amilasa preferidas son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de la SEC ID N°: 12 en el documento WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. Las amilasas preferidas particulares incluyen variantes que tienen una delección de D183 y G184 y que tienen las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K, y una variante que adicionalmente tiene sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y A339, lo más preferido es una variante que adicionalmente tiene sustituciones en todas estas posiciones. Otros ejemplos son variantes de amilasa como las descritas en los documentos WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

Las amilasas disponibles en el comercio son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A / S), y Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase y Preferenz S100 (de Genencor International Inc./DuPont).

Peroxidasas/Oxidasas

Las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Como ejemplos de peroxidasas útiles se incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus* y variantes de las mismas como las descritas en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

Las peroxidasas disponibles en el comercio incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

La enzima (o enzimas) de detergente puede incluirse en una composición de detergente añadiendo aditivos individuales que contengan una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo individual o un aditivo combinado, puede formularse, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una pasta semilíquida, etc. Las formulaciones de aditivos de detergentes preferidas son granulados, en particular, granulados no en polvo, líquidos, en particular, líquidos o pastas semilíquidas estabilizados.

Pueden producirse granulados no en polvo, por ejemplo, como se describe en los documentos US 4.106.991 y 4.661.452 y pueden recubrirse opcionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Son ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos los productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1 000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di y triglicéridos de ácidos grasos. En el documento GB 1483591 se ofrecen ejemplos de materiales de recubrimiento formadores de película adecuados para su aplicación mediante técnicas de lecho fluido. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Pueden prepararse enzimas protegidas según el método desvelado en el documento EP 238.216.

Una composición para su uso en detergentes sólidos de lavandería, por ejemplo, puede incluir de 0,000001 % a 5 %, tal como de 0,000005 % a 2 %, tal como de 0,00001 % a 1 %, tal como de 0,00001 % a 0,1 % de proteína enzimática en peso de la composición.

Una composición para su uso en detergentes líquidos de lavandería, por ejemplo, puede incluir de 0,000001 % a 3 %, tal como de 0,000005 % a 1 %, tal como de 0,00001 % a 0,01 % de proteína enzimática en peso de la composición.

Una composición para su uso en lavavajillas automático, por ejemplo, puede incluir de 0,000001 % a 5 %, tal como de 0,000005 % a 2 %, tal como de 0,00001 % a 1 %, tal como de 0,00001 % a 0,1 % de proteína enzimática en peso de la composición.

La enzima (o enzimas) de la composición de detergente de la invención puede estabilizarse utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol, tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico, tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede formularse como se describe, por ejemplo, en los documentos WO92/19709 y WO92/19708.

En una realización, la invención está dirigida a composiciones de detergente que comprenden una enzima de la presente invención en combinación con uno o más componentes adicionales de la composición de limpieza. La elección de componentes adicionales se incluye en las competencias del experto en la técnica e incluye ingredientes convencionales, incluyendo los componentes no limitativos ejemplares expuestos a continuación.

La elección de componentes puede incluir, para el cuidado textil, tener en cuenta el tipo de textil que se va a limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la que se realizará la limpieza y la formulación del producto de detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación se clasifican mediante un encabezamiento general

según una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación, ya que los componentes pueden comprender funcionalidades adicionales como apreciarán los expertos en la técnica.

1. Tensioactivos

La composición de detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una realización particular, la composición de detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y de uno o más tensioactivos aniónicos. Normalmente, el tensioactivo (o tensioactivos) está presente a un nivel de aproximadamente 0,1 % a 60 % en peso, tal como de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 20 %, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 10 %. El tensioactivo (o tensioactivos) se selecciona en función de la aplicación de limpieza deseada, e incluye cualquier tensioactivo (o tensioactivos) convencional conocido en la técnica. Para uso en detergentes, puede utilizarse cualquier tensioactivo conocido en la técnica.

Cuando se incluye en esta composición, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % en peso, tal como de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, incluyendo de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 %, o de aproximadamente 20 % a aproximadamente 25 % de un tensioactivo aniónico. Como ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos se incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), sulfonatos de olefina, sulfonatos de alqueno, alcano-2,3-diilbis (sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), etersulfatos de alcohol (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcohol o éter sulfatos de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), parafina sulfonatos (PS), éster sulfonatos, ésteres de glicerol de ácido graso sulfonado, esteres metílicos de alfa-sulfo ácidos grasos (alfa-SFMe o SES), incluyendo éster sulfonato de metilo (MES), ácido alquil- o alquenilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

Cuando se incluye en esta composición, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 0 % a aproximadamente 10 % en peso de un tensioactivo catiónico. Como ejemplos no limitativos de tensioactivos catiónicos se incluyen alquildimetilanolamina quat (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetilidistearilamonio (DSDMAC) y alquilbencildimetilamonio, compuestos de alquil amonio cuaternario, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado (AQA) y combinaciones de los mismos.

Cuando se incluye en esta composición, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 40 % en peso de un tensioactivo no iónico, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 30 %, en particular de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 10 %, tal como de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, o de aproximadamente 8 % a aproximadamente 12 %. Como ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos se incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres alquílicos de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglicósidos (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM), amidas de ácidos grasos de polihidroxialquilo o derivados de N-acil N-alquil glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácidos grasos, FAGA), así como los productos disponibles con las marcas registradas SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

Cuando se incluye en esta composición, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 0 % a aproximadamente 10 % en peso de un tensioactivo semipolar. Como ejemplos no limitativos de tensioactivos semipolares se incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de N-(coco alquil)-N, N-dimetilamina y óxido de N-(sebo-alquil)-N,N-bis(2-hidroxietil) amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

Cuando se incluye en esta composición, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 0 % a aproximadamente 10 % en peso de un tensioactivo zwitteriónico. Como ejemplos no limitativos de tensioactivos zwitteriónicos se incluyen betaína, alquildimetilbetaína, sulfobetaína, y combinaciones de las mismas.

2. Hidrótropos

Un hidrótrofo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrófobos en soluciones acuosas (o, por el contrario, sustancias polares en un entorno no polar). Normalmente, los hidrótrofos tienen un carácter tanto hidrófilo como hidrófobo (las denominadas propiedades anfífilas conocidas de los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótrofos generalmente no favorece la autoagregación espontánea. Los hidrótrofos no muestran una concentración crítica por encima de la cual se produce una autoagregación como la que se encuentra en los tensioactivos y los lípidos que forman mesofases micelares, lamelares u otras bien definidas. En su lugar, muchos

hidrótrópos muestran un proceso de agregación de tipo continuo en el que los tamaños de los agregados crecen a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótrópos alteran el comportamiento de las fases, la estabilidad y las propiedades coloidales de sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluyendo mezclas de agua, aceite, tensioactivos y polímeros. Los hidrótrópos se utilizan clásicamente en todas las industrias, desde aplicaciones farmacéuticas, cuidado personal, alimentos, hasta aplicaciones técnicas. El uso de hidrótrópos en composiciones de detergente permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos mediante la eliminación de agua) sin inducir fenómenos no deseados, como la separación de fases o la alta viscosidad.

El detergente puede contener 0-5 % en peso, tal como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 %, o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, de un hidrótrópo. Se puede utilizar cualquier hidrótrópo conocido en la técnica para su uso en detergentes. Como ejemplos no limitativos de hidrótrópos se incluyen benceno sulfonato sódico, p-tolueno sulfonato sódico (STS), xileno sulfonato sódico (SXS), cumeno sulfonato sódico (SCS), cimen sulfonato sódico, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato sódico, hidroxinaftaleno sulfonato sódico, etilhexil sulfato sódico y combinaciones de los mismos.

3. Adyuvantes y coadyuvantes (de detergencia)

La composición de detergente puede contener aproximadamente 0-65 % en peso, tal como aproximadamente de 5 % a aproximadamente 45 % de un adyuvante y coadyuvante de detergencia, o una mezcla de los mismos. En un detergente para lavavajillas, normalmente el nivel del adyuvantes es de 40-65 %, particularmente de 50-65%. El adyuvante y coadyuvante puede ser particularmente un agente quelante que forme complejos solubles en agua con Ca y Mg. Para su uso en detergentes para la ropa, puede utilizarse cualquier adyuvante y coadyuvante conocido en la técnica. Como ejemplos no limitativos de adyuvantes se incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos, tal como trifosfato sódico (STP o STPP), carbonatos, tal como carbonato sódico, silicatos solubles tal como metasilicato sódico, silicatos en capas (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas, tal como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2"-nitrilotrietanol), y carboximetil inulina (CMI), y combinaciones de los mismos.

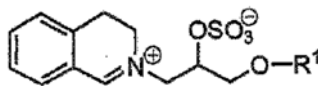
La composición de detergente también puede contener 0-20 % en peso, tal como aproximadamente de 5 % a aproximadamente 10 %, de un adyuvante de detergente, o una mezcla de los mismos. La composición de detergente puede incluir un coadyuvante solo, o en combinación con un adyuvante, por ejemplo un adyuvante de zeolita. Como ejemplos no limitativos de coadyuvantes se incluyen homopolímeros de poliácridatos o copolímeros de los mismos, tales como ácido(poliacrílico) (PAA) o ácido (copoliacrílico/maleico) (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitativos incluyen citrato, quelantes, tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil o alquénilsuccínico. Como ejemplos específicos adicionales se incluyen ácido 2,2',2"-nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido glutámico-ácido N,N-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido etilendiaminotetra-(metilfosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriaminopentakis(metilfosfónico) (DTPMPA o DTPMP), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-ácido N-monoacético (ASMA), ácido aspártico-ácido N,N-diacético (ASDA), ácido aspártico-ácido N-monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil)-aspártico(SMAS), ácido N-(2-sulfoetil)-aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil)-glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil)-glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido α-alanin-N,N-diacético (α-ALDA), ácido serin-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserin-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanin-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico-ácido N,N-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-ácido N,N-diacético (SLDA), ácido taurin-N,N-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA), ácido N-(2-hidroxietil)-etilendiamino-N,N'-triacético (HEDTA), dietanoglicina (DEG), ácido dietilentriamina penta (metilfosfónico)(DTPMP), ácido aminotris(metilfosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales de los mismos. Por ejemplo, en los documentos WO 09/102854 y US 5977053 se describen otros ejemplos de adyuvantes y/o coadyuvantes

4. Sistemas de blanqueamiento

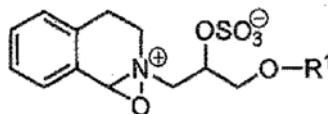
El detergente puede contener 0-50 % en peso, tal como aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 25 %, de un sistema de blanqueamiento. Para su uso en detergentes de lavandería, puede utilizarse cualquier sistema de blanqueamiento conocida en la técnica. Los componentes adecuados del sistema de blanqueamiento incluyen catalizadores de blanqueamiento, fotoblanqueadores, activadores de blanqueamiento, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y mezclas de los mismos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero sin limitación, ácidos peroxicarboxílicos y sales, ácidos percarbónicos y sales, ácidos perimidicos y sales, ácidos peroximonosulfúricos y sales, por ejemplo, oxona (R) y mezclas de los mismos. Como ejemplos no limitativos de sistemas de blanqueamiento se incluyen sistemas de blanqueamiento basados en peróxido, que puede comprender, por ejemplo, una sal inorgánicas, incluidas las sales de metales alcalinos, tales como sales de perborato de sodio (generalmente mono- o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persilicato, en combinación con un activador blanqueante de formación de perácido. En el presente documento, por activador blanqueante se entiende un compuesto que reacciona con el blanqueador de peróxígeno tipo peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido formado de este modo constituye el

blanqueador activado. Los activadores blanqueantes adecuados para su uso en el presente documento incluyen los que pertenecen a la clase de ésteres de amidas, imidas o anhídridos. Son ejemplos adecuados la tetracetiletilendiamina (TAED), sodio 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]benzenosulfonato (ISONOBS), ácido diperoxi dodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)benzenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benzenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi)benzenosulfonato (NOBS) y/o los descritos en el documento WO98/17767. Una familia particular de activadores blanqueantes de interés se desvela en el documento EP624154 y se prefiere particularmente en esa familia el acetil trietil citrato (ATC). El ATC, o un triglicérido de cadena corta como la triacetina, tiene la ventaja de que es ecológico ya que con el tiempo se degrada en ácido cítrico y alcohol. Además, el acetil trietil citrato y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto durante el almacenamiento y es un activador blanqueante eficaz. Por último, el ATC proporciona una buena capacidad adyuvante al aditivo de lavandería. Como alternativa, el sistema de blanqueamiento puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, del tipo amida, imida o sulfona. El sistema de blanqueamiento también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftalimino)peroxihexanoico (PAP). El sistema de blanqueamiento también puede incluir un catalizador blanqueante. En algunas realizaciones, el componente blanqueante puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

(i)



(ii)



(iii) y mezclas de los mismos; en las que cada R¹ es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferentemente cada R¹ es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferentemente cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo. Se describen otros sistemas de blanqueamiento ejemplares, por ejemplo, en los documentos WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 y WO2007/087242. Por ejemplo, la ftalocianina de zinc sulfonada puede ser un fotoblanqueador adecuado

5. Polímeros

El detergente puede contener 0-10 % en peso, tal como 0,5-5 %, 2-5 %, 0,5-2 % o 0,2-1 % de un polímero. Para su uso en detergentes puede utilizarse cualquier polímero conocido en la técnica. Como se ha mencionado anteriormente, el polímero puede funcionar como un coadyuvante o puede proporcionar propiedades contra la redeposición, protección de fibra, eliminación de suciedad, inhibición de la transferencia de tintes, limpieza de grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos mencionados a continuación. Los polímeros ejemplares incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), alcohol(polivinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetil inulina (CMI) y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poli-aspartico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico, CMC modificada hidrofólicamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de oxietileno) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridin-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Otros polímeros ejemplares incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxi sulfato dicuaternario. Otros polímeros ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento WO 2006/130575. También se contemplan las sales de los polímeros mencionados anteriormente.

6. Agentes de coloración de tela

Las composiciones de detergente de la presente invención también pueden incluir agentes de coloración de tela tales como tintes o pigmentos, que cuando se formulan en composiciones de detergente pueden depositarse sobre una tela cuando dicha tela se pone en contacto con un líquido de lavado que comprende dichas composiciones de detergente y, por lo tanto, altera el tinte de dicha tela a través de la absorción/reflexión de la luz visible. Los agentes de blanqueamiento fluorescentes emiten al menos algo de luz visible. Por el contrario, los agentes de coloración de tela

alteran el tinte de una superficie al absorber al menos una parte del espectro de luz visible. Los agentes de coloración de tela adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte y arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos. Los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en tintes que se encuentran en las clasificaciones del Índice de Color (IC) de Direct Blue, rojo directo, violeta directo, azul ácido, rojo ácido, violeta ácido, azul básico, violeta básico y rojo básico, o mezclas de los mismos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226 (incorporados por referencia en el presente documento). Preferentemente, la composición de detergente comprende de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso, de aproximadamente 0,00008 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,04 % en peso de agente de coloración de tela. La composición puede comprender de 0,0001 % en peso a 0,2 % en peso de agente de coloración de tela, esto puede ser especialmente preferido cuando la composición está en forma de una bolsa de una sola dosis. Agentes de coloración adecuados también se desvelan, por ejemplo, en los documentos WO 2007/087257 y WO2007/087243.

7. Materiales complementarios

Para su uso en detergentes de lavandería también puede utilizarse cualquier componente de detergente conocido en la técnica. Otros componentes de detergente opcionales incluyen agentes contra la corrosión, agentes contra el encogimiento, agentes contra la redeposición de manchas, agentes contra las arrugas, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de la corrosión, agentes desintegrantes/disgregantes, tintes, estabilizadores enzimáticos (incluido el ácido bórico, boratos, CMC, y/o polioles tal como propilenglicol), acondicionadores de telas incluyendo arcillas, rellenos/ayudantes de procesamiento, agentes de blanqueamiento fluorescentes/abrillantadores ópticos, reforzadores de formación de espuma, reguladores de espuma (espuma de jabón), perfumes, agentes de suspensión de la suciedad, suavizantes, supresores de espuma de jabón, inhibidores de ennegrecimiento y agentes percolantes, en solitario o en combinación. Para uso en detergentes de lavandería puede utilizarse cualquier ingrediente conocido en la técnica. La elección de dichos ingredientes se incluye en las competencias del experto en la técnica.

Dispersantes: Las composiciones de detergente de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos solubles en agua adecuados incluyen ácidos homo o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc., se describen dispersantes adecuados.

Agentes inhibidores de transferencia de tinte: Las composiciones de detergente de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de transferencia de tinte. Como agentes inhibidores de transferencia de tinte poliméricos adecuados se incluyen, pero sin limitación, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en una composición objeto de estudio, los agentes inhibidores de transferencia de tinte pueden estar presentes a niveles de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3 % en peso de la composición.

Agente blanqueador fluorescente: Las composiciones de detergente de la presente invención también contendrán, preferentemente, componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se va a limpiar, tales como agentes de blanqueamiento fluorescentes o abrillantadores ópticos. Cuando está presente, el abrillantador está preferentemente a un nivel de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,5 %. En la composición de la presente invención puede utilizarse cualquier agente blanqueador fluorescente adecuado para uso en una composición de detergente de lavandería. Los agentes de blanqueamiento fluorescentes que se utilizan más frecuentemente son los que pertenecen a las clases de derivados de ácido diaminoestilbensulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenil-distirilo. Ejemplos de agentes de blanqueamiento fluorescentes del tipo de los derivados de ácido diaminoestilbensulfónico, incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triacin-6-ilamino) estilben-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilben-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato y 2-(estilbil-4"-nafto-1,2':4,5)-1,2,3-trizol-2"-sulfonato. Los agentes de blanqueamiento fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS, disponibles en Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de 4,4'-bis-(2-morfolino-4 anilino-s-triacin-6-ilamino) estilbeno disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenil-estiril) disulfonato. También preferidos son los agentes de blanqueamiento fluorescentes como Parawhite KX disponible en el comercio, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Bombay, India. Otros fluorescentes adecuados para su uso en la invención incluyen las 1-3-diaril pirazolininas y las 7-alquilaminocumarinas. Los niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente 0,01 % en peso, de 0,05, de aproximadamente 0,1 o incluso de aproximadamente 0,2 % en peso a niveles superiores de 0,5 o incluso de 0,75 % en peso.

Polímeros de eliminación de suciedad: Las composiciones de detergente de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros de eliminación de suciedad que ayudan a eliminar la suciedad de telas tales como telas a base de algodón y poliéster, en particular, la eliminación de suciedad hidrófoba de telas a base de poliéster. Los

polímeros de eliminación de suciedad pueden ser, por ejemplo, polímeros no iónicos o aniónicos, basados en tereftalto, polivinil caprolactama y copolímeros relacionados, copolímeros de injerto de vinilo, poliamidas de poliéster, véase, por ejemplo, el Capítulo 7 en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros de eliminación de suciedad son polímeros anfífilos, alcoxilados que limpian la grasa, que comprenden una estructura central y una pluralidad de grupos alcoxilato fijados a esa estructura central. La estructura central puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en el documento WO 2009/087523 (incorporado por referencia en el presente documento). Además, los copolímeros de injerto aleatorio son polímeros de eliminación de suciedad adecuados. En el documento WO 2007/138054 se describen con más detalle copolímeros de injerto adecuados WO 2006/108856 y WO 2006/113314 (incorporados por referencia en el presente documento). Otros polímeros de eliminación de suciedad son estructuras polisacáridicas sustituidas, especialmente estructuras de celulosa sustituidas, tales como derivados de celulosa modificados, tales como los descritos en los documentos EP 1867808 o WO 2003/040279 (ambos incorporados por referencia en el presente documento). Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de las mismas. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa aniómicamente modificada, celulosa no aniómicamente modificada, celulosa catiónicamente modificada, celulosa zwitteriionalmente modificada, y mezclas de las mismas. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa, y mezclas de las mismas.

Agentes contra la redeposición: Las composiciones de detergente de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes contra la redeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico, y polietileniminas etoxiladas. Los polímeros basados en celulosa descritos anteriormente como polímeros de eliminación de suciedad, también pueden funcionar como agentes contra la redeposición.

Otros materiales complementarios adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, transportadores, tintes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes de tela, cargas, reguladores de espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de espuma de jabón, disolventes y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastizantes de estructura.

En una realización adicional de la presente invención, la composición de detergente está en forma de una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido regular, compacto o concentrado. En una realización, la composición de detergente puede ser una composición de detergente de lavandería, preferentemente una composición de detergente de lavandería líquida o sólida. Existen diversas formas de formulación de detergentes, tales como capas (fases iguales o diferentes), bolsitas, así como formas para unidades de dosificación de lavadora.

Las bolsitas pueden configurarse como compartimentos individuales o múltiples. Pueden tener cualquier forma, configuración y material que sea adecuado para contener la composición, por ejemplo, que no permita liberar la composición de la bolsa antes de que entre en contacto con el agua. La bolsa está fabricada de una película soluble en agua que encierra un volumen interior. Dicho volumen interior puede dividirse en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferentemente polímeros que se forman en una película o lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados preferidos de los mismos son poliacrilatos seleccionados, y copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil metil celulosa, malto dextrina, polimetacrilatos, lo más preferentemente copolímeros de alcohol polivinílico e, hidroxipropil metil celulosa (HPMC). Preferentemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo PVA, es de al menos aproximadamente 60 %. Normalmente, el peso molecular promedio preferido será de aproximadamente 20 000 a aproximadamente 150 000. Las películas también pueden ser de composiciones de mezcla que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua, tales como polilactida y alcohol polivinílico (conocido con la referencia comercial M8630, comercializado por Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind., EE. UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsitas pueden comprender una composición de detergente de lavandería sólida o componentes de partes y/o una composición de limpieza líquida o componentes de partes separados por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente a la de los compartimentos que contienen sólidos. Ref: (US2009/0011970 A1).

Los ingredientes de detergente pueden separarse físicamente entre sí mediante compartimentos en bolsitas disolubles en agua o en diferentes capas de comprimidos. De este modo, se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Los diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución retardada de los componentes seleccionados en la solución de lavado.

Un detergente líquido o en gel que no es una unidad dosificada, puede ser acuoso, que normalmente contiene al menos 20 % en peso y hasta 95 % de agua, tal como hasta aproximadamente 70 % de agua, hasta aproximadamente 65 % de agua, hasta aproximadamente 55 % de agua, hasta aproximadamente 45 % de agua, hasta aproximadamente el 35 % de agua. Otros tipos de líquidos, incluyendo, sin limitación, alcoholes, aminas, dioles, éteres y polioles, pueden

incluirse en un líquido o gel acuoso. Un detergente líquido acuoso o en gel puede contener de 0 a 30 % de disolvente orgánico. Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

Las composiciones de detergente de la presente invención pueden proporcionarse en forma de pastillas de jabón de lavandería y utilizarse para lavar a mano la ropa, telas y/o textiles. El término pastilla de jabón de lavandería incluye pastillas de lavandería, pastillas de jabón, pastillas combinadas, pastillas syndet (tensioactivos sintéticos) y pastillas de detergente. Los tipos de pastillas generalmente difieren en el tipo de tensioactivo que contienen, y la expresión pastilla de jabón de lavandería incluye pastillas que contienen jabones de ácidos grasos y/o jabones sintéticos. La pastilla de jabón de lavandería tiene una forma física que es sólida y no líquida, en gel o en polvo a temperatura ambiente. El término sólido se define como una forma física que no cambia significativamente con el tiempo, es decir, si un objeto sólido (por ejemplo, una pastilla de jabón de lavandería) se coloca dentro de un recipiente, el objeto sólido no cambia al llenar el recipiente en el que se coloca. La pastilla es un sólido normalmente en forma de pastilla, pero puede tener otras formas sólidas, tales como redondeadas u ovaladas.

La pastilla de jabón de lavandería puede contener una o más enzimas adicionales, inhibidores de proteasa, tales como aldehídos peptídicos (o aducto de hidrosulfito o aducto de hemiacetal), ácido bórico, borato, derivados de bórax y/o ácido fenilborónico, tal como el ácido 4-formilfenilborónico, uno o más jabones o tensioactivos sintéticos, polioles, tales como glicerina, compuestos que controlan el pH, tales como ácidos grasos, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido fórmico, y/o una sal de un catión monovalente y un anión orgánico en la que el catión monovalente puede ser, por ejemplo, Na⁺, K⁺ o NH₄⁺ y el anión orgánico puede ser, por ejemplo, formato, acetato, citrato o lactato de manera que la sal de un catión monovalente y un anión orgánico pueda ser, por ejemplo, formiato sódico.

La pastilla de jabón de lavandería también puede contener agentes complejantes como EDTA y HEDP, perfumes y/o diferentes tipos de cargas, tensioactivos, por ejemplo, tensioactivos sintéticos aniónicos, adyuvantes, agentes poliméricos de eliminación de suciedad, quelantes detergentes, agentes estabilizantes, cargas, tintes, colorantes, inhibidores de transferencia de tinte, policarbonatos alcoxilados, supresores de espumas, estructurantes, aglutinantes, agentes de lixiviación, activadores de blanqueamiento, agentes de eliminación de suciedad arcillosa, agentes contra la redeposición, agentes dispersantes poliméricos, abrillantadores, suavizantes de tela, perfumes y/u otros compuestos conocidos en la técnica.

La pastilla de jabón de lavandería puede procesarse en aparatos convencionales de fabricación de pastillas de jabón de lavandería, tales como, sin limitación: mezcladoras, empastilladoras, por ejemplo, una empastilladora de vacío bifásica, extrusoras, cortadoras, logo estampadoras, túneles de enfriamiento y empacadoras. La invención no se limita a preparar las pastillas de jabón de lavandería mediante un solo método. La premezcla de la invención puede añadirse al jabón en diferentes fases del proceso. Por ejemplo, la premezcla que contiene un jabón, una enzima, opcionalmente una o más enzimas adicionales, un inhibidor de proteasa y una sal de un catión monovalente y un anión orgánico, puede prepararse y, después, la mezcla se empastilla. La enzima y enzimas adicionales opcionales pueden añadirse al mismo tiempo que el inhibidor de proteasa, por ejemplo, en forma líquida. Además de la etapa de mezclar y de empastillar, el proceso puede comprender además las siguientes etapas de molienda, extrusión, corte, estampado, enfriamiento y/o empacado.

La presente invención se refiere además a diferentes usos de la composición de detergente como se describe en este documento, tal como para degradar mananos y para su uso en un proceso de lavandería.

La presente invención se refiere además a un método para eliminar una mancha de una superficie, que comprende poner en contacto la superficie con una composición de detergente como se describe en el presente documento.

La presente invención también se refiere a un método para degradar manano que comprende aplicar al manano una composición de detergente como se describe en el presente documento, en el que, preferentemente, el manano está en la superficie de un textil. Al degradar el manano fijado al textil o tejido, la mancha o suciedad unida al manano se elimina y no puede volver a unirse al manano o a las manchas de manano.

En una realización de la presente invención, la mananasa comprendida en la composición de detergente de la presente invención, tiene una actividad relativa de al menos 30 % en el intervalo de temperatura de 45 °C a 65 °C. Proporcionar mananasas que conserven su actividad a temperaturas superiores a la temperatura ambiente y en pH ácido, es ventajoso para aplicaciones en las que se requiere la degradación de manano en dichas condiciones.

En una realización, la mananasa comprendida en las composiciones de detergente de la presente invención, hidroliza al azar los enlaces endo-beta-1,4-manosídicos.

En una realización, la mananasa comprendida en las composiciones de detergente de la presente invención, puede obtenerse o derivar de una fuente bacteriana.

En una realización, la mananasa comprendida en las composiciones de detergente de la presente invención, se fusiona con al menos un polipéptido adicional, formando así un polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión o el polipéptido adicional pueden tener otras actividades catalíticas o de unión además de las de la mananasa. En una realización, el

polipéptido adicional comprende o consiste en un módulo de unión a carbohidratos, que es opcionalmente un fragmento de otra proteína o enzima derivada del mismo o diferente organismo que la mananasa. La mananasa puede conectarse al polipéptido adicional con un enlazador.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar varios aspectos de la presente invención. Con estos ejemplos no se pretende limitar la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

- 10 Aunque los siguientes ejemplos están relacionados con tres proteínas mananasas diferentes, se considera que la proteína mananasa Man7 es la nueva mananasa según la presente invención.

Ejemplo 1: Exploración

- 15 Para la identificación de nuevas beta-1,4-mananasas se exploraron bases de datos públicas (NCBI, EBI) y se seleccionaron genomas de propiedad exclusiva y públicos. Todos los genomas de propiedad exclusiva y públicos utilizados en este trabajo se muestran en la Tab. 1. Todos los aciertos se agruparon y finalmente se seleccionaron 15 genes de origen bacteriano para la clonación en *Bacillus* en función de la distancia filogenética entre ellos (Tabla 2)

- 20 Tabla 1: Lista de genomas de propiedad exclusiva y públicos utilizados para la exploración de beta-1,4-mananasas

Especie	Cepa	Fuente
<i>Bacillus pumilus</i>	MS8	ABE
<i>Amphibacillus xylanus</i>	NBRC 15112	NCBI
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	JCM 9152	NCBI
<i>Bacillus clausii</i>	KSM-K16	NCBI
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	RH1330	ABE
<i>Virgibacillus soli</i>	PL205	NCBI

Tabla 2: Lista de genes seleccionados para la clonación en *Bacillus*

ID de secuencia	Especie	Familia GH	Longitud
orf2511	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	26	360 aa
AXY_08250	<i>Amphibacillus xylanus</i>	5	497 aa
Man7	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	5	490 aa
T1Z249.2	<i>Bacillus nealsonii</i>	5	369 aa
Man6	<i>Bacillus clausii</i>	5	324 aa
Q9EYQ3	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	5	424 aa
YdhT	<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	26	1183 aa
V5X1N9	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	5	588 aa
Q9ZI87	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	5	694 aa
Q49HI4	<i>Bacillus circulans</i>	5	327 aa
orf0659	<i>Bacillus pumilus</i>	5	376 aa
JCM9152_1090	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	26	489 aa
D3HC62	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	5	487 aa
A0LSH9	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	5	763 aa
Man14	<i>Virgibacillus soli</i>	5	482 aa

Ejemplo 2: Clonación de mananasas bacterianas en *Bacillus*

- 25 A menos que se indique otra cosa, los métodos de biología molecular, incluyendo manipulaciones y transformaciones de ADN, se realizaron como se describe en Sambrook y Russell (2001) y Harwood y Cutting (1990). Los genes *man6*, *man7* y *man14*, se amplificaron por PCR utilizando polimerasa Pfx Accu Prime (Invitrogen). Las PCR se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la construcción de los plásmidos de expresión se utilizaron las
- 30 siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial durante 120 segundos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos de emparejamiento en uno de los siguientes 50/55 °C, 110/290 segundos de extensión a 68 °C y la extensión final a 68 °C durante 10 min. Para la amplificación de ADN genómico de *man7* de *Bacillus hemicellulosilyticus* se utilizó JCM 9152. *man6* and *man14* se ordenaron como genes sintéticos sin optimización de codones (Eurofins MWG, Alemania). En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados para la
- 35 clonación. Los nucleótidos protuberantes para la hibridación se indican subrayados.

Tabla 3: Lista de cebadores utilizados para la amplificación de *man6*, *man7* y *man14*

Molde	Cebador	pb	Secuencia	SEQ ID NO
sin. gen <i>man6</i>	Man6_1	39	CAACCGCCTCTGCAGCTTATGCACAAA	1
sin. gen <i>man6</i>	Man6_2	39	CGGTATATCTCTGTCTTAATCACTCTTA AGCCCATTTTC	2

ADNg de <i>B. hemicellulosilyticus</i>	Man7_1	37	CAACCGCCTCTGCAGCTTCTGATGGTCATAGC CAAAC	3
ADNg de <i>B. hemicellulosilyticus</i>	Man7_2	36	CGGTATATCTCTGTCTTATTGGATTGTT ACATGATC	4
sin. gen <i>man14</i>	Man14_1	40	CAACCGCCTCTGCAGCTGCAAGCGGG TTTTATGTAAACGG	5
sin. gen <i>man14</i>	Man14_2	39	CGGTATATCTCTGTCTTATTTAATGGTA ACGTTATCAAC	6
derivado de pUB110	Vec_1	17	AGCTGCAGAGGCGGTTG	7
derivado de pUB110	Vec_2	21	GACAGAGATATACCGACAGTG	8

Los genes se clonaron en un vector estándar pEV1 pEV1 (Fig. 1), un derivado de pUB110 que incluye el promotor PaprE de *Bacillus licheniformis* y el péptido señal de xilanas de *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizando la mezcla maestra de ensamblaje de ADN NEBuilder®Hifi (NEB, Frankfurt). Para la clonación se aplicó una relación de vector: inserto de 1: 3. La cantidad total de fragmentos fue de 0,2 pmol en un volumen total de 20 µl. Las muestras se incubaron durante 40 min a 50 °C. Para los fines de la construcción, los plásmidos de expresión se transformaron por competencia inducida en *Bacillus subtilis* SCK6, como se describe en Zhang y Zhang 2011. Las células transformadas se colocaron en placas con LB (Luria-Bertani) complementadas con 10 mg/l de kanamicina. Las placas se incubaron durante 20 h a 37 °C. Las colonias que surgieron se seleccionaron y el plásmido se aisló utilizando el kit QiaPrep MiniPrep (Qiagen, Hilden). El procedimiento de aislamiento se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes para preparaciones de plásmidos de grampositivos. Los insertos se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger (GATC, Alemania) y revelaron las secuencias de ADN correspondientes a las partes maduras de las mananasas Man6, Man7 y Man14. Las comparaciones de las secuencias se realizaron utilizando el alineamiento de secuencias de ClustalW (Thompson et al 1994). Por último, los plásmidos de expresión se transformaron mediante electroporación en una cepa de producción de *Bacillus* adecuada. La cepa de producción de *Bacillus* se cultivó en medio de electroporación que contenía Triptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g, NaCl 10 g y sacarosa 2 M y se recogieron 10 ml a una DO(600 nm) de 0,4. Las células se lavaron con tampón de electroporación que contenía sacarosa 0,272 M, MgCl₂ 1 mM y KH₂PO₄ 7 mM y finalmente se resuspendieron en 250 µl de tampón de electroporación. La electroporación se realizó utilizando las siguientes condiciones: 1,2 kV, 150 ω, 50 µF. Después de esto, se añadió 1 ml de medio de electroporación y las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Las células se colocaron en placas LB complementadas con kanamicina 20 mg/l y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Los clones se verificaron como se describió anteriormente y se utilizaron para la generación de material para pruebas analíticas. Por lo tanto, las cepas se inocularon en una expresión estándar en condiciones de inducción de proteínas y se incubaron durante 30 horas a 37 °C. Los sobrenadantes se recogieron y se utilizaron para pruebas analíticas y de aplicación. En las Tablas 4 y 5 se muestran los genes y las características de las enzimas.

Tabla 4. Resumen de los genes que codifican las mananasas de la familia GH5 de *Bacillus clausii* KSM-K16, *Bacillus hemicellulosilyticus* JCM 9152 y *Virgibacillus soli* PL205.

Gen	Longitud incluyendo SP (pb)	SEQ ID NO
<i>man6</i>	975	9
<i>man7</i>	1473	13
<i>man14</i>	1449	17

Tabla 5. Resumen de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de genes que codifican las mananases de la familia GH5 de *Bacillus clausii* KSM-K16, *Bacillus hemicellulosilyticus* JCM 9152 y *Virgibacillus soli* PL205.

Proteína Man	Nº de AA	Longitud de SS	CBM	PM pronosticado (Da), sin incluir ss	pI pronosticado, sin incluir ss	SEQ ID NO
Man6	324	35		31,84	4,56	11
Man7	490	21	Si	51,36	4,81	15
Man14	482	16	Si	50,68	4,35	19

5 Ejemplo 3: Clonación por PCR de mananases bacterianas *man6* y *man7* en *Trichoderma reesei*

En el aislamiento y tratamientos enzimáticos de ADN (por ejemplo, aislamiento del ADN plasmídico, digestión de ADN para producir fragmentos de ADN), en transformaciones de *E. coli*, secuenciación, etc., se utilizaron métodos estándar de biología molecular. Los métodos básicos utilizados fueron los descritos por el fabricante de la enzima, el reactivo o el kit o los descritos en el manual estándar de biología molecular, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). El aislamiento de ADN genómico se realizó como describen con detalle Raeder y Broda (1985).

Man6 and *man7* de *Bacillus clausii* y *Bacillus hemicellulosilyticus*, respectivamente, también se clonaron para su expresión en *Trichoderma reesei*. Los genes se clonaron por PCR utilizando genes sintéticos con optimización de codones para *Trichoderma reesei*. Las secuencias de ADN que codifican los péptidos señal de *man6* y *man7*, se eliminaron utilizando PCR y se crearon nuevos sitios de clonación. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 6 (SEQ ID NO: 21-24).

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados como cebadores de PCR para amplificar genes mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* y *Bacillus clausii*.

Molde, ADN (sintético) de	Oligonucleótidos	Longitud (pb)	Secuencia ^(a)	SEQ ID NO:
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	BMAN1	60	5'-AGTCAATCGCGACAAGCGCC AGACCCACTCGGGCTTCTAC ATCGAGGGCTCGACGCTCTA- 3' (s)	21
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	BMAN2	46	5'-CGCGCCGGATCCTTACTGGA TCGTGACGTGGTCCAGGTAG ATGGCG-3' (as)	22
<i>Bacillus clausii</i>	BMAN3	60	5'-AGTCAATCGCGACAAGCGCC AGAACGGCTTCCACGTCTCC GGCACGGAGCTCCTGGACAA -3' (s)	23
<i>Bacillus clausii</i>	BMAN4	50	5'-CGCGCCGGATCCTTAGTCGC TCTTCAGGCCGTTCTCGCCG TAGACGATGCG-3' (as)	24

^(a) "s" entre paréntesis = cadena en sentido, "as" = cadena antisentido.

Los genes se amplificaron por PCR con los cebadores descritos en la Tabla 6 y utilizando como moldes ADN sintéticos en las reacciones. Cada una de las mezclas de PCR de *man6* de *Bacillus clausii* y de *man7* de *Bacillus hemicellulosilyticus* contenía tampón HF 1x para la polimerasa Phusion HF (NEB/BioNordika, Finlandia), mezcla de dNTP 0,2 mM (Thermo Fisher Scientific, Finlandia), 1 µM de cada cebador, DMSO al 3 % (Thermo Fisher Scientific), 1 unidad de polimerasa Phusion High-Fidelity (NEB/BioNordika, Finlandia) y 50 ng del ADN plasmídico correspondiente. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 30 segundos a 98 °C, seguido de 28 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos de emparejamiento en uno de los siguientes 45/50/55/60 °C, extensión de 45 segundos a 72 °C y la extensión final a 72 °C durante 7 min.

La combinación de cebadores descrita en la Tabla 6 produjo productos de ADN específicos que tenían los tamaños esperados. Los productos de la PCR se aislaron del gel de agarosa con el kit de extracción de gel GenJet (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, se digirieron con las enzimas de restricción *NruI* y *BamHI* (Thermo Fisher Scientific) y se clonaron en un vector de expresión escindido con *NruI* y *BamHI*. Las mezclas de ligamiento se transformaron en *Escherichia coli* XL1-Blue (AH Diagnostics) y se sembraron en placas con LB (Luria-Bertani) que contenía ampicilina 50-100 µg/ml. Se recogieron varias colonias de *E. coli* de las placas y el ADN se aisló con el kit GenJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific). Los clones positivos se exploraron utilizando digestiones con enzimas de restricción. Los genes que codificaban las mananases de la familia GH5, *man6* de *Bacillus clausii* y *man7* de *Bacillus hemicellulosilyticus*, se secuenciaron sin sus propias secuencias codificantes del péptido señal y los plásmidos se denominaron pALK4274 y pALK4273, respectivamente (para detalles véase el Ejemplo 6).

Ejemplo 4: Clonación de mananasa bacteriana sintética *man14*

En el aislamiento y tratamientos enzimáticos de ADN (por ejemplo, aislamiento del ADN plasmídico, digestión de ADN para producir fragmentos de ADN), en transformaciones de *E. coli*, secuenciación, etc., se utilizaron métodos estándar de biología molecular. Los métodos básicos utilizados fueron los descritos por el fabricante de la enzima, el reactivo o el kit o los descritos en el manual estándar de biología molecular, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). El aislamiento de ADN genómico se realizó como describen con detalle Raeder y Broda (1985).

El gen de mananasa *man14* de *Virgibacillus soli* también se clonó para la expresión en *Trichoderma*. El gen que codifica la mananasa Man14 de la familia GH5 de *Virgibacillus soli* se ordenó de GenScript como una construcción sintética con optimización de codones para *Trichoderma reesei*.

El ADN plasmídico obtenido de GenScript, que incluía el gen *man14* se resuspendió en agua estéril, se digirió con las enzimas de restricción *NruI* y *BamHI* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y se clonaron en un vector de expresión escindido con *NruI* y *BamHI*. La mezcla de ligamiento se transformó en *Escherichia coli* XL1-Blue (AH Diagnostics) y se sembró en placas con LB (Luria-Bertani) que contenía ampicilina 50-100 µg/ml. Se recogieron varias colonias de *E. coli* de las placas y el ADN se aisló con el kit GenJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific). Los clones positivos se exploraron utilizando digestiones con enzimas de restricción y se mostró que contenían insertos de tamaños esperados. Los sitios de fusión de *man14* de *Virgibacillus soli* para el plásmido de expresión, se secuenciaron y el plásmido se denominó pALK4414 (para detalles, véase el Ejemplo 6).

Ejemplo 5: Producción de proteínas de mananasa GH5 bacteriana recombinantes en *Bacillus*

Se construyeron plásmidos de expresión para la producción de proteínas de mananasa GH5 (Man6, Man7 y Man14) recombinantes de *Bacillus clausii*, *Bacillus hemicellulosilyticus* y *Virgibacillus soli*. Los plásmidos de expresión contruidos se enumeran en la Tabla 7. Los genes de GH5 (*man6*, *man7* and *man14*) recombinantes, sin sus propias secuencias de señal, se fusionaron al promotor *PapR* de *Bacillus licheniformis* y el péptido señal de la xilanasa de *B. amyloliquefaciens*. La terminación de la transcripción se garantizó mediante un terminador fuerte y se utilizó un marcador de resistencia a kanamicina para la selección de los transformantes. Las transformaciones se realizaron como se describe en el Ejemplo 2.

Tabla 7. Plásmidos de expresión contruidos para producir las proteínas Man6, Man7 y Man14 recombinantes de *Bacillus clausii*, *Bacillus hemicellulosilyticus* y *Virgibacillus soli* en una cepa de expresión de *Bacillus* apropiada.

Proteína mananasa (GH5)	Plásmido de expresión
Man6	pEV1 Man6
Man7	pEV1 Man7
Man14	pEV1 Man14

La producción de GH5 de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes de cultivo de los cultivos en matraz de agitación. Los transformantes se inocularon de las placas LB a matraces de agitación que contenían glucosa al 2 %, polvo de macerado de maíz al 6 %, (NH₄)₂HPO₄ al 1,3 %, MgSO₄ al 0,05 % x 7H₂O y CaCl₂ al 0,5 %. El pH se ajustó a pH 7,5. La producción de proteína GH5 de los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo después de cultivarlos durante 30 horas a 37 °C, 180 rpm. La producción heteróloga de proteínas recombinantes se analizó mediante SDS-PAGE con posterior tinción con Coomassie. Los mejores transformantes de producción se seleccionaron para cultivarse en biorreactores a escala de laboratorio. Los transformantes se cultivaron en biorreactores a 37 °C en condiciones de inducción de proteínas y suministro adicional hasta que se alcanzó un rendimiento adecuado. Los sobrenadantes se recuperaron para pruebas de aplicación por centrifugación o filtración.

Ejemplo 6: Producción de proteínas de mananasa GH5 bacterianas recombinantes en *Trichoderma reesei*

Se construyeron plásmidos de expresión para la producción de proteínas de mananasa GH5 (Man6, Man7 y Man14) recombinantes de *Bacillus clausii*, *Bacillus hemicellulosilyticus* y *Virgibacillus soli* (véanse los ejemplos 3 y 4) en *Trichoderma reesei*. Los plásmidos de expresión contruidos se enumeran en la Tabla 8. Los genes de GH5 (*man6*, *man7* y *man14*) recombinantes, sin sus propias secuencias señal, se fusionaron al promotor *cel7A/cbh1* de *T. reesei* con el transportador y enlazador CMB *cel6A/cbh2* de *T. reesei* seguido del sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2. La terminación de la transcripción se garantizó mediante el terminador *cel7A/cbh1* de *T. reesei* y para la selección de los transformantes se utilizó el gen marcador *amdS* de *A. nidulans* como se describe en Paloheimo *et al.* (2003). Los casetes de expresión lineal (Fig. 2) se aislaron de las cadenas principales del vector después de digestiones con *NotI* y se transformaron en protoplastos de *T. reesei*. Las cepas hospedadoras utilizadas no producen ninguna de las cuatro celulasas principales de *T. reesei* (CBHI, CBHII, EGI, EGII). Las transformaciones se realizaron como en Penttilä *et al.* (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen *et al.* (1993), seleccionando acetamidasa como única fuente de nitrógeno (gen marcador *amdS*). Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de conidios individuales antes de esporularlos en PD.

Tabla 8. Se construyeron casetes de expresión para producir proteínas recombinantes Man6, Man7 y Man14 de *Bacillus clausii*, *Bacillus hemicellulosilyticus* y *Virgibacillus soli* en *Trichoderma reesei*. La estructura general de los casetes de expresión fue como se describe en la Fig. 2.

Proteína mananasa (GH5)	Plásmido de expresión	Casete de expresión ^(a)
Man6	pALK4274	7,0 kb <i>NotI</i>
Man7	pALK4273	7,5 kb <i>NotI</i>
Man14	pALK4414	7,6 kb <i>NotI</i>

^(a) El casete de expresión para la transformación en *T. reesei* se aisló de la cadena principal del vector utilizando digestión con la enzima *NotI*.

La producción de mananasa de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes de cultivo de los cultivos en matraz de agitación. Los transformantes se inocularon de las inclinaciones de PD a matraces de agitación que contenían 50 ml de medio inductor de celulasa basado en lactosa compleja (JJoutsjoki *et al.* 1993) tamponado con KH₂PO₄ al 5 %. La producción de proteína GH5 de los transformantes se analizó a partir de sobrenadantes de cultivo después de cultivarlos durante 7 días a 30 °C, 250 rpm. La producción heteróloga de proteínas recombinantes se analizó mediante SDS-PAGE con posterior tinción con Coomassie. Los mejores transformantes de producción se seleccionaron para cultivarse en biorreactores a escala de laboratorio. Los transformantes se cultivaron en biorreactores en forma discontinua o mediante un tipo de proceso de suministro adicional en condiciones de inducción de proteínas a una temperatura típica de cultivo de hongos mesófilos y en condiciones ligeramente ácidas. El cultivo continuó hasta el agotamiento de los azúcares en el medio o hasta que se alcanzó el rendimiento adecuado. Los sobrenadantes se recuperaron para pruebas de aplicación por centrifugación o por filtración.

Ejemplo 7: Ensayo de actividad galactomananasa mediante el método con DNS

La actividad mananasa (MNU) se midió como la liberación de azúcares reductores del galactomanano (0,3 % p/p) a 50 °C y pH 7,0 en 5 min. La cantidad de carbohidratos reductores liberados se determinó espectrofotométricamente utilizando ácido dinitrosalicílico. El sustrato (0,3 % p/p) utilizado en el ensayo se preparó de la siguiente manera: 0,6 g de goma de algarrobo (Sigma G-0753) estaban en tampón de citrato de sodio 50 mM, pH 7 (o tampón de fosfato de citrato, pH 7) a aproximadamente 80 °C utilizando un termoagitador magnético y se calentaron hasta el punto de ebullición. La solución se enfrió y se dejó disolver durante la noche en sala refrigerada (2-8 °C) con agitación continua y los residuos insolubles se eliminaron por centrifugación. Después, esa solución se llenó hasta 200 ml con tampón. El sustrato se conservó congelado y se fundió por calentamiento en un baño de agua hirviendo a aproximadamente 80 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se mezcló cuidadosamente antes de usarlo. El reactivo DNS utilizado en el ensayo se preparó disolviendo 50 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (Sigma D-550) en aproximadamente 4 litros de agua. Con agitación magnética continua, se añadieron gradualmente 80,0 g de NaOH y se dejaron disolver. Una cantidad de 1500 g de sal de Rochelle (tartrato de K-Na, Merck 8087) se añadió en pequeñas porciones con agitación continua. La solución que podría haberse calentado con precaución a una temperatura máxima de 45 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se llenó hasta 5 000 ml. Después de eso, se filtró a través de un filtro de papel Whatman No.1 y se conservó en un frasco oscuro a temperatura ambiente. La reacción se inició primero añadiendo 1,8 ml de solución de sustrato a cada uno de los dos tubos de ensayo y se dejó equilibrar a 50 °C durante 5 minutos después de lo cual 200 µl de solución de enzima diluida adecuadamente se añadieron a uno de los tubos, se mezcló bien con un mezclador vortical y se incubó exactamente durante 5 minutos a 50 °C. Los blancos enzimáticos no necesitaban equilibrarse o incubarse. La reacción se detuvo añadiendo 3,0 ml de reactivo DNS en ambos tubos y se mezcló. Se añadieron 200 µl de solución de muestra a los tubos blancos enzimáticos. Ambos tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo. Después de hervir durante exactamente 5 minutos, los tubos se colocaron en un baño de agua fría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra se midió contra el blanco enzimático a 540 nm y se leyó la actividad de la curva de calibración y se multiplicó por el factor de dilución. Una muestra diluida adecuada produjo una diferencia de absorbancia de 0,15 a 0,4. Se preparó una curva estándar 20 mM a partir de la solución madre de manosa disolviendo 360 mg de manosa (SigmaM-6020, conservada en un evaporador) en tampón de ensayo y diluida en soluciones que contenían 3, 6, 10 y 14 µmol/ml de manosa. Los estándares se manejaron como las muestras, solo que se incubaron a 50 °C. Las absorbancias se midieron contra el blanco de reactivo (que contenía tampón en lugar de la dilución estándar de manosa) a 540 nm. Para cada serie de ensayos se construyó una curva de calibración. Una unidad de mananasa (MNU) se definió como la cantidad de enzima que produce carbohidratos reductores que tienen un poder reductor correspondiente a un nmol de manosa de galactomanano en un segundo en las condiciones de ensayo (1 MNU = 1nkat).

Ejemplo 8: Purificación de mananasa Man6

Las células y los sólidos se eliminaron del medio de cultivo de fermentación mediante centrifugación durante 10 minutos, 4000 g a 4 °C. Para la purificación de la proteína se utilizaron 10 ml de sobrenadante. La muestra se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,44 µm (Millex-HV, Merck Millipore Ltd, Carrigtwohill, IRL). El filtrado se cargó en una columna desalinizadora HiPrep 26/10 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada en HEPES 20 mM pH 7. La muestra desalada se cargó después en una columna HiTrap Q HP de 5 ml (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) pre-equilibrada con HEPES 20 mM pH 7. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con el mismo tampón para 20 ml. Las proteínas se eluyeron con gradiente de sal lineal HEPES 20 mM, NaCl 500 mM pH 7 en 15 CV. Se recogieron fracciones de 5 ml y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían la proteína diana se combinaron y se concentraron a 2 ml utilizando los dispositivos de ultrafiltración Vivaspin 20, 10 kDa MWCO (GE Healthcare). La muestra concentrada se fraccionó adicionalmente utilizando una columna de filtración en gel Superdex

75 26/60 equilibrada con MES 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían mananasa pura se combinaron. Otras mananasas se purificaron utilizando el mismo protocolo, pero cambiando la composición del tampón en las etapas de desalinización e intercambio iónico. Las composiciones de tampón se muestran en la Tabla 9.

5

Tabla 9. Tampones utilizados en la cromatografía de intercambio iónico

Mananasa	Tampones utilizados en la cromatografía de intercambio iónico
Man6	HEPES 20 mM pH 7
Man7	HEPES 20 mM pH 7
Man14	MES 20 mM pH 6
Las muestras purificadas tenían una pureza superior al 95 %.	

El contenido enzimático de la muestra purificada se determinó utilizando medidas de absorbancia UV de 280 nm. Los coeficientes de excitación para cada mananasa se calcularon sobre las bases de la secuencia de aminoácidos de la enzima utilizando ExPASy Server <http://web.expasy.org/protparam/>. (Gasteiger E et al 2005). La actividad de la enzima (MNU) de las muestras purificadas se midió como la liberación de azúcares reductores como se describe en el Ejemplo 7. La actividad específica (MNU/mg) de las mananasas se calculó dividiendo la actividad MNU de la muestra purificada entre la cantidad de enzima purificada. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular las dosis de enzimas utilizadas en los Ejemplos 10 y 11.

10

15

Perfiles de pH de las mananasas

Los perfiles de pH de las mananasas purificadas se determinaron utilizando el ensayo de comprimidos de beta-mananasa con galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina (T-MNZ 11/14) de Megazyme con pequeñas modificaciones en el protocolo sugerido. La linealidad del ensayo se verificó con cada una de las enzimas purificadas. El ensayo se realizó en tampón de Britton-Robinson 40 mM ajustado a valores de pH entre 4 y 11. La solución enzimática se diluyó en el tampón de ensayo y 500 µl de solución enzimática se equilibraron en un baño de agua a 50 °C durante 5 minutos antes de añadir un comprimido de sustrato. Después de 10 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 10 ml de Tris al 2 % a pH 12. Los tubos de reacción se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, se agitaron y el líquido se filtró a través de un filtro de papel Whatman No.1. La eliminación de tinte azul del sustrato se cuantificó midiendo la absorbancia a 595 nm. La actividad enzimática a cada pH se refirió como actividad relativa en la que la actividad al pH óptimo se estableció en 100 %. Los perfiles de pH se muestran en la Figura 3.

20

25

La actividad relativa (%) de la mananasa se calculó dividiendo la actividad mananasa de una muestra entre la actividad mananasa de una muestra de referencia. En el caso del perfil de pH, la muestra de referencia es una muestra con el pH óptimo. En el caso del perfil de temperatura, la muestra de referencia es una muestra a la temperatura óptima.

30

Perfiles de temperatura de las mananasas

La temperatura óptima de las mananasas purificadas se determinó utilizando el ensayo de comprimidos de beta-mananasa con galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina (T-MNZ 11/14) de Megazyme con pequeñas modificaciones en el protocolo sugerido. El ensayo se realizó a temperaturas que variaban entre 30-90 °C durante 10 minutos en un tampón de Britton-Robinson 40 mM, pH 7. La actividad enzimática se informó como actividad relativa donde la actividad a temperatura óptima se estableció en 100%. Los perfiles de temperatura se muestran en la Figura 4.

35

40

Temperatura y pH característicos de las mananasas

La Man6 tiene una masa molecular entre 30-35 kDa. La temperatura óptima de la enzima a pH 7 es de 50 °C a 70 °C. Dicha enzima tiene un pH óptimo en el intervalo de pH de al menos pH 6 a pH 9 a 50 °C. La temperatura óptima y el pH óptimo se determinaron utilizando un tiempo de reacción de 10 minutos y como sustrato se utilizó galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina.

45

La Man7 tiene una masa molecular entre 50-55 kDa. La temperatura óptima de la enzima a pH 7 es de 50 °C a 70 °C. Dicha enzima tiene un pH óptimo en el intervalo de pH de al menos pH 7 a pH 10 a 50 °C. La temperatura óptima y el pH óptimo se determinaron utilizando un tiempo de reacción de 10 minutos y como sustrato se utilizó galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina.

50

La Man14 tiene una masa molecular entre 30-40 kDa. La temperatura óptima de la enzima a pH 7 es de 50 °C a 70 °C. Dicha enzima tiene un pH óptimo en el intervalo de pH de al menos pH 7 a pH 8 a 50 °C. La temperatura óptima y el pH óptimo se determinaron utilizando un tiempo de reacción de 10 minutos y como sustrato se utilizó galactomanano de algarrobo entrecruzado con azurina.

55

Ejemplo 9: Rendimiento de eliminación de manchas de las mananasas Man6 y Man7 con detergentes comerciales sin agentes de blanqueamiento

Las mananastas Man6 y Man7 producidas en *Bacillus* (como se describe en el Ejemplo 5) y en *Trichoderma* (como se describe en el Ejemplo 6), se sometieron a ensayo con respecto a su capacidad para eliminar manchas estándar sensibles a mananasa a 40 ° C y con una dureza del agua de 16 °dH con detergentes comerciales sin agentes de blanqueamiento y se comparó con la preparación de mananasa comercial Mannaway® 4,0 l (Novozymes). Se utilizaron los siguientes paños de ensayo del Center for testmaterial B.V. (Países Bajos) manchados artificialmente: Pudín de chocolate mananasa sensible sobre algodón (E-165), Goma de algarrobo, con pigmento sobre algodón (CS-73) y sobre poliéster/algodón (PC-S-73) y goma guar con negro de carbón sobre algodón (CS-43). La tela se cortó en muestras de 6 cm x 6 cm y en el ensayo se utilizaron 2 piezas de cada una de ellas.

Se utilizó detergente A líquido comercial para uso industrial que contenía todas las otras enzimas, salvo mananasa, a una concentración de 4,4 g por litro de líquido de lavado y se utilizó detergente en polvo comercial para ropa de color sin enzimas a 3,8 g/l. Se preparó detergente que contenía líquido de lavado en agua de grifo sintética con una dureza de 16 °dH. Se añadieron proteasa Savinase® 16 l (0,5 %p/p) y amilasa Stainzyme® 12 l (0,4 %p/p) al agua dura utilizada con detergente en polvo comercial para ropa de color, el detergente líquido ya contenía amilasa y proteasa. El pH del líquido de lavado del detergente en polvo para ropa de color era de aproximadamente 10 y con el detergente líquido de aproximadamente 8,3.

Las dosificaciones de mananasa estaban en el intervalo de 0-0,2/0,25 % del peso del detergente, pero para la evaluación, las dosificaciones se calcularon como unidades de actividad enzimática (MNU) por ml de líquido de lavado o como mg de proteína enzimática activa (PEA) por l de líquido de lavado. La actividad se midió como se describe en el Ejemplo 7. El contenido de PEA de cada preparación se calculó dividiendo la actividad enzimática entre la actividad específica, definida en el Ejemplo 8. La muestra de control contenía la solución de detergente pero no mananasa.

Para agua de grifo sintética con una dureza de 16 °dH, se prepararon las siguientes soluciones madre en agua desionizada (Milli-Q o equivalente):

Solución madre con una dureza de 1 000 °dH al calcio: $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (1.02382.1000, Merck KGaA, Alemania) 26,22 g/l

Solución madre con una dureza de 200 °dH al magnesio: $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1.05886.1000, Merck KGaA, Alemania) 8,79 g/l H_2O

Solución madre de NaHCO_3 : NaHCO_3 (1.06329.1000 Merck KGaA, Alemania) 29,6 g/l

Se añadieron 13,3 ml de solución de CaCl_2 , 13,3 ml de solución de MgSO_4 y 10,0 ml de solución de NaHCO_3 recién preparada en un matraz volumétrico en el orden indicado, hasta 1 litro con agua desionizada y se mezclaron. La dureza del agua se determinó por valoración complejométrica y se encontró que era correcta.

Los tratamientos de eliminación de manchas se realizaron en un Launder-Ometer Atlas LP-2 de la siguiente manera. En primer lugar, el Launder-Ometer se precalentó a 40 °C. Después, en recipientes de 1,2 litros, se añadió detergente, 250 ml de agua de grifo sintética con una dureza de 16 °dH y enzima diluida (<1,0 ml). Se añadieron manchas y el Launder-Ometer se activó a 40 °C durante 60 minutos con una velocidad de rotación de 42 rpm. Después de eso, las muestras se enjuagaron cuidadosamente con agua corriente y se secaron durante la noche en aire interior, en una rejilla protegida contra la luz solar. El efecto de eliminación de manchas se evaluó midiendo el color como valores de reflectancia con el espectrofotómetro Fúngicas Minolta CM-3610A utilizando las coordenadas de espacio de color $L^*a^*b^*$ (iluminación D65/10°, corte de 420 nm). La desaparición de las manchas, que indica el rendimiento de las mananastas (eficiencia de eliminación de manchas), se calculó como ΔL^* (delta L^*), lo que significa valor de luminosidad L^* de la tela tratada con enzima menos valor de luminosidad L^* de la tela tratada con líquido de lavado sin mananasa (control). Los resultados finales (efecto de eliminación total de la mancha) se mostraron como la suma de ΔL^* de cada mancha. Los valores de color de cada mancha fueron un promedio de 2 muestras. Los resultados obtenidos con detergente líquido comercial se muestran en las Figs. 6-7. Las mananastas según la invención, tienen un rendimiento de eliminación de manchas similar (Man6) o considerablemente mejor (Man7) con detergente líquido cuando se dosifican como unidades de actividad o como proteína enzimática activa en comparación con la preparación de mananasa comercial Mannaway® 4,0 l. Se obtuvo un rendimiento similar con Man6 y Man7 independientemente del hospedador de expresión, *Bacillus* o *Trichoderma* (Fig 6). Los resultados obtenidos con el detergente en polvo comercial para ropa de color (Figs. 8-9) muestran que las mananastas según la invención tienen un mejor rendimiento de eliminación de manchas con el polvo detergente de color cuando se dosifican como unidades de actividad o como proteína enzimática activa en comparación con la preparación de mananasa comercial Mannaway® 4,0 l.

Ejemplo 10: Rendimiento de eliminación de manchas de las mananastas Man6 y Man7 con detergente que contiene blanqueador

La capacidad de las mananastas Man6 y Man7 producidas en *Bacillus* (como se describe en el Ejemplo 5) para eliminar manchas estándar sensibles a mananasa, se sometió a ensayo a una temperatura de 40 °C y una dureza del agua de 16 °dH con detergente en polvo comercial con blanqueador y se comparó con la preparación comercial de mananasa

Mannaway® 4,0 l (Novozymes). El sistema de ensayo fue similar al descrito en el Ejemplo 9, solo que se utilizaron 3 paños de ensayo diferentes del Center for testmaterial B.V. (Países Bajos) manchados artificialmente: Pudín de chocolate mananasa sensible sobre algodón (E-165), Goma de algarrobo, con pigmento sobre algodón (C-S-73) y goma guar con negro de carbón sobre algodón (CS-43). El detergente en polvo comercial para ropa de color se utilizó a una concentración de 4,2 g por litro de líquido de lavado y el pH del líquido de lavado fue de aprox. 9,5. Al agua dura utilizada en el ensayo, se añadió proteasa Savinase® 16 l (0,5 % p/p) y amilasa Stainzyme® 12 l (0,4 % p/p), ya que el detergente no contenía enzimas. El color de las muestras después del tratamiento se midió y los resultados se calcularon como la suma de ΔL^* de cada una de las 3 manchas como se describe en el Ejemplo 9. Los resultados (Fig. 10) obtenidos con detergente comercial que contiene blanqueador, indican que la mananasa según la invención (Man7) tiene un rendimiento de eliminación de manchas considerablemente mejor en comparación con la mananasa comercial Mannaway® 4,0 l cuando se dosifica como proteína enzimática activa. Con Man6 se obtiene al menos un rendimiento similar en comparación con una mananasa bacteriana comercial.

Ejemplo 11: Rendimiento de eliminación de manchas de la mananasa Man14 con detergente líquido comercial

La capacidad de la mananasa Man14 producida en *Bacillus* (como se describe en el Ejemplo 5) para eliminar manchas estándar sensibles a mananasa, se sometió a ensayo a una temperatura de 40 °C y una dureza del agua de 16 °dH con detergente B líquido comercial de uso industrial y se comparó con la preparación comercial de mananasa Mannaway® 4,0 l (Novozymes). El sistema de ensayo fue similar al descrito en el Ejemplo 9, solo que se utilizaron dos paños de ensayo diferentes del Center for testmaterial B.V. (Países Bajos) manchados artificialmente: Pudín de chocolate mananasa sensible sobre algodón (E-165) y goma de algarrobo, con pigmento sobre algodón (CS-73). El detergente B líquido comercial para uso industrial se utilizó a una concentración de 5 g por litro de líquido de lavado y el pH del líquido de lavado fue de aprox. 8,3. Al agua dura utilizada en el ensayo, se añadió proteasa Savinase® 16 l (0,5 % p/p) y amilasa Stainzyme® 12 l (0,4 % p/p), ya que el detergente no contenía enzimas. El color de las muestras después del tratamiento se midió y los resultados se calcularon como la suma de ΔL^* de cada una de las 2 manchas como se describe en el Ejemplo 9. Los resultados (Figs. 11-12) obtenidos con detergente que contiene líquido comercial indican que Man14 tuvo un buen rendimiento en un detergente líquido, comparable al producto comercial, cuando se dosifica como unidades de actividad o como proteína enzimática activa.

Ejemplo 12: Estabilidad de las mananasas Man6 y Man7 en detergentes líquidos comerciales

La estabilidad de las preparaciones de mananasa Man6 y Man7 producidas en *Bacillus* se sometieron a ensayo en detergente líquido OMO para ropa de color adquirido en el supermercado local y se comparó con la de la preparación de mananasa comercial Mannaway® 4,0 l. Se añadieron preparaciones de mananasa al 0,5 % p/p en detergentes y las muestras se incubaron a 37 °C, durante 5 semanas, en tubos de plástico con tapa. La actividad se midió a determinados intervalos con el ensayo de actividad descrito en el Ejemplo 7, solo que se utilizó un tiempo de incubación de 30 minutos. Los resultados se calcularon como actividad residual (%), que se obtuvo dividiendo la actividad de una muestra tomada en cierto punto de tiempo entre la actividad inicial de la muestra. La estabilidad de Man7 producida tanto en *Bacillus* como en *Trichoderma* y la de Man6 producida en *Trichoderma* se sometió a ensayo contra Mannaway® 4,0 l también en un detergente líquido A de uso industrial que contenía proteasa pero no mananasa. En este ensayo, se utilizaron mananasas al 1 % (p/p) y se incubaron muestras a 37 °C durante 12 semanas. Los resultados en el detergente Omo para ropa de color (Fig. 13) muestran que, en comparación con la preparación Mannaway® 4,0 l, Man6 tuvo una estabilidad considerablemente mejor y Man7 una estabilidad similar. Tanto Man7 como especialmente Man6, fueron más estables que la preparación Mannaway® 4,0 l con otro detergente A líquido comercial, tal como se muestra en la figura 14. Los resultados obtenidos en otro ensayo en las mismas condiciones mostraron que Man6 tenía una estabilidad similar independientemente del hospedador de expresión, *Bacillus* o *Trichoderma* (datos no mostrados). Los resultados de los experimentos de estabilidad muestran que la mananasa según la invención es estable en detergentes durante varias semanas, incluso cuando se conserva a alta temperatura como 37 °C. La estabilidad de las mananasas (Man6 y Man7) según la invención se mejora en comparación con la de una mananasa bacteriana comercial en detergente líquido.

Ejemplo 13: Rendimiento de lavado de composiciones de detergente líquido según la invención

El rendimiento de lavado de composiciones de detergente líquido según la presente invención se determinó utilizando manchas estandarizadas que pueden obtenerse en el CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos ("CFT"), Eidgenössische Material- und Prüfamt Testmaterialien AG [Federal materials and testing agency, Testmaterials], San Gallen, Suiza ("EMPA") y Warwick Equest Ltd Unit 55, Consett Business Park, Consett, Condado de Durham ("Equest").

Como formulación base se utilizó un agente de lavado líquido con la siguiente composición (todos los valores se dan en porcentaje en peso):

Nombre químico	Materia prima de la sustancia activa [%]	Formulación de detergente de la sustancia activa [%]
Agua desmin.	100	Reposo
ácido alquilbencenosulfónico	96	2-7

Tensioactivos aniónicos	70	6-10
Sal sódica de ácido graso C12-C18	30	1-4
Tensioactivos no iónicos	100	4-7
Fosfonatos	40	0,1-2
Ácido cítrico	100	1-3
NaOH	50	1-4
ácido borónico	100	0,1-2
agente antiespumante	100	0,01-1
Glicerol	100	1-3
Enzimas	100	0,1-2
Agente conservante	100	0,05-1
Etanol	93	0,5-2
Abrillantador óptico	90	0,01-1
Perfume	100	0,1-1
Tinte	100	0.001-0,1
El pH de la composición de detergente variaba entre 8,2-8,6.		

En función de esta formulación base, la composición 2 de detergente líquido se preparó añadiendo la enzima respectiva como se indica a continuación:

5 Composición 2: Enzima según la SEC ID N°: 16 (Man7)

El lavado se realizó de la siguiente manera según el Método AISE: 3,5 kg de paño de lastre limpio, 4 Paños SBL, lavadora Miele, programa corto a 20 °C y 40 °C.

10 Todas las mananastas se añadieron en las mismas cantidades en función del contenido total de proteínas.

La relación de dosificación del agente de lavado líquido fue de 4,0 gramos por litro de líquido de lavado. El procedimiento de lavado se realizó durante 60 minutos a una temperatura de 20 °C y 40 °C, teniendo el agua una dureza de entre 15,5 y 16,5 ° (grados alemanes de dureza).

15 Los resultados obtenidos son los valores de diferencia entre las unidades de remisión obtenidas con los detergentes y las unidades de remisión obtenidas con el detergente que contiene la mananasta de referencia disponible en el comercio (Mannaway 4,0 l, obtenida de Novozymes). Por lo tanto, un valor positivo indica un rendimiento de lavado mejorado de las composiciones de detergente que comprenden las mananastas de la presente invención en comparación con la misma composición de detergente que comprende la mananasta de referencia. En el ensayo de lavado se ensayó una gran variedad de manchas.

25 La blancura, es decir, el brillo de las manchas, se determinó fotométricamente como una indicación del rendimiento de lavado. Se utilizó un dispositivo espectrométrico Minolta CM508d, que se calibró de antemano utilizando un patrón blanco proporcionado con la unidad.

30 Los resultados obtenidos son los valores de diferencia entre las unidades de remisión obtenidas con los detergentes y las unidades de remisión obtenidas con el detergente que contiene las combinaciones de enzimas. Por lo tanto, un valor positivo indica un rendimiento de lavado mejorado debido a las combinaciones de enzimas presentes en el detergente. Las mananastas de la invención en composiciones de detergente muestran un rendimiento mejorado en una variedad de manchas que comprenden manano.

	20 °C	40 °C
Mancha	Comp.2	Comp.2
Helado de Chocolate (Equest)	4,2	n.d.
Helado de Chocolate Carte D'or (Equest)	3,3	0,7
Cacao [CO] (Equest)	2,3	n.d.
Mayonesa/color negro carbón (CFT CS05S [CO])	4,3	2,2
(continuación)		
	20 °C	40 °C
Aderezo para ensaladas, con negro natural (CFT CS06 [CO])	3,5	2,6
Lápiz labial, diluido, Rojo (CFT CS216 [CO])	1,5	0,7

Ejemplo 14: Rendimiento de lavado de las composiciones de detergente en polvo según la invención

35 El rendimiento de lavado de las composiciones de detergente en polvo según la presente invención se determinó utilizando manchas estandarizadas que pueden obtenerse en el CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen,

Países Bajos ("CFT"), Eidgenössische Material- und Prüfanstalt Testmaterialien AG [Federal materials and testing agency, Testmaterials], San Gallen, Suiza ("EMPA") Warwick Equest Ltd Unit 55, Consett Business Park, Consett, Condado de Durham ("Equest").

- 5 Como formulación base se utilizó un agente de lavado sólido con la siguiente composición (todos los valores se dan en porcentaje en peso):

Nombre químico	Materia prima de la sustancia activa [%]	Formulacion de detergente de la sustancia activa [%]
Agua desmin.	100	1-4
ácido alquilbencenosulfónico	97	9-13
Tensioactivos no iónicos	100	4-7
Percarbonatos	88	9-13
TAED	92	1-5
Fosfonatos	60	0,1-3
Poliacrilatos	45	1-4
Silicato de sodio	40	5-10
Carbonato de sodio	100	18-22
Carboximetilcelulosa	69	1-4
Polímero de eliminación de suciedad	100	0,1-1
Abrillantador óptico	70	0,1-1
Agente antiespumante	c.t.	0,01-1
Sulfato de sodio	100	22-30
Enzimas	100	0,1-1
Perfume	100	0,1-1
NaOH	100	0,1-1
Nombre químico	Materia prima de sustancia activa [%]	Formulación de detergente de sustancia activa [%]
Reposo	-	1-4

- 10 En función de esta formulación base, la composición de detergente sólida 4 se preparó añadiendo las enzimas respectivas como se indica a continuación:

Composición 4: Enzima según la SEC ID N°: 16 (Man7)

- 15 El lavado se realizó de la siguiente manera según el Método AISE: 3,5 kg de paño de lastre limpio, 4 Paños SBL, lavadora Miele, programa corto a 20 °C y 40 °C. Todas las mananastas se añadieron en las mismas cantidades en función del contenido total de proteínas.

- 20 La relación de dosificación del agente de lavado en polvo fue de 3,8 gramos por litro de líquido de lavado. El procedimiento de lavado se realizó durante 60 minutos a una temperatura de 20 °C y 40 °C, teniendo el agua una dureza de entre 15,5 y 16,5 ° (grados alemanes de dureza).

- 25 La blancura, es decir, el brillo de las manchas, se determinó fotométricamente como una indicación del rendimiento de lavado. Se utilizó un dispositivo espectrométrico Minolta CM508d, que se calibró de antemano utilizando un patrón blanco proporcionado con la unidad.

- 30 Los resultados obtenidos son los valores de diferencia entre las unidades de remisión obtenidas con los detergentes y las unidades de remisión obtenidas con el detergente que contiene la mananasta de referencia (Mannaway 4,0 l, obtenida de Novozymes). Por lo tanto, un valor positivo indica un rendimiento de lavado mejorado de las variantes en el detergente. Las mananastas de la invención muestran un rendimiento mejorado sobre diversas manchas. Por lo tanto, es evidente que las mananastas según la invención muestran un rendimiento de lavado mejorado en comparación con Mannaway.

	20 °C	40 °C
Mancha	Comp.4	Comp.4
Helado De Chocolate Carte D'or (Equest)	2,8	0,5
Vienetta (Equest)	0,8	n.d.
Helado de chocolate L [CO] (Equest)	0,9	n.d.
Papilla de avena (EMPA 163 [CO])	n.d.	5,1
Cacao (CFT CS02 [CO])	3,1	n.d.
Mayonesa/color negro carbón (CFT CS05S [CO])	1,0	2,7

Aderezo para ensaladas, con negro natural (CFT CS06 [CO])	4,8	5,1
Sebo BEY con negro de carbón (CFT CS32 [CO])	1,4	0,7
Bebida de chocolate, pura (CFT CS44 [CO])	1,4	0,8

Sin limitar el alcance y la interpretación de las reivindicaciones de la patente, a continuación se enumeran ciertos efectos técnicos de uno o más de los aspectos o realizaciones desvelados en el presente documento: Un efecto técnico es la degradación o modificación del manano. Otro efecto técnico es el suministro de mananasa que tiene una buena estabilidad de almacenamiento. La descripción anterior ha proporcionado a modo de ejemplos no limitativos de implementaciones particulares y realizaciones de la invención, una descripción completa e informativa del mejor modo contemplado actualmente por los inventores para llevar a cabo la invención. Sin embargo, es obvio para un experto en la materia que la invención no está restringida a los detalles de las realizaciones presentadas anteriormente, sino que puede implementarse en otras realizaciones utilizando medios equivalentes sin apartarse de las características de la invención.

Además, algunas de las características de los aspectos y realizaciones de esta invención, desvelados anteriormente, pueden utilizarse de manera ventajosa sin el uso correspondiente de otras características. Como tal, la descripción anterior se considerará meramente ilustrativa de los principios de la presente invención, y no como limitación de la misma. Por tanto, el alcance de la invención solo está restringido por las reivindicaciones de patente adjuntas. En una realización, al menos un componente de las composiciones de la invención tiene una característica química, estructural o física diferente en comparación con el componente natural correspondiente del cual procede el al menos un componente. En una realización, dicha característica es al menos una de tamaño uniforme, dispersión homogénea, isoforma diferente, degeneración de codones diferente, modificación postraduccional diferente, metilación diferente, estructura terciaria o cuaternaria diferente, actividad enzimática diferente, afinidad diferente, actividad de unión diferente e inmunogenicidad diferente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Composiciones de detergente que comprenden mananasas bacterianas

<130> PT034268EP

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

caaccgcctc tgcagcttat gcacaaaacg gatttcacg 39

<210> 2

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

cggatatct ctgtcttaat cactcttaag cccatttc 39

<210> 3

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador
 <400> 3
 5 caaccgcctc tgcagcttct gatggcata gccaaac 37
 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 4
 15 cggatatct ctgtcttatt ggattgtac atgac 36
 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 5
 caaccgcctc tgcagctgca agcgggttt atgtaaacgg 40
 <210> 6
 <211> 39
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 6
 cggatatct ctgtcttatt taatggtaac gttatcaac 39
 <210> 7
 40 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 7
 agctgcagag gcggttg 17
 50 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 60 gacagagata taccgacagt g 21
 <210> 9
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> *Bacillus clausii*
 65 <400> 9

ES 2 728 758 T3

atgaagaggg aggacatgga tcaaatgaaa agaaagcggg tacaattgtt tggaacacta	60
gtgggtattgg ttttgttcgt gtacggtagc ggttcggcat atgcacaaaa cggatttcac	120
gtatccggta cagagttgtt ggacaaaaat ggcgatcctt atgttatgcg tggcgtcaac	180
catggacact cttggtttaa gcaagatctg gaggaagcaa tccctgccat agcagaaaca	240
ggggcgaca cgggtgagaat ggtcttatcc aatggacagc aatgggaaaa agatgatgcc	300
tctgagcttg cccgtgtgct ggctgccaca gaaacatatg gattgacaac tgtgctggaa	360
gtccatgacg ctacaggaag tgacgatcct gctgatttag agaaagcagt cgattattgg	420
atcgaaatgg ctgatgttct caaggggaca gaagaccgag taatcattaa cgttgccaat	480
gaatggtatg ggtcgtggag gagcgacgtt tgggcagaag catacgaca agcgatcccg	540
cgcttgcgca gcgctggcct ctcccataca ttaatggttg atgcggcagg ttggggccag	600
taccctgcct ccatccacga gcggggagcc gatgtgtttg cgtccgatcc attaaaaaac	660
acgatgtttt cgatccatat gtacgaatat gcaggagctg atagggcgac aattgcctat	720
aacattgatc gtgtgcttgc tgaaaatctt gctgtggtga tcggtgaatt tggccatagg	780
catcatgatg gcgatgtcga tgaagatgag attttggcct atacagcaga gcggcaagtg	840
ggctggctgg cctggtcatt gtatggcaac agcgggggtg ttgaatactt ggatttagct	900
gaaggcccat caggccatt gacgagttgg ggcaaacgaa ttgtttatgg tgaaaatggg	960
cttaagagtg attaa	975

<210> 10
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> *Bacillus clausii*

<400> 10

ES 2 728 758 T3

cagaacggct tccacgtctc cggcacggag ctcttggaaca agaacggcga cccttacgtc	60
atgcgcggcg tcaaccacgg ccacagctgg ttcaagcagg acctcgagga agccatccct	120
gctatcgctg agacgggccc taacacggtc cgcattggtcc tgagcaacgg ccagcagtgg	180
gagaaggacg acgctagcga gctggctcgc gtcctcgctg ctacggagac gtacggcctc	240
accacgggtcc tggagggtcca cgacgctacg ggctcggacg accccgccga cctcgagaag	300
gccgtcgact actggatcga gatggctgac gtcctgaagg gcaccgagga ccgcgtcatc	360
atcaacgtcg ccaacgagtg gtacggctcc tggcgcagcg acgtctgggc cgaggcctac	420
gctcaggcta tccctcgccct ccgctcggcc ggccctctccc acacgctcat ggtcgacgct	480
gccggctggg gccagtaccg tgcttccatc cacgagcgcg gcgctgacgt ctttgcttcg	540
gacccctga agaacaccat gttctccatc cacatgtacg agtacgctgg cgctgaccgc	600
gtaccatcg cctacaacat cgaccgcgtc ctggctgaga acctggctgt cgtcatcggc	660
gagtttgcc accgccacca cgacggcgac gtcgacgagg acgctatcct ggcttacacc	720
gccgagcgcc aggtcggctg gctggcttgg tcgtggtacg gcaactcggg cggcgctcgag	780
tacctggacc tggctgaggg cccttcgggc cctctcacga gctggggcaa gcgcacgtc	840
tacggcgaga acggcctgaa gagcgactaa	870

<210> 11
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> *Bacillus clausii*

 <400> 11

ES 2 728 758 T3

Met	Lys	Arg	Glu	Asp	Met	Asp	Gln	Met	Lys	Arg	Lys	Arg	Leu	Gln	Leu	1	5	10	15
Phe	Gly	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Val	Leu	Phe	Val	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ser	20	25	30	
Ala	Tyr	Ala	Gln	Asn	Gly	Phe	His	Val	Ser	Gly	Thr	Glu	Leu	Leu	Asp	35	40	45	
Lys	Asn	Gly	Asp	Pro	Tyr	Val	Met	Arg	Gly	Val	Asn	His	Gly	His	Ser	50	55	60	
Trp	Phe	Lys	Gln	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Ile	Pro	Ala	Ile	Ala	Glu	Thr	65	70	75	80
Gly	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Met	Val	Leu	Ser	Asn	Gly	Gln	Gln	Trp	Glu	85	90	95	
Lys	Asp	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Thr	100	105	110	
Tyr	Gly	Leu	Thr	Thr	Val	Leu	Glu	Val	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Ser	Asp	115	120	125	
Asp	Pro	Ala	Asp	Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Glu	Met	Ala	130	135	140	
Asp	Val	Leu	Lys	Gly	Thr	Glu	Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Asn	Val	Ala	Asn	145	150	155	160
Glu	Trp	Tyr	Gly	Ser	Trp	Arg	Ser	Asp	Val	Trp	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ala	165	170	175	
Gln	Ala	Ile	Pro	Arg	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly	Leu	Ser	His	Thr	Leu	Met	180	185	190	
Val	Asp	Ala	Ala	Gly	Trp	Gly	Gln	Tyr	Pro	Ala	Ser	Ile	His	Glu	Arg	195	200	205	
Gly	Ala	Asp	Val	Phe	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Lys	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	210	215	220	
Ile	His	Met	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asp	Arg	Ala	Thr	Ile	Ala	Tyr	225	230	235	240

ES 2 728 758 T3

Asn Ile Asp Arg Val Leu Ala Glu Asn Leu Ala Val Val Ile Gly Glu
245 250 255

Phe Gly His Arg His His Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Ala Ile Leu
260 265 270

Ala Tyr Thr Ala Glu Arg Gln Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr
275 280 285

Gly Asn Ser Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Glu Gly Pro Ser
290 295 300

Gly Pro Leu Thr Ser Trp Gly Lys Arg Ile Val Tyr Gly Glu Asn Gly
305 310 315 320

Leu Lys Ser Asp

<210> 12

<211> 289

<212> PRT

<213> *Bacillus clausii*

<400> 12

Gln Asn Gly Phe His Val Ser Gly Thr Glu Leu Leu Asp Lys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Pro Tyr Val Met Arg Gly Val Asn His Gly His Ser Trp Phe Lys
20 25 30

Gln Asp Leu Glu Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Thr Gly Ala Asn
35 40 45

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

Ala Ser Glu Leu Ala Arg Val Leu Ala Ala Thr Glu Thr Tyr Gly Leu
65 70 75 80

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

Asp Leu Glu Lys Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Ala Asp Val Leu
100 105 110

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

ES 2 728 758 T3

Gly Ser Trp Arg Ser Asp Val Trp Ala Glu Ala Tyr Ala Gln Ala Ile
130 135 140

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

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

Val Phe Ala Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
180 185 190

Tyr Glu Tyr Ala Gly Ala Asp Arg Ala Thr Ile Ala Tyr Asn Ile Asp
195 200 205

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

Arg His His Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Ala Ile Leu Ala Tyr Thr
225 230 235 240

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

Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Glu Gly Pro Ser Gly Pro Leu
260 265 270

Thr Ser Trp Gly Lys Arg Ile Val Tyr Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ser
275 280 285

Asp

<210> 13
<211> 1473
<212> ADN
<213> *Bacillus hemicellulosilyticus*
<400> 13

ES 2 728 758 T3

atgagaaatt	tcggtaagtt	aattgtcagt	tcttgtcttc	tattcagttt	ttttcttttt	60
gcctctgatg	gtcatagcca	aacacattct	ggtttttata	tcgaagggtc	aaccctttat	120
gacgccaaacg	gagagccctt	tgtaatgaga	ggatatcaatc	atggacatgc	ctggtataaa	180
catgattcta	acgtcgctat	accagctatt	gctaatacaag	gagcaaatac	aattcggtatt	240
gttctgtcag	atggtggtca	atgggcaaaa	gatgatataa	acacattaaa	tcaagtgttc	300
gatttagcag	aggaacatga	gatgattgct	gttggtgagg	ttcacgatgc	aacaggatct	360
aattctatgg	ctgacttaaa	tcgtgctgtc	gattattgga	ttgaaatgaa	agacgcttta	420
attgaaaaag	aagatcgct	cataattaac	attgccaatg	aatggtatgg	agcatgggac	480
ggacaaggct	gggcaaatgg	ctataaggag	gttattccac	gtttacgaaa	tgctggcttc	540
actcatacat	taatggtaga	tgtagctggt	tggggacaat	accctcaatc	gattcatgat	600
tatggtcaag	aggtatttaa	tgctgatcct	ttagcaaata	cgatgttttc	catccatag	660
tatgaatatg	ctggcggaag	tgcttcaatg	gtacaatcta	atatcgatgg	tgctgctgat	720
caagggttag	ctcttgtaat	aggagaattt	gggcatatgc	atacggacgg	agatgttgat	780
gaagcaacga	tattgagcta	ctcgcaacaa	agaggagtcg	gttggctagc	ttggtcttgg	840
aaaggcaatg	ggactcaatg	ggaatatcta	gatttatctt	atgattggca	aggaacaaac	900
ttaacttctt	ggggaaatac	cattgtccac	gggcctaattg	gattactcga	aacatccatt	960
ccaagctcga	ttttccatac	cgctccaaac	aatggagatc	cccctcctca	taacggtaat	1020
gaaacgatct	tatatgattt	cgaacatggc	actcaaggct	ggtcagggtc	ttcacttctt	1080
ggaggacctt	ggacgacgaa	tgaatggagt	acaaatggta	accattcatt	aaaggccgat	1140
atcttcttat	cagctaactc	caaacatgaa	ttagcaaaaag	ttgaaaatcg	aaatttatca	1200
ggctactcta	ctttacaagc	cactgtccgc	catgcacatt	ggggaaatgt	tggttaattta	1260
acggcgagaa	tgtatgtaaa	aacgggctca	aactatagct	ggtttaatgg	tgatcctatc	1320
ccagtaaaact	cagcaaatgg	tacgactgtc	actttgcctc	tttcatctat	tccaaaccta	1380
aatgacgtaa	aagaaattgg	cgttgaattt	attggagctt	caaatagcaa	tggaacaaacc	1440
gccatttatt	tagatcatgt	aacaatccaa	taa			1473

5 <210> 14
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> *Bacillus hemicellulosilyticus*

10 <400> 14

ES 2 728 758 T3

cagacccact cgggcttcta catcgagggc tcgacgtctt acgacgctaa cggcgagcct	60
tttgtcatgc gcggcatcaa ccacggccac gcctggtaca agcacgactc caacgtcgct	120
atccctgcta tcgctaacca gggcgctaac accatccgca tcgtcctcag cgacggtggc	180
cagtgggcca aggacgacat caacacgctg aaccagggtcc tcgacctggc cgaggagcac	240
gagatgatcg ctgtcgtcga ggtccacgac gctaccggct ccaacagcat ggccgacctc	300
aaccgcgccg tcgactactg gatcgagatg aaggacgccc tgatcggcaa ggaagaccgc	360
gtcatcatca acatcgctaa cgagtggtag ggcgcttggg acggccaggg ctgggccaac	420
ggctacaagg aagtcatccc tcgcctgcgc aacgctggct tcacccacac cctcatggtc	480
gacgctgccg gctggggcca gtaccctcag agcatccacg actacggcca agaggtcttc	540
aacgccgacc ctctggccaa caccatgttc tccatccaca tgtacgagta cgctggcggc	600
aacgcctcca tgggtccagag caacatcgac ggcgtcgtcg accagggcct cgctctggtc	660
atcggcgagt tcggccacat gcacacggac ggcgacgtcg acgaggctac catcctgagc	720
tactcgcagc agcgcggcgt cggctggctg gcctggtcgt ggaagggcaa cggcaccacg	780
tgggagtacc tcgacctgag ctacgactgg cagggcacca acctcacgtc gtggggcaac	840
acgatcgtcc acggccctaa cggcctcctg gagacgtcca tcccttccag catctttcac	900
accgctccta acaacggcga ccctcctccc cacaacggca acgagacgat cctgtacgac	960
ttcgagcacg gcacgcaggg ctggctgggg tcgtccctgc tgggcggccc ttggaccacc	1020
aacgagtggg cgaccaacgg caaccactcc ctcaaggccg acatcttcct gtccgccaac	1080
agcaagcacg agctcgccaa ggtcgagaac cgcaacctca gcggctactc gacgctgcag	1140
gctaccgtcc gccacgtca ctggggcaac gtcggcaacc tgacggctcg catgtacgtc	1200
aagacgggca gcaactactc gtggttcaac ggcgaccca tccctgtcaa ctcggtaac	1260
ggcaccaccg tcaccctccc tctgagctcg atccccaacc tcaacgacgt caaggagatc	1320
ggcgtcgagt tcatcggcgc tagcaacagc aacggccaga ccgccatcta cctggaccac	1380
gtcacgatcc agtaa	1395

<210> 15
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> *Bacillus hemicellulosilyticus*
 <400> 15

ES 2 728 758 T3

Met Arg Asn Phe Gly Lys Leu Ile Val Ser Ser Cys Leu Leu Phe Ser
1 5 10 15

Phe Phe Leu Phe Ala Ser Asp Gly His Ser Gln Thr His Ser Gly Phe
20 25 30

Tyr Ile Glu Gly Ser Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly Glu Pro Phe Val
35 40 45

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

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

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

Asn Gln Val Leu Asp Leu Ala Glu Glu His Glu Met Ile Ala Val Val

ES 2 728 758 T3

100	105	110
Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asn Ser Met Ala Asp Leu Asn Arg		
115	120	125
Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Ala Leu Ile Gly Lys Glu		
130	135	140
Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Ala Trp Asp		
145	150	155
Gly Gln Gly Trp Ala Asn Gly Tyr Lys Glu Val Ile Pro Arg Leu Arg		
165	170	175
Asn Ala Gly Phe Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly		
180	185	190
Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Glu Val Phe Asn Ala		
195	200	205
Asp Pro Leu Ala Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala		
210	215	220
Gly Gly Asn Ala Ser Met Val Gln Ser Asn Ile Asp Gly Val Val Asp		
225	230	235
Gln Gly Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His Met His Thr Asp		
245	250	255
Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ser Tyr Ser Gln Gln Arg Gly		
260	265	270
Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly Thr Gln Trp Glu		
275	280	285
Tyr Leu Asp Leu Ser Tyr Asp Trp Gln Gly Thr Asn Leu Thr Ser Trp		
290	295	300
Gly Asn Thr Ile Val His Gly Pro Asn Gly Leu Leu Glu Thr Ser Ile		
305	310	315
Pro Ser Ser Ile Phe His Thr Ala Pro Asn Asn Gly Asp Pro Pro Pro		
325	330	335
His Asn Gly Asn Glu Thr Ile Leu Tyr Asp Phe Glu His Gly Thr Gln		
340	345	350

ES 2 728 758 T3

Gly Trp Ser Gly Ser Ser Leu Leu Gly Gly Pro Trp Thr Thr Asn Glu
355 360 365

Trp Ser Thr Asn Gly Asn His Ser Leu Lys Ala Asp Ile Phe Leu Ser
370 375 380

Ala Asn Ser Lys His Glu Leu Ala Lys Val Glu Asn Arg Asn Leu Ser
385 390 395 400

Gly Tyr Ser Thr Leu Gln Ala Thr Val Arg His Ala His Trp Gly Asn
405 410 415

Val Gly Asn Leu Thr Ala Arg Met Tyr Val Lys Thr Gly Ser Asn Tyr
420 425 430

Ser Trp Phe Asn Gly Asp Pro Ile Pro Val Asn Ser Ala Asn Gly Thr
435 440 445

Thr Val Thr Leu Pro Leu Ser Ser Ile Pro Asn Leu Asn Asp Val Lys
450 455 460

Glu Ile Gly Val Glu Phe Ile Gly Ala Ser Asn Ser Asn Gly Gln Thr
465 470 475 480

Ala Ile Tyr Leu Asp His Val Thr Ile Gln
485 490

<210> 16
<211> 464
<212> PRT
<213> *Bacillus hemicellulosilyticus*
<400> 16

Gln Thr His Ser Gly Phe Tyr Ile Glu Gly Ser Thr Leu Tyr Asp Ala
1 5 10 15

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

Tyr Lys His Asp Ser Asn Val Ala Ile Pro Ala Ile Ala Asn Gln Gly
35 40 45

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

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

ES 2 728 758 T3

Glu	Met	Ile	Ala	Val	Val	Glu	Val	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Ser	Asn	Ser		
				85					90					95			
Met	Ala	Asp	Leu	Asn	Arg	Ala	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Glu	Met	Lys	Asp		
			100					105					110				
Ala	Leu	Ile	Gly	Lys	Glu	Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Asn	Ile	Ala	Asn	Glu		
			115				120					125					
Trp	Tyr	Gly	Ala	Trp	Asp	Gly	Gln	Gly	Trp	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Glu		
	130					135					140						
Val	Ile	Pro	Arg	Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	His	Thr	Leu	Met	Val		
145					150					155					160		
Asp	Ala	Ala	Gly	Trp	Gly	Gln	Tyr	Pro	Gln	Ser	Ile	His	Asp	Tyr	Gly		
			165						170					175			
Gln	Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	Ile		
			180					185					190				
His	Met	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Val	Gln	Ser	Asn		
	195						200					205					
Ile	Asp	Gly	Val	Val	Asp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	Glu	Phe		
	210					215					220						
Gly	His	Met	His	Thr	Asp	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Leu	Ser		
225					230					235					240		
Tyr	Ser	Gln	Gln	Arg	Gly	Val	Gly	Trp	Leu	Ala	Trp	Ser	Trp	Lys	Gly		
				245					250					255			
Asn	Gly	Thr	Gln	Trp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asp	Trp	Gln	Gly		
			260					265					270				
Thr	Asn	Leu	Thr	Ser	Trp	Gly	Asn	Thr	Ile	Val	His	Gly	Pro	Asn	Gly		
		275					280					285					
Leu	Leu	Glu	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser	Ser	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Pro	Asn		
	290					295					300						
Asn	Gly	Asp	Pro	Pro	Pro	His	Asn	Gly	Asn	Glu	Thr	Ile	Leu	Tyr	Asp		
305					310					315					320		
Phe	Glu	His	Gly	Thr	Gln	Gly	Trp	Ser	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly		
				325					330					335			

ES 2 728 758 T3

Pro Trp Thr Thr Asn Glu Trp Ser Thr Asn Gly Asn His Ser Leu Lys
340 345 350

Ala Asp Ile Phe Leu Ser Ala Asn Ser Lys His Glu Leu Ala Lys Val
355 360 365

Glu Asn Arg Asn Leu Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Gln Ala Thr Val Arg
370 375 380

His Ala His Trp Gly Asn Val Gly Asn Leu Thr Ala Arg Met Tyr Val
385 390 395 400

Lys Thr Gly Ser Asn Tyr Ser Trp Phe Asn Gly Asp Pro Ile Pro Val
405 410 415

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

Asn Leu Asn Asp Val Lys Glu Ile Gly Val Glu Phe Ile Gly Ala Ser
435 440 445

Asn Ser Asn Gly Gln Thr Ala Ile Tyr Leu Asp His Val Thr Ile Gln
450 455 460

<210> 17

<211> 1449

<212> ADN

<213> *Virgibacillus soli*

<400> 17

atgttattct ctacttcact gtttacttct acttcaaaag cgaatgcagc aagcggggtt	60
tatgtaaacg gaaacacact ctatgacgca acaggtaccc cttttgtgat aagaggaatc	120
aatcatgctc actcttggtt taaagacgac acagcaaccg caatacctgc cattgcagca	180
actggggcga atactattag aatcgtatta tcggatggca gccaatatag tcgggatgat	240
attgatggcg tgaggaatct aatatcattg gctgaggaaa ataataat tgctatgtta	300
gaggtccacg atgctactgg aaaagatgat atcagctcat tagatagtgc ggcagattat	360
tggattagta taaaagaagc acttatcggc aaggaagaca aagtcctaata aaacatcgca	420
aatgaatggg acggtacttg ggatggggct agttggggcg atggctacaa acaagtgatt	480
cccaaattaa gaaatgcagg acttaaccac acactaatag tagactctgc tggctggggg	540
caatttcggg agtccattca caattacgga aaagaagtat tcaatgctga cccctacaa	600
aatacaatgt tctctattca tatgtatgaa tatgctgggtg gggacgcttc tactgtcaaa	660
gcaaataattg acggtgtatt aaatcaagggt ctagccgtaa tcattggaga atttggacat	720
aggcatacag acggagatgt agatgaagca acaattatga attattccca agagaaaaat	780
gttggctggc tcgcatggct gtggaaagggt aatggcatgg aatgggatta tttagactta	840
tcctatgatt gggccgga aaacctaac gactggggaa ataccattgt aaatagtaca	900
aacggcttaa aagctacatc tgaaataagt ccagtatttg gagatggaga tgacgggtga	960
ggcgacggtg gtcctgggga ttctaacgga actgaaacta cgctttataa cttcgaaacc	1020
gggacagaag gatggagcgg cgaaaatata gaaactggac cttgggtcagt gaatgagtgg	1080
gcagcaaaag gtaaccactc tttaaaagct gatgttaatt tgggtgataa ctctgaacat	1140
tatctatacc taactcaaaa cctaaatttt agcggaaagt cacaactcac agcgactgta	1200
aagcatgctg attggggaaa cttcggggat gaaataaatg caaagttata tgtaaaaaca	1260
gaatcagatt ggcaatggtt tgatggagga attgaaaaga tcaattcttc aattggaact	1320
attataacct tagatttatc atcgctctca aacccaagtg atattaaaga agttgggtgtt	1380
cagtttacgg gttcttcaaa tagttatggc ctaacagctt tatatgttga taacgttacc	1440
attaaataa	1449

<210> 18
 <211> 1401
 <212> ADN
 <213> *Virgibacillus soli*

<400> 18

ES 2 728 758 T3

```

gcctcgggct tctacgtcaa cggcaacact ctctacgacg ccacgggcac cccatttgtc      60
atccgcggca tcaaccacgc tcaactcgtgg ttcaaggacg aactgccac cgctatccct      120
gctatcgctg ctacggggcg caacacgacg cgcacgtcc tcagcgacgg ctgcgagtac      180
tcccgcgacg acatcgacgg cgtccgcaac ctcatctccc tggccgagga gaacaacctc      240
atcgccatgc tggaggtcca cgacgctacc ggcaaggacg acatcagctc gctggacagc      300
gccgcccact actggatctc gatcaaggaa gccctcatcg gcaaggaaga caaggctctg      360
atcaacatcg ccaacgagtg gtacggcacc tgggacggcg ctagctgggc tgacggctac      420
aagcaggtca tccctaagct ccgcaacgcc ggcctcaacc acacgctcat cgtcgactcg      480
gctggctggg gccagttccc ggagagcatc cacaactacg gcaaggaagt cttcaacgcc      540
gacccccctg agaacacgat gttctcgatc cacatgtacg agtacgccgg cggcgacgct      600
tccacggtca aggccaacat cgacggcgct ctcaaccagg gcctggctgt catcatcggc      660
gagtttggcc accgccacac cgacggcgac gtcgacgagg ccaccatcat gaactacagc      720
caggagaaga acgtcggctg gctggcttgg agctggaagg gcaacggcat ggagtgggac      780
tacctcgacc tgagctacga ctggggccgg aacaacctca ccgactgggg caacacgacg      840
gtcaactcga ccaacggcct gaaggccacc tcggagatca gccctgtctt tggcgacggc      900

gacgacggcg tcggcgacgg tggccccggc gacagcaacg gcaccgagac gacgctgtac      960
aactttgaga cgggcaccga gggctggagc ggcgagaaca tcgagacggg cccttggctg      1020
gtcaacgagt gggctgcaa gggcaaccac tccctcaagg ccgacgtcaa cctgggagac      1080
aacagcgagc actacctcta cctgacgcag aacctcaact tctccggcaa gtcgcagctg      1140
acggctaccg tcaagcacgc tgactggggc aacttcggcg acgagatcaa cgccaagctc      1200
tacgtcaaga ccgagagcga ctggcagtgg ttcgacggtg gcatcgagaa gatcaactcc      1260
agcatcggca ccatcatcac gtcgacctg tcgtccctgt cgaacccgtc cgacatcaag      1320
gaagtcggcg tccagttcac tggctcgtct aactcttacg gcctcactgc tctttacgtc      1380
gacaacgtca ctatcaagta g                                     1401

```

<210> 19
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> *Virgibacillus soli*

<400> 19

ES 2 728 758 T3

Met	Leu	Phe	Ser	Thr	Ser	Leu	Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Lys	Ala	Asn	Ala	1	5	10	15
Ala	Ser	Gly	Phe	Tyr	Val	Asn	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Thr	Gly	20	25	30	
Thr	Pro	Phe	Val	Ile	Arg	Gly	Ile	Asn	His	Ala	His	Ser	Trp	Phe	Lys	35	40	45	
Asp	Asp	Thr	Ala	Thr	Ala	Ile	Pro	Ala	Ile	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Asn	50	55	60	
Thr	Ile	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Gln	Tyr	Ser	Arg	Asp	Asp	65	70	75	80
Ile	Asp	Gly	Val	Arg	Asn	Leu	Ile	Ser	Leu	Ala	Glu	Glu	Asn	Asn	Leu	85	90	95	
Ile	Ala	Met	Leu	Glu	Val	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Lys	Asp	Asp	Ile	Ser	100	105	110	
Ser	Leu	Asp	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Trp	Ile	Ser	Ile	Lys	Glu	Ala	Leu	115	120	125	
Ile	Gly	Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Leu	Ile	Asn	Ile	Ala	Asn	Glu	Trp	Tyr	130	135	140	
Gly	Thr	Trp	Asp	Gly	Ala	Ser	Trp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	Gln	Val	Ile				

ES 2 728 758 T3

145		150		155		160									
Pro	Lys	Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Asn	His	Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Ser
				165					170					175	
Ala	Gly	Trp	Gly	Gln	Phe	Pro	Glu	Ser	Ile	His	Asn	Tyr	Gly	Lys	Glu
			180					185					190		
Val	Phe	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Gln	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	Ile	His	Met
		195					200					205			
Tyr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Asp	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	Ala	Asn	Ile	Asp
	210					215					220				
Gly	Val	Leu	Asn	Gln	Gly	Leu	Ala	Val	Ile	Ile	Gly	Glu	Phe	Gly	His
225					230					235					240
Arg	His	Thr	Asp	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ser
				245					250					255	
Gln	Glu	Lys	Asn	Val	Gly	Trp	Leu	Ala	Trp	Ser	Trp	Lys	Gly	Asn	Gly
			260					265					270		
Met	Glu	Trp	Asp	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asp	Trp	Ala	Gly	Asn	Asn
		275					280					285			
Leu	Thr	Asp	Trp	Gly	Asn	Thr	Ile	Val	Asn	Ser	Thr	Asn	Gly	Leu	Lys
	290					295					300				
Ala	Thr	Ser	Glu	Ile	Ser	Pro	Val	Phe	Gly	Asp	Gly	Asp	Asp	Gly	Val
305					310					315					320
Gly	Asp	Gly	Gly	Pro	Gly	Asp	Ser	Asn	Gly	Thr	Glu	Thr	Thr	Leu	Tyr
				325					330					335	
Asn	Phe	Glu	Thr	Gly	Thr	Glu	Gly	Trp	Ser	Gly	Glu	Asn	Ile	Glu	Thr
			340					345					350		
Gly	Pro	Trp	Ser	Val	Asn	Glu	Trp	Ala	Ala	Lys	Gly	Asn	His	Ser	Leu
		355					360					365			
Lys	Ala	Asp	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Asn	Ser	Glu	His	Tyr	Leu	Tyr	Leu
	370					375					380				
Thr	Gln	Asn	Leu	Asn	Phe	Ser	Gly	Lys	Ser	Gln	Leu	Thr	Ala	Thr	Val
385					390					395					400

ES 2 728 758 T3

Lys His Ala Asp Trp Gly Asn Phe Gly Asp Glu Ile Asn Ala Lys Leu
405 410 415

Tyr Val Lys Thr Glu Ser Asp Trp Gln Trp Phe Asp Gly Gly Ile Glu
420 425 430

Lys Ile Asn Ser Ser Ile Gly Thr Ile Ile Thr Leu Asp Leu Ser Ser
435 440 445

Leu Ser Asn Pro Ser Asp Ile Lys Glu Val Gly Val Gln Phe Thr Gly
450 455 460

Ser Ser Asn Ser Tyr Gly Leu Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr
465 470 475 480

Ile Lys

<210> 20

<211> 466

<212> PRT

<213> *Virgibacillus soli*

<400> 20

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

Thr Pro Phe Val Ile Arg Gly Ile Asn His Ala His Ser Trp Phe Lys
20 25 30

Asp Asp Thr Ala Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Ala Thr Gly Ala Asn
35 40 45

Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Ser Gln Tyr Ser Arg Asp Asp
50 55 60

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

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

Ser Leu Asp Ser Ala Ala Asp Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Glu Ala Leu
100 105 110

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

ES 2 728 758 T3

Gly Thr Trp Asp Gly Ala Ser Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Val Ile
 130 135 140

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

Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Glu Ser Ile His Asn Tyr Gly Lys Glu
 165 170 175

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

Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Ser Thr Val Lys Ala Asn Ile Asp
 195 200 205

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

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

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

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

Leu Thr Asp Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Ser Thr Asn Gly Leu Lys
 275 280 285

Ala Thr Ser Glu Ile Ser Pro Val Phe Gly Asp Gly Asp Asp Gly Val
 290 295 300

Gly Asp Gly Gly Pro Gly Asp Ser Asn Gly Thr Glu Thr Thr Leu Tyr
 305 310 315 320

Asn Phe Glu Thr Gly Thr Glu Gly Trp Ser Gly Glu Asn Ile Glu Thr
 325 330 335

Gly Pro Trp Ser Val Asn Glu Trp Ala Ala Lys Gly Asn His Ser Leu
 340 345 350

Lys Ala Asp Val Asn Leu Gly Asp Asn Ser Glu His Tyr Leu Tyr Leu
 355 360 365

Thr Gln Asn Leu Asn Phe Ser Gly Lys Ser Gln Leu Thr Ala Thr Val
 370 375 380

ES 2 728 758 T3

Lys His Ala Asp Trp Gly Asn Phe Gly Asp Glu Ile Asn Ala Lys Leu
385 390 395 400

Tyr Val Lys Thr Glu Ser Asp Trp Gln Trp Phe Asp Gly Gly Ile Glu
405 410 415

Lys Ile Asn Ser Ser Ile Gly Thr Ile Ile Thr Leu Asp Leu Ser Ser
420 425 430

Leu Ser Asn Pro Ser Asp Ile Lys Glu Val Gly Val Gln Phe Thr Gly
435 440 445

Ser Ser Asn Ser Tyr Gly Leu Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr
450 455 460

Ile Lys
465

5 <210> 21
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

15 <400> 21
agtcaatcgc gacaagcgcc agaccactc gggcttctac atcgagggct cgacgtcta 60

20 <210> 22
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador

30 <400> 22
cgcgccggat ccttactgga tcgtgacgtg gtccaggtag atggcg 46

35 <210> 23
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

45 <400> 23
agtcaatcgc gacaagcgcc agaacggctt ccacgtctcc ggcacggagc tcctggacaa 60

50 <210> 24
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador

ES 2 728 758 T3

<400> 24
cgcgccggat ccttagtcgc tcttcaggcc gttctgcgcg tagacgatgc g 51

<210> 25
<211> 1846
<212> ADN
<213> *Bacillus pumilus*

<400> 25

atgaaaaaat	gggttcaacg	ggtggcttgt	tttatgctgc	tgatcacttt	atgggcgggt	60
tggttcactc	tgaccgtaaa	ggcctcctcc	tatgtgcaaa	catctggtac	acattttgta	120
ttgaacaacc	accattttta	ctttgctggc	acaaataatt	attattttcca	ttacaaatca	180
aaaaagatgg	tagatgctgt	ttttgacgat	atgaaggcaa	tggatttaaa	ggttattcgt	240
atgtggggat	ttcacgatgg	taccctctca	gaaaactcag	tcttacaatc	tcgtccaggt	300
gtttatgaag	aatccggttt	tcaaaaacta	gactatgcga	tttataaagc	agggcaggaa	360
ggaatcaagc	tggtcatacc	gctcgtgaac	aattgggatg	actttggcgg	gatgaatcaa	420
tatgtgaagt	ggtttcaggc	aggatcacat	gatcactttt	atacagattc	tcggattaaa	480
acagcttaca	aaaactatgt	gcgctatgta	ttagagagaa	ccaatacgtc	ctcaggtgtt	540
caatataaag	atgaccctgc	tattatgaca	tgggagctcg	ccaatgagcc	gcgcgctcag	600
tcagaccctt	cgggagatat	actagtaaac	tgggcagatg	aaatgagtgc	atggatcaaa	660
tcaattgact	cgaatcatct	tggtgctgta	ggagacgaag	ggttcctttc	catgacaggt	720
catgatgatt	ggttttacag	tggaggagaa	ggtgttgatt	gggatcgttt	gactgctctc	780
cctcatattg	attatggaac	ctatcattta	taccgcgcatc	actggaatca	gtctgctgca	840
tggggagtga	aatggatcaa	agatcatatc	acccgaggaa	acgcaatcgg	aaaacctgtt	900
gtattagaag	agtttggtta	tcaaaatcaa	gcagcccgtc	ctgatgtata	tgatagctgg	960
ctgaagacaa	ttgaacagct	cggaggcgca	ggtagccaat	tttggatttt	aacaagcatt	1020
caagacgatg	attccctcta	cccggattat	gatgggtttt	gagtttttaa	ggagagccgg	1080
gaggcaggaa	ttattcgtga	acacgcctaa	agaatgaatg	aaaagaactg	atgaagaatg	1140
cctgtttata	aggaacttca	tttgcataaa	aaaattggat	atggtatagt	ttttatggaa	1200
atgctaacga	ttaccgagac	aagagtgggg	aaacccgctc	ttttgtattg	aacaggcaat	1260
ttttgtctcg	acattattca	tccgttttct	gctccccctg	ctcacaataa	agcagggttt	1320
ttatgcagaa	tgattgataa	gagcgtttat	cgaaagcaca	aggaggaaga	gaatgagcaa	1380
aaaagtagtg	gatatcgtaa	gcgacatggg	gcagccaatt	ttagatggct	tacagcttga	1440

ES 2 728 758 T3

```

actcgttgat gttgaatttg tcaaagaggg tcaaaactgg ttccttcgcg tattttattga      1500
ctctgataaa ggcgtcgata tcgaggagtg tgccaaagtg agcgaagcct tgagcgaaaa      1560
gcttgatgag gcagatccaa ttagccaaaa ctactttctt gaagtgtcct ctccctggagc      1620
ggagcgccca ttaaagaaaa aagctgattt tgaaaaagca cttggaaaaa atgttttcat      1680
gaaaacatac gaaccaattg atggtgaaaa ggcatttgaa ggtgagctta caagctttga      1740
tggtgagatt gcaacagtga cagtgaagat caagacaaga aagaaagaga tcaatattcc      1800
atacgaaaaa attgctaacg caagattagc agtttcgttc aattaa      1846

```

<210> 26
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> *Bacillus pumilus*

<400> 26

```

Met Lys Lys Trp Val Gln Arg Val Ala Cys Phe Met Leu Leu Ile Thr
 1              5              10              15

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

Gln Thr Ser Gly Thr His Phe Val Leu Asn Asn His Pro Phe Tyr Phe
          35              40              45

Ala Gly Thr Asn Asn Tyr Tyr Phe His Tyr Lys Ser Lys Lys Met Val
 50              55              60

Asp Ala Val Phe Asp Asp Met Lys Ala Met Asp Leu Lys Val Ile Arg
65              70              75              80

Ile Trp Gly Phe His Asp Gly Thr Pro Gln Glu Asn Ser Val Leu Gln
          85              90              95

Ser Arg Pro Gly Val Tyr Glu Glu Ser Gly Phe Gln Lys Leu Asp Tyr
          100             105             110

Ala Ile Tyr Lys Ala Gly Gln Glu Gly Ile Lys Leu Val Ile Pro Leu
          115             120             125

Val Asn Asn Trp Asp Asp Phe Gly Gly Met Asn Gln Tyr Val Lys Trp
          130             135             140

Phe Gln Ala Gly Ser His Asp His Phe Tyr Thr Asp Ser Arg Ile Lys
          145             150             155             160

```

ES 2 728 758 T3

Thr Ala Tyr Lys Asn Tyr Val Arg Tyr Val Leu Glu Arg Thr Asn Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Gly Val Gln Tyr Lys Asp Asp Pro Ala Ile Met Thr Trp Glu
 180 185 190
 Leu Ala Asn Glu Pro Arg Ala Gln Ser Asp Pro Ser Gly Asp Ile Leu
 195 200 205
 Val Asn Trp Ala Asp Glu Met Ser Ala Trp Ile Lys Ser Ile Asp Ser
 210 215 220
 Asn His Leu Val Ala Val Gly Asp Glu Gly Phe Phe Arg Met Thr Gly
 225 230 235 240
 His Asp Asp Trp Phe Tyr Ser Gly Gly Glu Gly Val Asp Trp Asp Arg
 245 250 255
 Leu Thr Ala Leu Pro His Ile Asp Tyr Gly Thr Tyr His Leu Tyr Pro
 260 265 270
 Asp His Trp Asn Gln Ser Ala Ala Trp Gly Val Lys Trp Ile Lys Asp
 275 280 285
 His Ile Thr Arg Gly Asn Ala Ile Gly Lys Pro Val Val Leu Glu Glu
 290 295 300
 Phe Gly Tyr Gln Asn Gln Ala Ala Arg Pro Asp Val Tyr Asp Ser Trp
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Ile Glu Gln Leu Gly Gly Ala Gly Ser Gln Phe Trp Ile
 325 330 335
 Leu Thr Ser Ile Gln Asp Asp Asp Ser Leu Tyr Pro Asp Tyr Asp Gly
 340 345 350
 Phe Arg Val Leu Lys Glu Ser Arg Glu Ala Gly Ile Ile Arg Glu His
 355 360 365
 Ala Lys Arg Met Asn Glu Lys Asn
 370 375

<210> 27
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*
 <400> 27

ES 2 728 758 T3

atgctcaaaa agttcgcagt ctgtctgtct atcatTTTTat tactcatctc agccgcccggt	60
ccgatatcgg ctcacaccgt ttaccctgtc aatcccaatg cccagcagac gacaaaagac	120
gtcatgaact ggctggcgca tttgcccaac cgttcagaaa acaggggtcat gtccgggtgca	180
ttcggcgggt acagcgatgt caccttttca atgacggagg aaaaccgctt gaaaaacgcg	240
acgggacagt ctcccgccat ctacggctgt gattatggga gaggggtggct ggaaacatcg	300
gatatcaccg attctatcga ctacagctgc aacagcagcc tcatttcgta ctggaaaagc	360
ggcggcctcc ctcaggtcag cctgcatctc gcaaatacgg cctttccatc aggacactat	420
aaaacggcca tttcaaacag ccagtataaa aatatcctga acccttcaac tgttgaagga	480
cggcggcttg aggccttgct cagcaaaatc gccgacggcc ttactcagct gaaaaatcaa	540
ggcgtcaccg ttctgttcag gccgctgcat gagatgaacg gtgaatggtt ctgggtggggg	600
ctgacaggct acaaccaaaa agacactgag agaatactgc tgtacaaaga gctttacaag	660
aagatatacc gctatatgac agagacaaga ggattggata atcttttgtg ggtgtattcg	720
cctgatgcca acagagactt caaaacagac ttctaccag gctcatctta tgtggatatt	780
accggactgg atgcttactt caccgacccg tatgcgatat caggctatga tgaaatgctg	840
tctctgaaaa aaccgtttgc ctttgccgag accgggtccg ccgtaatat cggaagcttt	900
gattacgctg tttttatcaa tgcgatcagg caaaagtatc ccgagacaac ctactttttg	960
acatgggatg aacaattaag cccggcagcc aatcaaggcg cgcaaagcct ttatcaaaac	1020
agctggacgc tgaacaaggg cgaaatgtgg aatggcggaa ccttgacgcc gatcgcgga	1080
taa	1083

<210> 28

<211> 360

<212> PRT

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 28

ES 2 728 758 T3

Met Leu Lys Lys Phe Ala Val Cys Leu Ser Ile Ile Leu Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Ala Ala Arg Pro Ile Ser Ala His Thr Val Tyr Pro Val Asn Pro
20 25 30

Asn Ala Gln Gln Thr Thr Lys Asp Val Met Asn Trp Leu Ala His Leu
35 40 45

Pro Asn Arg Ser Glu Asn Arg Val Met Ser Gly Ala Phe Gly Gly Tyr
50 55 60

Ser Asp Val Thr Phe Ser Met Thr Glu Glu Asn Arg Leu Lys Asn Ala
65 70 75 80

ES 2 728 758 T3

Thr Gly Gln Ser Pro Ala Ile Tyr Gly Cys Asp Tyr Gly Arg Gly Trp
 85 90 95

Leu Glu Thr Ser Asp Ile Thr Asp Ser Ile Asp Tyr Ser Cys Asn Ser
 100 105 110

Ser Leu Ile Ser Tyr Trp Lys Ser Gly Gly Leu Pro Gln Val Ser Leu
 115 120 125

His Leu Ala Asn Pro Ala Phe Pro Ser Gly His Tyr Lys Thr Ala Ile
 130 135 140

Ser Asn Ser Gln Tyr Lys Asn Ile Leu Asn Pro Ser Thr Val Glu Gly
 145 150 155 160

Arg Arg Leu Glu Ala Leu Leu Ser Lys Ile Ala Asp Gly Leu Thr Gln
 165 170 175

Leu Lys Asn Gln Gly Val Thr Val Leu Phe Arg Pro Leu His Glu Met
 180 185 190

Asn Gly Glu Trp Phe Trp Trp Gly Leu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Asp
 195 200 205

Thr Glu Arg Ile Ser Leu Tyr Lys Glu Leu Tyr Lys Lys Ile Tyr Arg
 210 215 220

Tyr Met Thr Glu Thr Arg Gly Leu Asp Asn Leu Leu Trp Val Tyr Ser
 225 230 235 240

Pro Asp Ala Asn Arg Asp Phe Lys Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Ser Ser
 245 250 255

Tyr Val Asp Ile Thr Gly Leu Asp Ala Tyr Phe Thr Asp Pro Tyr Ala
 260 265 270

Ile Ser Gly Tyr Asp Glu Met Leu Ser Leu Lys Lys Pro Phe Ala Phe
 275 280 285

Ala Glu Thr Gly Pro Ser Gly Asn Ile Gly Ser Phe Asp Tyr Ala Val
 290 295 300

Phe Ile Asn Ala Ile Arg Gln Lys Tyr Pro Glu Thr Thr Tyr Phe Leu
 305 310 315 320

Thr Trp Asp Glu Gln Leu Ser Pro Ala Ala Asn Gln Gly Ala Gln Ser

ES 2 728 758 T3

325

330

335

Leu Tyr Gln Asn Ser Trp Thr Leu Asn Lys Gly Glu Met Trp Asn Gly
340 345 350

Gly Thr Leu Thr Pro Ile Ala Glu
355 360

<210> 29

<211> 1494

<212> ADN

<213> *Amphibacillus xylanus*

<400> 29

5

ES 2 728 758 T3

gtgaagttaa ctaaactaaa actattgagt agtgtatttt ttgttgatt aactgtgtta	60
atgttgtttg tccctgggaa tattgtgaat gtaaaagctg ctaacggctt ttatgtaagc	120
gattccaatc tgtatgatgc aaatggaaat caatttggtt tgcgtggggt taatcatgcc	180
cattcatggt ataaggacac gtataccgag gcaattcctg caattgcggc tacaggagcg	240
aatactatcc gaattgtatt atctgatgga gggcaatacc aaaaagatga tataaacata	300
gtcagaaatt tgattgaaac cgcagaagcc aataatttag tcgctgtact tgaggttcat	360
gatgctactg ggtcggattc attatcggat ttgaaccggg ctgtagatta ttggattgaa	420
attaaagatg cgtaattgg taaagaagat acggtgatca taaacattgt caatgaatgg	480
tatggcactt gggatggtcg tctctgggca gatgggtata aacaggcgat accgagatta	540
agagatgctg gattaacaca tacgttgatg attgatgcag caggttgggg gcaatttcct	600
agctcgatcc atcaatatgg tagagaagta tttaatgcag atcgtttagg gaatacaatg	660
ttttcgattc atatgtatga atatgctggc ggtgatgatc aaatggtag agataatatt	720
aacggtgtga tcaatcaaga cttagctcta gtgattggtg aatttgggtca ttatcacaca	780
gatggcgatg ttgatgaaga tacgattttg agttacgcgg agcagacagg tgttggttgg	840
ttagcatggt catggaaagg caatggaact gagtgggagt atcttgatct atcaaatgat	900
tggggaggaa attatttaac atcttggggg gacaggattg taaatggagc aaatggatta	960
agagaaacga gtcaaattgc ttctgttttt tcaggaaaca atggcgggac tcctggaaat	1020
ggtgaggaag agactcctgg tgatgtaagt catttcgcaa acttcgagaa tggtagttaa	1080
ggttgggaag caagcaatgt atctggtgga ccttgggcaa caaatgaatg gagtgctagt	1140
ggttcatatg ctttaaaagc cgatgcgcaa ttagcatctg gaagagaaca ctatttatat	1200
cgaatcggtc cctttaattt atctgggtca acattaaacg caacggtaag gggtgcta	1260
tgggggaatt atggatctgg tatcgacgtg aagctatacg ttaagtacgg agatggctgg	1320
acgtggagag atagtgggtg acagacaatt agagcgggag aatctattga tctatcacta	1380
gatttatcaa atgttgatcg ctcaaacatt agagaagttg gtatccagtt tattggtgga	1440
aatcattcat ctggaaaaac cgctttttat gttgatcatg tttattcaca ttag	1494

<210> 30
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> *Amphibacillus xylanus*
 <400> 30

ES 2 728 758 T3

Val 1	Lys	Leu	Thr	Lys 5	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser 10	Ser	Val	Phe	Phe	Val 15	Val
Leu	Thr	Val	Leu 20	Met	Leu	Phe	Val	Pro 25	Gly	Asn	Ile	Val	Asn 30	Val	Lys
Ala	Ala	Asn 35	Gly	Phe	Tyr	Val	Ser 40	Asp	Ser	Asn	Leu	Tyr 45	Asp	Ala	Asn
Gly	Asn 50	Gln	Phe	Val	Met	Arg 55	Gly	Val	Asn	His	Ala 60	His	Ser	Trp	Tyr
Lys 65	Asp	Thr	Tyr	Thr	Glu 70	Ala	Ile	Pro	Ala	Ile 75	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala 80
Asn	Thr	Ile	Arg	Ile 85	Val	Leu	Ser	Asp	Gly 90	Gly	Gln	Tyr	Gln	Lys 95	Asp
Asp	Ile	Asn 100	Ile	Val	Arg	Asn	Leu 105	Ile	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala 110	Asn	Asn
Leu	Val	Ala 115	Val	Leu	Glu	Val	His 120	Asp	Ala	Thr	Gly	Ser 125	Asp	Ser	Leu
Ser	Asp 130	Leu	Asn	Arg	Ala	Val 135	Asp	Tyr	Trp	Ile	Glu 140	Ile	Lys	Asp	Ala
Leu 145	Ile	Gly	Lys	Glu 150	Asp	Thr	Val	Ile	Ile	Asn 155	Ile	Val	Asn	Glu	Trp 160
Tyr	Gly	Thr	Trp	Asp 165	Gly	Arg	Leu	Trp	Ala 170	Asp	Gly	Tyr	Lys	Gln 175	Ala
Ile	Pro	Arg	Leu 180	Arg	Asp	Ala	Gly	Leu 185	Thr	His	Thr	Leu	Met 190	Ile	Asp
Ala	Ala	Gly 195	Trp	Gly	Gln	Phe	Pro 200	Ser	Ser	Ile	His	Gln 205	Tyr	Gly	Arg

ES 2 728 758 T3

Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	Ile	His
210						215					220				
Met	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Asp	Asp	Gln	Met	Val	Arg	Asp	Asn	Ile
225					230					235					240
Asn	Gly	Val	Ile	Asn	Gln	Asp	Leu	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	Glu	Phe	Gly
				245					250					255	
His	Tyr	His	Thr	Asp	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Tyr
			260					265					270		
Ala	Glu	Gln	Thr	Gly	Val	Gly	Trp	Leu	Ala	Trp	Ser	Trp	Lys	Gly	Asn
		275					280					285			
Gly	Thr	Glu	Trp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Asp	Trp	Gly	Gly	Asn
	290					295					300				
Tyr	Leu	Thr	Ser	Trp	Gly	Asp	Arg	Ile	Val	Asn	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu
305					310					315					320
Arg	Glu	Thr	Ser	Gln	Ile	Ala	Ser	Val	Phe	Ser	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly
				325					330					335	
Thr	Pro	Gly	Asn	Gly	Glu	Glu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	Val	Ser	His	Phe
			340					345					350		
Ala	Asn	Phe	Glu	Asn	Gly	Thr	Glu	Gly	Trp	Glu	Ala	Ser	Asn	Val	Ser
		355					360					365			
Gly	Gly	Pro	Trp	Ala	Thr	Asn	Glu	Trp	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala
	370					375					380				
Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Gln	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Glu	His	Tyr	Leu	Tyr
385					390					395					400
Arg	Ile	Gly	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Asn	Ala	Thr	Val
				405					410					415	
Arg	Gly	Ala	Asn	Trp	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ile	Asp	Val	Lys	Leu
			420					425					430		
Tyr	Val	Lys	Tyr	Gly	Asp	Gly	Trp	Thr	Trp	Arg	Asp	Ser	Gly	Val	Gln
		435					440					445			
Thr	Ile	Arg	Ala	Gly	Glu	Ser	Ile	Asp	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn
	450					455					460				

ES 2 728 758 T3

Val Asp Arg Ser Asn Ile Arg Glu Val Gly Ile Gln Phe Ile Gly Gly
465 470 475 480

Asn His Ser Ser Gly Lys Thr Ala Phe Tyr Val Asp His Val Tyr Ser
485 490 495

His

<210> 31
<211> 1767
<212> ADN
<213> *Paenibacillus polymyxa*

<400> 31

atgaaaaaac	tactgtcttg	tctcatttcg	ctgtcaatgc	ttgtgtatat	cttaccgaca	60
atgatagtgt	ccgctaacaa	tgatggcgta	acgaaccttg	ctcttgattc	aacacctagt	120
gcgcaaagtg	atattatttc	tgatgctgtc	tacaaaatca	cagctcagca	ttcaggaaaa	180
agccttgagg	ttgaaggcgg	ttctaaagat	gacggcgcg	atgttcaaca	atggacagat	240
aacgggaaag	aacagcagaa	atggagagtt	gtggacgtcg	gtggcggata	ttacaagctc	300
atcagtcaat	ctagcggaaa	agcactggat	gtggcaggtg	gtaatacaca	tgatggtgcc	360
aatgtgcaac	agtggacgga	caacggaaat	gctcagcaaa	agtggaagat	catcgatgta	420
ggaggaggct	attataagtt	gatctcacia	agctctggaa	aggcactcga	cgtcgttggt	480
ggttatacgc	acgacggggc	caatgtgcag	caatgggcag	acaatggatc	tgctcaacag	540
cgtcggcggt	tcacacaaat	tgatacaacc	acggatacga	cgccgccaac	agcaccaacg	600
aatttacaat	catcatcgaa	aacaagtacc	tctgtaacat	tgacttggac	cacaagcatt	660
gataatgtag	gtgtgacagg	ctatgtcatt	tataatggaa	cagatttggt	cgggacttct	720
acaactacat	cttatattgt	tacaggatta	acagcgaaca	cttcctataa	cttcactgtc	780
aaagcgaagg	atgccgctgg	gaatatttca	gaaccatcaa	atgtcttgaa	agtcacaacg	840
agttcagatt	cttctcaaaa	cacaggtttt	tatgtgaagg	gcacaacatt	atatgatgga	900
aacggtaatc	catttgtgat	gagaggaatc	aatcatgcat	acacatggta	taaagggcaa	960
gaatcagtag	caattcctgc	gattgcgaaa	acgggtgcaa	acaccatccg	gattgtctta	1020
tctgacggac	agcagtggac	aaaagatgat	ttaagcgcgc	ttcaaaattt	gattacactc	1080
agtgagcaaa	acaaacttgt	agtgatttta	gaggtgcacg	acggtactgg	caatgacaat	1140
gccgcagttt	taaataaaat	tgctgattat	tggattgaaa	tgaagtcagc	tttaattggg	1200
aaggaaaata	cagttatttt	aaacatcgca	aatgaatggg	ttggtacatg	ggatggaaac	1260
ggctgggcgc	agggtacaaa	atcagtcata	ccaaagctgc	gaaatgcggg	catcaaaaac	1320

ES 2 728 758 T3

acgattatgg tggatgcggc tggatgggga caatatccaa aatcgatttt tgattacgga	1380
acgcaagtgt tcgatgcaga tccgctcaag aatacgatgt tttccattca tatgtatgaa	1440
tacgcaggcg gcaacgcaga aacagtgaag agtaatatcg acaacgtcct gaataaaaat	1500
cttgactca tcattggaga atttggaatt aaacatacaa acggagatgt tgatgaagca	1560
acgatcatgt catacgcaca gcaaaaaggt gttgggtatc ttggctggtc atggaaagga	1620
aatggttcag gtcttgaata tttagatatg agtaacgatt gggctggcag cagttataca	1680
gagcaaggac atgccattat cgaaggacca aatggcattc gtgcaacatc aaaattatca	1740
accattttaca gcaatgggaa acaataa	1767

<210> 32
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> *Paenibacillus polymyxa*
 <400> 32

5

ES 2 728 758 T3

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

ES 2 728 758 T3

Gly Tyr Thr His Asp Gly Ala Asn Val Gln Gln Trp Ala Asp Asn Gly
 165 170 175
 Ser Ala Gln Gln Arg Trp Arg Phe Thr Gln Ile Asp Thr Thr Thr Asp
 180 185 190
 Thr Thr Pro Pro Thr Ala Pro Thr Asn Leu Gln Ser Ser Ser Lys Thr
 195 200 205
 Ser Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Thr Thr Ser Ile Asp Asn Val Gly
 210 215 220
 Val Thr Gly Tyr Val Ile Tyr Asn Gly Thr Asp Leu Val Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Thr Thr Thr Ser Tyr Ile Val Thr Gly Leu Thr Ala Asn Thr Ser Tyr
 245 250 255
 Asn Phe Thr Val Lys Ala Lys Asp Ala Ala Gly Asn Ile Ser Glu Pro
 260 265 270
 Ser Asn Val Leu Lys Val Thr Thr Ser Ser Asp Ser Ser Gln Asn Thr
 275 280 285
 Gly Phe Tyr Val Lys Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Gly Asn Gly Asn Pro
 290 295 300
 Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Ala Tyr Thr Trp Tyr Lys Gly Gln
 305 310 315 320
 Glu Ser Val Ala Ile Pro Ala Ile Ala Lys Thr Gly Ala Asn Thr Ile
 325 330 335
 Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gln Gln Trp Thr Lys Asp Asp Leu Ser
 340 345 350
 Ala Leu Gln Asn Leu Ile Thr Leu Ser Glu Gln Asn Lys Leu Val Val
 355 360 365
 Ile Leu Glu Val His Asp Gly Thr Gly Asn Asp Asn Ala Ala Val Leu
 370 375 380
 Asn Lys Ile Ala Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Ser Ala Leu Ile Gly
 385 390 395 400
 Lys Glu Asn Thr Val Ile Leu Asn Ile Ala Asn Glu Trp Phe Gly Thr

ES 2 728 758 T3

405								410					415				
Trp	Asp	Gly	Asn	Gly	Trp	Ala	Gln	Gly	Tyr	Lys	Ser	Val	Ile	Pro	Lys		
			420					425					430				
Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Ile	Lys	Asn	Thr	Ile	Met	Val	Asp	Ala	Ala	Gly		
		435					440					445					
Trp	Gly	Gln	Tyr	Pro	Lys	Ser	Ile	Phe	Asp	Tyr	Gly	Thr	Gln	Val	Phe		
	450					455					460						
Asp	Ala	Asp	Pro	Leu	Lys	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	Ile	His	Met	Tyr	Glu		
465					470					475					480		
Tyr	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala	Glu	Thr	Val	Lys	Ser	Asn	Ile	Asp	Asn	Val		
				485					490					495			
Leu	Asn	Lys	Asn	Leu	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Glu	Phe	Gly	Ile	Lys	His		
			500					505					510				
Thr	Asn	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Tyr	Ala	Gln	Gln		
		515					520					525					
Lys	Gly	Val	Gly	Tyr	Leu	Gly	Trp	Ser	Trp	Lys	Gly	Asn	Gly	Ser	Gly		
	530					535					540						
Leu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Ser	Asn	Asp	Trp	Ala	Gly	Ser	Ser	Tyr	Thr		
545					550					555					560		
Glu	Gln	Gly	His	Ala	Ile	Ile	Glu	Gly	Pro	Asn	Gly	Ile	Arg	Ala	Thr		
				565					570					575			
Ser	Lys	Leu	Ser	Thr	Ile	Tyr	Ser	Asn	Gly	Lys	Gln						
			580					585									

<210> 33
<211> 1470
<212> ADN
<213> *Bacillus hemicellulosilyticus*

<400> 33

ES 2 728 758 T3

```

atggatatat taagaaagtg tgtacttgta ctattggcct tactattggt gttacctacg      60
acatcaacgg cattttctga aagcgcttct actaatgaga gagtgcataa tttatctgat      120
ccgaatgcga cacgctatac gaaggaattg tttgcgtttc ttcaagacgt gagtggtagag      180
caagtgttgt tcgggcaaca gcatgcaaca gatgaagggt tgactctgac aggtgaagga      240
aatcgaattg gttcaactga gtcggagggt aagaatgcag taggtgatta tccagctggt      300

tttgggtggg atacgaacag cttggatggt cgtgaaaagc caggtacaga tgtggaaagt      360
caagagcaac gaattttaaa tacagcagaa tcgatgaaag tggcacatga attaggaggg      420
atcatcacat taagtatgca tccggataac tttgttaccg gtcattacta tggcgatacg      480
gatggtaacg tcgttcaaga aatattgcc a ggtggctcca agcacaatga atttaacgct      540
tggttagata atattgctgc cctagcacat gaattagttg atgataatgg agagcctatt      600
ccggttatct tccgtccatt ccatgagcaa acaggttcgt ggttttggtg ggggtgcgagc      660
acaacaactc ctgagcaata caaagcgatt tttcgatata cagtcgaata cttaagagat      720
gcaaagggtg ttcataactt tttatatgga ttctcccctg gtgcgggtcc tgctggcgat      780
ctagatcgat atttagaaac gtaccaggt gataattatg tcgatatctt aggtattgat      840
aattatgata gtaagtcaaa tgccgggtca gacgcttggg tatctggaat ggtaaaagat      900
ttagcgatga tctcgaaatt agcagaggaa agaggggaagg tatcagcctt tactgaattt      960
ggatacagcg ctgaagggat gagtcaaacg ggtgatgctg tagattggta tacacgtgtg      1020
ttaaagtcga taaaagcaga tgaagatgcg cgaaacatat cctacatgct aacgtgggct      1080
aactttgggt ggcctaataa tatatttggt ccgtatcgtg atgtgaatgg ggatttaggt      1140
ggagatcatg agttattacc tgactttgta cagttttatg aagatgaata ctcagcattt      1200
cgtgaagata taaatgaaag tgtttacaat cgtaatgaga gttatattgt tgcggatcat      1260
gagccattta tgtatgttgt tccccctacg acaggtacat atataacagg ctctgtctgt      1320
gtcttacgag cgaaagtagt taacgatgag gatccgtccg ttacgtatca agtggcgggt      1380
tctgaagaag tctatgagat gacttttagat gaaaatgggt attactctgc tgattatatt      1440
cctactgctc ctaagaatgg agctctgtag                                     1470

```

<210> 34
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> *Bacillus hemicellulosilyticus*
 <400> 34

ES 2 728 758 T3

Met Asp Ile Leu Arg Lys Cys Val Leu Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Pro Thr Thr Ser Thr Ala Phe Ser Glu Ser Ala Ser Thr Asn
20 25 30

Glu Arg Val Leu Asn Leu Ser Asp Pro Asn Ala Thr Arg Tyr Thr Lys
35 40 45

Glu Leu Phe Ala Phe Leu Gln Asp Val Ser Gly Glu Gln Val Leu Phe
50 55 60

ES 2 728 758 T3

Gly	Gln	Gln	His	Ala	Thr	Asp	Glu	Gly	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Glu	Gly	65	70	75	80
Asn	Arg	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Ser	Glu	Val	Lys	Asn	Ala	Val	Gly	Asp	85	90	95	
Tyr	Pro	Ala	Val	Phe	Gly	Trp	Asp	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	Gly	Arg	Glu	100	105	110	
Lys	Pro	Gly	Thr	Asp	Val	Glu	Ser	Gln	Glu	Gln	Arg	Ile	Leu	Asn	Thr	115	120	125	
Ala	Glu	Ser	Met	Lys	Val	Ala	His	Glu	Leu	Gly	Gly	Ile	Ile	Thr	Leu	130	135	140	
Ser	Met	His	Pro	Asp	Asn	Phe	Val	Thr	Gly	His	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Thr	145	150	155	160
Asp	Gly	Asn	Val	Val	Gln	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Lys	His	Asn	165	170	175	
Glu	Phe	Asn	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	His	Glu	Leu	180	185	190	
Val	Asp	Asp	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	Pro	Val	Ile	Phe	Arg	Pro	Phe	His	195	200	205	
Glu	Gln	Thr	Gly	Ser	Trp	Phe	Trp	Trp	Gly	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	210	215	220	
Glu	Gln	Tyr	Lys	Ala	Ile	Phe	Arg	Tyr	Thr	Val	Glu	Tyr	Leu	Arg	Asp	225	230	235	240
Ala	Lys	Gly	Val	His	Asn	Phe	Leu	Tyr	Gly	Phe	Ser	Pro	Gly	Ala	Gly	245	250	255	
Pro	Ala	Gly	Asp	Leu	Asp	Arg	Tyr	Leu	Glu	Thr	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asn	260	265	270	
Tyr	Val	Asp	Ile	Leu	Gly	Ile	Asp	Asn	Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Ala	275	280	285	
Gly	Ser	Asp	Ala	Trp	Leu	Ser	Gly	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Met	Ile	290	295	300	
Ser	Lys	Leu	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Lys	Val	Ser	Ala	Phe	Thr	Glu	Phe	305	310	315	320

ES 2 728 758 T3

Gly Tyr Ser Ala Glu Gly Met Ser Gln Thr Gly Asp Ala Leu Asp Trp
 325 330 335
 Tyr Thr Arg Val Leu Asn Ala Ile Lys Ala Asp Glu Asp Ala Arg Asn
 340 345 350
 Ile Ser Tyr Met Leu Thr Trp Ala Asn Phe Gly Trp Pro Asn Asn Ile
 355 360 365
 Phe Val Pro Tyr Arg Asp Val Asn Gly Asp Leu Gly Gly Asp His Glu
 370 375 380
 Leu Leu Pro Asp Phe Val Gln Phe Tyr Glu Asp Glu Tyr Ser Ala Phe
 385 390 395 400
 Arg Glu Asp Ile Asn Glu Ser Val Tyr Asn Arg Asn Glu Ser Tyr Ile
 405 410 415
 Val Ala Asp His Glu Pro Phe Met Tyr Val Val Ser Pro Thr Thr Gly
 420 425 430
 Thr Tyr Ile Thr Gly Ser Ser Val Val Leu Arg Ala Lys Val Val Asn
 435 440 445
 Asp Glu Asp Pro Ser Val Thr Tyr Gln Val Ala Gly Ser Glu Glu Val
 450 455 460
 Tyr Glu Met Thr Leu Asp Glu Asn Gly Tyr Tyr Ser Ala Asp Tyr Ile
 465 470 475 480
 Pro Thr Ala Pro Lys Asn Gly Ala Leu
 485

<210> 35
 <211> 1110
 <212> ADN
 <213> *Bacillus alcalophilus*
 <400> 35

ES 2 728 758 T3

atgagaagta tgaagctttt atttgctatg tttattttag ttttttcctc ttttactttt	60
aacttagtag ttgcgcaagc tagtggacat ggacaaatgc ataaagtacc ttgggcaccc	120
caagctgaag cacctggaaa aacggctgag aatggagtct gggataaagt tagaaataat	180
cctggaaaag ccaatcctcc agcaggaaaa gtcaatggtt tttatataga tggacaacc	240
ttatatgatg caaatggtaa gccatttggt atgcgcggaa ttaaccacgc tcattcctgg	300
tacaagcctc acatagaaac cgcgatggag gcaattgctg atactggagc aaactccatt	360
cgtgtagttc tctcagatgg acaacagtgg accaaagatg atgttgacga agtagcaaaa	420
attatatctt tagcagaaaa acattcttta gttgctgttc ttgaggtaca tgatgcactc	480
ggaacagatg atattgaacc attacttaaa acagtcgatt actggattga gatcaaagat	540
gctttaatcg gaaaagagga caaagtaatt attaacattt ctaatgaatg gtttggttct	600
tggagcagtg aaggttgggc agaaggatat aaaaaagcaa ttcctttact aagagaggcg	660
ggtctaaaac atacacttat ggttgacgca gctgggtggg gacaatttcc tagatctatt	720
catgaaaaag gattagacgt ttttaactca gaccattaa agaatacaat gttttccatt	780
catatgtatg aatgggcagc gggtaatcct caacaagtaa aagacaatat tgacggtgtt	840
cttgaaaaga atttagctgt agtaattggt gagttcggtc atcatcacta cggaagagat	900
gttgctgttg atacgatctt aagtcattca gagaagtatg atgtaggttg gcttgcctgg	960
tcttggcacg gaaatagtgg tgggtgtagag tatcttgact tagcaacaga tttttcaggg	1020
acgcaactaa ctgaatgggg agaaagaatt gtgtacggtc cgaatggttt aaaagaaact	1080
tctgaaatcg ttagtgtata caaaaaataa	1110

<210> 36
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> *Bacillus alcalophilus*

 <400> 36

ES 2 728 758 T3

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

ES 2 728 758 T3

Ala Asp Thr Gly Ala Asn Ser Ile Arg Val Val Leu Ser Asp Gly Gln
115 120 125

Gln Trp Thr Lys Asp Asp Val Asp Glu Val Ala Lys Ile Ile Ser Leu
130 135 140

Ala Glu Lys His Ser Leu Val Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Leu
145 150 155 160

Gly Thr Asp Asp Ile Glu Pro Leu Leu Lys Thr Val Asp Tyr Trp Ile
165 170 175

Glu Ile Lys Asp Ala Leu Ile Gly Lys Glu Asp Lys Val Ile Ile Asn
180 185 190

Ile Ser Asn Glu Trp Phe Gly Ser Trp Ser Ser Glu Gly Trp Ala Glu
195 200 205

Gly Tyr Lys Lys Ala Ile Pro Leu Leu Arg Glu Ala Gly Leu Lys His
210 215 220

Thr Leu Met Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Arg Ser Ile
225 230 235 240

His Glu Lys Gly Leu Asp Val Phe Asn Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr
245 250 255

Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Trp Ala Ala Gly Asn Pro Gln Gln
260 265 270

Val Lys Asp Asn Ile Asp Gly Val Leu Glu Lys Asn Leu Ala Val Val
275 280 285

Ile Gly Glu Phe Gly His His His Tyr Gly Arg Asp Val Ala Val Asp
290 295 300

Thr Ile Leu Ser His Ser Glu Lys Tyr Asp Val Gly Trp Leu Ala Trp
305 310 315 320

Ser Trp His Gly Asn Ser Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Thr
325 330 335

Asp Phe Ser Gly Thr Gln Leu Thr Glu Trp Gly Glu Arg Ile Val Tyr
340 345 350

Gly Pro Asn Gly Leu Lys Glu Thr Ser Glu Ile Val Ser Val Tyr Lys
355 360 365

Lys

5

<210> 37
<211> 1482
<212> ADN
<213> *Bacillus* sp.
<400> 37

atgaaaaaaa agttatcaca gatttatcat ttaattat	60
tttgcacacttat aataagtgtg	
ggaataatgg ggattacaac gtcccatca gaagcaagtt	120
caggctttta tgttgatggc	
aatacgttat atgacgcaaa cgggcaacca tttgtcatga	180
aaggcattaa ccatggacat	
gcttgggtata aagacaccgc ttcaacagct attcctgcca	240
ttgcagagca aggcgcgaac	
acgatacgta ttgttttatc agatggcggg caatgggaaa	300
aagacgacat tgacaccgtt	
cgtgaagtta ttgagcttgc ggagcaaaat aaaatgggtg	360
ctgtcgttga agttcatgat	
gccacggggc gtgattcacg cagtgattha gatcgggcag	420
tcgattattg gatagagatg	
aaagatgcac ttatcggcaa agaggatact gtcattatta	480
acattgcaaa cgaatgggat	
ggcagttggg atggcgccgc ttgggctgat ggctacattg	540
atgtcattcc gaagcttcgc	
gatgccggct taacacacac cttaatggtt gatgcagcag	600
gatgggggca atatccgcaa	
tctattcatg attacggaca agatgtgttt aatgcagatc	660
cgttaaaaaa tacgatattc	
tccatccata tgtatgagta tgctggtggt gatgctaaca	720
ctgtagatc aaatattgat	
agagtcatag atcaagacct tgctctcgta ataggtgagt	780
tcggtcatag acacactgat	
ggcgatgttg atgaagatac aatccttagt tattctgaag	840
aaactggcac aggatggctc	
gcttggctctt ggaaaggcaa cagtgccgaa tgggattatt	900
tagaccttc agaagattgg	
gctggtaacc atttaactga ttggggaaat aggattgtcc	960
acggggcaaa tggcttgacg	
gaaacctcca aaccatccac cgtatttaca gatgataacg	1020
gtggtgcccc tgaaccgcca	
actactacta ccttgatga ctttgaagga agcacacaag	1080
ggtggcatgg aagcaacgtg	
atgggtggcc cttggtccgt aacagaatgg ggtgcgtcag	1140
gcaactactc tttaaagggc	
gatgtcaatt taagctcaaa ttcttcacat gaactgtata	1200
gtgaacaaag tcgtaatcta	
cacggatact ctcagctaaa tgcaaccgtt cgccatgcca	1260
attggggaaa tcccggtaat	
ggcatgaatg caagacttta cgtgaaaacg ggctctgatt	1320
atacatggta tagcggctct	
tttacacgta tcaatagctc caactcagggt acaacgttat	1380
cttttgattt aaacaacatc	
gaaaatagtc atcatgttag ggaaataggt gtgcaatttt	1440
cagctgcaga taatagcagc	
ggtcaaacgt ctctatacgt tgataatggt actttaagat	1482
aa	

10

<210> 38
<211> 493
<212> PRT

ES 2 728 758 T3

<213> *Bacillus* sp.

<400> 38

```

Met Lys Lys Lys Leu Ser Gln Ile Tyr His Leu Ile Ile Cys Thr Leu
1      5      10      15

Ile Ile Ser Val Gly Ile Met Gly Ile Thr Thr Ser Pro Ser Glu Ala
20      25      30

Ser Ser Gly Phe Tyr Val Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly
35      40      45

Gln Pro Phe Val Met Lys Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr Lys
50      55      60

Asp Thr Ala Ser Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Gln Gly Ala Asn
65      70      75      80

Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Glu Lys Asp Asp
85      90      95

Ile Asp Thr Val Arg Glu Val Ile Glu Leu Ala Glu Gln Asn Lys Met
100     105     110

Val Ala Val Val Glu Val His Asp Ala Thr Gly Arg Asp Ser Arg Ser
115     120     125

Asp Leu Asp Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Ala Leu
130     135     140

Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr
145     150     155     160

Gly Ser Trp Asp Gly Ala Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Val Ile
165     170     175

Pro Lys Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala
180     185     190

Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Asp
195     200     205

Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ile His Met
210     215     220

Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Ser Asn Ile Asp

```

ES 2 728 758 T3

225		230		235		240
Arg Val Ile Asp	Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His					
	245		250			255
Arg His Thr Asp	Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr Ser					
	260		265			270
Glu Glu Thr Gly	Thr Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser					
	275		280			285
Ala Glu Trp Asp	Tyr Leu Asp Leu Ser Glu Asp Trp Ala Gly Asn His					
	290		295			300
Leu Thr Asp Trp	Gly Asn Arg Ile Val His Gly Ala Asn Gly Leu Gln					
	305		310			315
Glu Thr Ser Lys	Pro Ser Thr Val Phe Thr Asp Asp Asn Gly Gly Ala					
	325		330			335
Pro Glu Pro Pro	Thr Thr Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Thr					
	340		345			350
Gln Gly Trp His	Gly Ser Asn Val Met Gly Gly Pro Trp Ser Val Thr					
	355		360			365
Glu Trp Gly Ala	Ser Gly Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Asp Val Asn Leu					
	370		375			380
Ser Ser Asn Ser	Ser His Glu Leu Tyr Ser Glu Gln Ser Arg Asn Leu					
	385		390			395
His Gly Tyr Ser	Gln Leu Asn Ala Thr Val Arg His Ala Asn Trp Gly					
	405		410			415
Asn Pro Gly Asn	Gly Met Asn Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser					
	420		425			430
Asp Tyr Thr Trp	Tyr Ser Gly Pro Phe Thr Arg Ile Asn Ser Ser Asn					
	435		440			445
Ser Gly Thr Thr	Leu Ser Phe Asp Leu Asn Asn Ile Glu Asn Ser His					
	450		455			460
His Val Arg Glu	Ile Gly Val Gln Phe Ser Ala Ala Asp Asn Ser Ser					
	465		470			475
						480

ES 2 728 758 T3

Gly Gln Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr Leu Arg
485 490

5 <210> 39
<211> 1551
<212> ADN
<213> *Bacillus circulans*

10 <400> 39

```

atgggggtggt ttttagtgat tttagcgaag tgggtgattg cttttgtcgc atttttactg      60
atgttctcgt ggactggaca acttacgaac aaagcacatg ctgcaagcgg attttatgta      120
agcggtagca aattattgga tgctacagga caaccatttg tgatgcgagg agtcaatcat      180
gcgcacacat ggtataaaga tcaactatcc accgcaatac cagccattgc taaaacaggt      240
gccaacacga tacgtattgt actggcgaat ggacacaaat ggacgcttga tgatgtaaac      300
accgtcaaca atattctcac cctctgtgaa caaaacaaac taattgccgt tttggaagta      360
catgacgcta caggaagcga tagtctttcc gatttagaca acgccgttaa ttactggatt      420
ggtattaaaa gcgcgttgat cggcaaggaa gaccgtgtaa tcattaatat agctaacgag      480
tggtacggaa catgggatgg agtcgcctgg gctaattggt ataagcaagc catacccaaa      540
ctgcgtaatg ctggtctaac tcatacgtg attgttgact ccgctggatg gggacaatat      600
ccagattcgg tcaaaaatta tgggacagaa gtactgaatg cagaccggtt aaaaaacaca      660
gtattctcta tccatatgta tgaatatgct gggggcaatg caagtaccgt caaatccaat      720
attgacggtg tgctgaacaa gaatcttgca ctgattatcg gcgaatttgg tggacaacat      780
acaaacggtg atgtggatga agccaccatt atgagttatt cccaagagaa gggagtcggc      840
tgggttggtt ggtcctggaa gggaaatagc agtgatttgg cttatctcga tatgacaaat      900
gattgggctg gtaactccct cacctcgttc ggtaataccg tagtgaatgg cagtaacggc      960
attaaagcaa cttctgtgtt atccggcatt tttggagggt ttacgccaac ctcaagccct     1020
acttctacac ctacatctac gccaacctca actcctactc ctacgccaag tccgaccccg     1080
agtccaggta ataacgggac gatcttatat gatttcgaaa caggaactca aggctggtcg     1140
ggaaacaata tttcgggagg cccatgggtc accaatgaat ggaaagcaac gggagcgcaa     1200
actctcaaag ccgatgtctc cttacaatcc aattccacgc atagtctata tataacctct     1260
aatcaaaatc tgtctggaaa aagcagtctg aaagcaacgg ttaagcatgc gaactggggc     1320
aatatcggca acgggattta tgcaaaacta tacgtaaaga ccgggtccgg gtggacatgg     1380
tacgattccg gagagaatct gattcagtca aacgacggta ccattttgac actatccctc     1440
agcggcattt cgaatttgtc ctcagtcaaa gaaattgggg tagaattccg cgcctcctca     1500
aacagtagtg gccaatcagc tatttatgta gatagtgtta gtctgcaata a              1551

```

<210> 40

ES 2 728 758 T3

<211> 516
 <212> PRT
 <213> *Bacillus circulans*

5 <400> 40

Met	Gly	Trp	Phe	Leu	Val	Ile	Leu	Arg	Lys	Trp	Leu	Ile	Ala	Phe	Val	1	5	10	15
Ala	Phe	Leu	Leu	Met	Phe	Ser	Trp	Thr	Gly	Gln	Leu	Thr	Asn	Lys	Ala	20	25	30	
His	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Tyr	Val	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Ala	35	40	45	
Thr	Gly	Gln	Pro	Phe	Val	Met	Arg	Gly	Val	Asn	His	Ala	His	Thr	Trp	50	55	60	
Tyr	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Thr	Ala	Ile	Pro	Ala	Ile	Ala	Lys	Thr	Gly	65	70	75	80
Ala	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Val	Leu	Ala	Asn	Gly	His	Lys	Trp	Thr	Leu	85	90	95	
Asp	Asp	Val	Asn	Thr	Val	Asn	Asn	Ile	Leu	Thr	Leu	Cys	Glu	Gln	Asn	100	105	110	
Lys	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Glu	Val	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Ser	Asp	Ser	115	120	125	
Leu	Ser	Asp	Leu	Asp	Asn	Ala	Val	Asn	Tyr	Trp	Ile	Gly	Ile	Lys	Ser	130	135	140	
Ala	Leu	Ile	Gly	Lys	Glu	Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Asn	Ile	Ala	Asn	Glu	145	150	155	160
Trp	Tyr	Gly	Thr	Trp	Asp	Gly	Val	Ala	Trp	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Gln	165	170	175	
Ala	Ile	Pro	Lys	Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	His	Thr	Leu	Ile	Val	180	185	190	
Asp	Ser	Ala	Gly	Trp	Gly	Gln	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Asn	Tyr	Gly	195	200	205	
Thr	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Lys	Asn	Thr	Val	Phe	Ser	Ile	210	215	220	

ES 2 728 758 T3

His 225	Met	Tyr	Glu	Tyr	Ala 230	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser 235	Thr	Val	Lys	Ser	Asn 240
Ile	Asp	Gly	Val	Leu 245	Asn	Lys	Asn	Leu	Ala 250	Leu	Ile	Ile	Gly	Glu	Phe 255
Gly	Gly	Gln	His	Thr	Asn	Gly	Asp	Val	Asp 265	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser 270
Tyr	Ser	Gln	Glu	Lys	Gly	Val	Gly 280	Trp	Leu	Ala	Trp	Ser 285	Trp	Lys	Gly
Asn 290	Ser	Ser	Asp	Leu	Ala	Tyr 295	Leu	Asp	Met	Thr	Asn	Asp	Trp	Ala	Gly 300
Asn 305	Ser	Leu	Thr	Ser	Phe 310	Gly	Asn	Thr	Val	Val 315	Asn	Gly	Ser	Asn	Gly 320
Ile	Lys	Ala	Thr	Ser 325	Val	Leu	Ser	Gly	Ile 330	Phe	Gly	Gly	Val	Thr	Pro 335
Thr	Ser	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro 340
Thr	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Gly	Asn	Asn	Gly	Thr	Ile 355
Leu 370	Tyr	Asp	Phe	Glu	Thr	Gly 375	Thr	Gln	Gly	Trp	Ser 380	Gly	Asn	Asn	Ile
Ser 385	Gly	Gly	Pro	Trp	Val 390	Thr	Asn	Glu	Trp	Lys 395	Ala	Thr	Gly	Ala	Gln 400
Thr	Leu	Lys	Ala	Asp 405	Val	Ser	Leu	Gln	Ser 410	Asn	Ser	Thr	His	Ser	Leu 415
Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Gln	Asn	Leu	Ser	Gly 425	Lys	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala 430
Thr	Val	Lys	His	Ala	Asn	Trp	Gly 440	Asn	Ile	Gly	Asn	Gly	Ile	Tyr	Ala 445
Lys 450	Leu	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly 455	Ser	Gly	Trp	Thr	Trp	Tyr	Asp	Ser	Gly 460
Glu 465	Asn	Leu	Ile	Gln	Ser	Asn	Asp	Gly	Thr	Ile 475	Leu	Thr	Leu	Ser	Leu 480

ES 2 728 758 T3

Ser Gly Ile Ser Asn Leu Ser Ser Val Lys Glu Ile Gly Val Glu Phe
485 490 495

Arg Ala Ser Ser Asn Ser Ser Gly Gln Ser Ala Ile Tyr Val Asp Ser
500 505 510

Val Ser Leu Gln
515

5 <210> 41
<211> 984
<212> ADN
<213> *Paenibacillus* sp.

10 <400> 41

atgagacaac	ttttagcaaa	aggtatttta	gctgcactgg	tcatgatggt	agcgatgtat	60
ggattgggga	atctctcttc	taaagcttcg	gctgcaacag	gtttttatgt	aagcgggtacc	120
actctatatg	attctactgg	taaacctttt	gtaatgcgcg	gtgtcaatca	ttcgcatacc	180
tggttcaaaa	atgatctaaa	tgcagccatc	cctgctattg	ccaaaacagg	tgcaaataca	240
gtacgtatcg	ttttatctaa	tggtgttcag	tatactagag	atgatgtaaa	ctcagtcaaa	300
aatattattt	ccctgggtta	ccaaaacaaa	atgattgctg	ttcttgaggt	gcatgatgct	360
accggtaaag	acgattacgc	ttctcttgat	gccgctgtaa	actactggat	cagcatcaaa	420
gatgccttga	ttggcaagga	agatcgagtc	attgttaata	ttgccaatga	atgggtacggt	480
acatggaatg	gcagtgcctg	ggcagatggg	tataagcagg	ctattcccaa	actaagaaat	540
gcaggcatca	aaaacacttt	aatcgttgat	gccgccggct	ggggacaatg	tcctcaatcg	600
atcggtgatt	acggggcaaag	tgtatttgca	gcagattcgc	ttaaaaatac	aattttctct	660
attcacatgt	atgaatatgc	aggcgggtaca	gatgcgatcg	tcaaaagcaa	tatggaaaat	720
gtactgaaca	aaggacttcc	tttgatcatc	ggtgaatttg	gcgggcagca	tacaaacggc	780
gatgtagatg	aacatgcaat	tatgcgttat	ggtcagcaaa	aagggtgtagg	ttggctggca	840
tggtcgtggg	atggcaacaa	tagtgaactc	agttatctgg	atgttggtac	aggtcccgcc	900
ggtagtctga	caagtatcgg	caatacgatt	gtaaatgatc	catatggtat	caaagctacc	960
tcgaaaaaag	cgggtatctt	ctaa				984

15 <210> 42
<211> 327
<212> PRT
<213> *Paenibacillus* sp.

<400> 42

ES 2 728 758 T3

Met	Arg	Gln	Leu	Leu	Ala	Lys	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Met	Met
1				5					10					15	

ES 2 728 758 T3

Leu Ala Met Tyr Gly Leu Gly Asn Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ala Ala
 20 25 30
 Thr Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ser Thr Gly Lys
 35 40 45
 Pro Phe Val Met Arg Gly Val Asn His Ser His Thr Trp Phe Lys Asn
 50 55 60
 Asp Leu Asn Ala Ala Ile Pro Ala Ile Ala Lys Thr Gly Ala Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Arg Ile Val Leu Ser Asn Gly Val Gln Tyr Thr Arg Asp Asp Val
 85 90 95
 Asn Ser Val Lys Asn Ile Ile Ser Leu Val Asn Gln Asn Lys Met Ile
 100 105 110
 Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Lys Asp Asp Tyr Ala Ser
 115 120 125
 Leu Asp Ala Ala Val Asn Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Asp Ala Leu Ile
 130 135 140
 Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Val Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly
 145 150 155 160
 Thr Trp Asn Gly Ser Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala Ile Pro
 165 170 175
 Lys Leu Arg Asn Ala Gly Ile Lys Asn Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala
 180 185 190
 Gly Trp Gly Gln Cys Pro Gln Ser Ile Val Asp Tyr Gly Gln Ser Val
 195 200 205
 Phe Ala Ala Asp Ser Leu Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ile His Met Tyr
 210 215 220
 Glu Tyr Ala Gly Gly Thr Asp Ala Ile Val Lys Ser Asn Met Glu Asn
 225 230 235 240
 Val Leu Asn Lys Gly Leu Pro Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gly Gln
 245 250 255
 His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu His Ala Ile Met Arg Tyr Gly Gln

ES 2 728 758 T3

260

265

270

Gln Lys Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Asn Ser
275 280 285

Glu Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Ala Thr Gly Pro Ala Gly Ser Leu Thr
290 295 300

Ser Ile Gly Asn Thr Ile Val Asn Asp Pro Tyr Gly Ile Lys Ala Thr
305 310 315 320

Ser Lys Lys Ala Gly Ile Phe
325

<210> 43
<211> 981
<212> ADN
<213> *Bacillus circulans*

<400> 43

atggccaagt tgcaaaaggg tacaatctta acagtcattg cagcactgat gtttgtcatt	60
ttggggagcg cggcgcccac agccgcagca gctacaggtt ttacgtgaa tggaggcaaa	120
ttgtacgatt ctacgggtaa accattttac atgaggggta tcaatcatgg gcaactcctgg	180
tttaaaaatg atttgaacac ggctatccct gcgatcgcaa aaacgggtgc caatacggta	240
cgaattgttt tatcaaacgg tacacaatac accaaggatg atctgaattc cgtaaaaaac	300
atcattaatg tcgtaaatgc aaacaagatg attgctgtgc ttgaagtaca cgatgccact	360
gggaaagatg acttcaactc gttggatgca gcggtcaact actggataag catcaaagaa	420
gcaactgatcg ggaaggaaga tcgggttatt gtaaacattg caaacgagtg gtacggaaca	480
tggaacggaa gcgcgtgggc tgacgggtac aaaaaagcta ttccgaaatt aagagatgcg	540
ggtattaaaa ataccttgat tgtagatgca gcaggctggg gtcagtaccc tcaatcgatc	600
gtcgattacg gacaaagcgt attcgccgcg gattcacaga aaaatacggc gttttccatt	660
cacatgtatg agtatgcagg caaggatgcg gccaccgtca aatccaatat ggaaaatgtg	720
ctgaataagg ggctggcctt aatcattggt gagttcggag gatatcacac caatggagat	780
gtcgatgaat atgcaatcat gaaatatggt ctggaaaaag gggtaggatg gcttgcattg	840
tcttggtacg gtaatagctc tggattaaac tatcttgatt tggcaacagg acctaacggc	900
agtttgacga gctatggtaa tacggttgtc aatgatactt acggaattaa aaatacgtcc	960
caaaaagcgg gaatctttta a	981

<210> 4
<211> 326

<212> PRT

<213> *Bacillus circulans*

<400> 44

5

ES 2 728 758 T3

Met	Ala	Lys	Leu	Gln	Lys	Gly	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Ile	Ala	Ala	Leu	1	5	10	15
Met	Phe	Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	20	25	30	
Gly	Phe	Tyr	Val	Asn	Gly	Gly	Lys	Leu	Tyr	Asp	Ser	Thr	Gly	Lys	Pro	35	40	45	
Phe	Tyr	Met	Arg	Gly	Ile	Asn	His	Gly	His	Ser	Trp	Phe	Lys	Asn	Asp	50	55	60	
Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Pro	Ala	Ile	Ala	Lys	Thr	Gly	Ala	Asn	Thr	Val	65	70	75	80
Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Asn	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Lys	Asp	Asp	Leu	Asn	85	90	95	
Ser	Val	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Val	Val	Asn	Ala	Asn	Lys	Met	Ile	Ala	100	105	110	
Val	Leu	Glu	Val	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Lys	Asp	Asp	Phe	Asn	Ser	Leu	115	120	125	
Asp	Ala	Ala	Val	Asn	Tyr	Trp	Ile	Ser	Ile	Lys	Glu	Ala	Leu	Ile	Gly	130	135	140	
Lys	Glu	Asp	Arg	Val	Ile	Val	Asn	Ile	Ala	Asn	Glu	Trp	Tyr	Gly	Thr	145	150	155	160
Trp	Asn	Gly	Ser	Ala	Trp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Lys	165	170	175	
Leu	Arg	Asp	Ala	Gly	Ile	Lys	Asn	Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Ala	Ala	Gly	180	185	190	
Trp	Gly	Gln	Tyr	Pro	Gln	Ser	Ile	Val	Asp	Tyr	Gly	Gln	Ser	Val	Phe	195	200	205	
Ala	Ala	Asp	Ser	Gln	Lys	Asn	Thr	Ala	Phe	Ser	Ile	His	Met	Tyr	Glu	210	215	220	
Tyr	Ala	Gly	Lys	Asp	Ala	Ala	Thr	Val	Lys	Ser	Asn	Met	Glu	Asn	Val	225	230	235	240

ES 2 728 758 T3

Leu Asn Lys Gly Leu Ala Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gly Tyr His
245 250 255

Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Tyr Ala Ile Met Lys Tyr Gly Leu Glu
260 265 270

Lys Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Ser Ser Gly
275 280 285

Leu Asn Tyr Leu Asp Leu Ala Thr Gly Pro Asn Gly Ser Leu Thr Ser
290 295 300

Tyr Gly Asn Thr Val Val Asn Asp Thr Tyr Gly Ile Lys Asn Thr Ser
305 310 315 320

Gln Lys Ala Gly Ile Phe
325

- 5 <210> 45
<211> 1110
<212> ADN
<213> *Bacillus nealsonii*
- 10 <400> 45

ES 2 728 758 T3

atggttgtga aaaaattatc aagttttatt ctaatttttac tgtagttac ttctgctttg	60
tttattactg attcaaaagc aagtgcgtgc tcgggatttt atgtaagcgg taccacttta	120
tatgatgcaa cgggtaaacc gtttactatg agagggtgtaa atcatgctca ttcttggttt	180
aaagaagatt cagcagctgc tattccagca atagcagcaa ctggagcaaa cacagtaaga	240
attgttttat ctgatggtgg acaatacacc aaagatgata ttaatactgt taaaagcctt	300
ttgtcattgg cagaaaaaat aaacttgcat tctggagtca tgacgcacag aaaagacgat	360
gtggaatctt taaatcgtgc agtcgattat tggatcagct taaaagacac attgataggc	420
aaagaagata aagtgataat aaacattgcg aatgaatggt atggtacttg ggatggtgcg	480
gcatgggcag ctggttataa acaagctatt ccaaagttac ggaatgcagg cttaaactcat	540
actctaataa ttgattctgc tggatgggga caatacccag cttccattca taattatgga	600
aaagaggat ttaatgcgga tccattgaaa aatacaatgt tctccataca tatgtatgag	660
tacgctggtg gggatgcagc aactgttaag tcaaattatg atggtgtctt aaaccaagga	720
ttagctttta taataggaga gtttggacaa aaacatacaa atggagatgt agatgaagca	780
accatcatga gttattcaca gcaaaaaaat atcggttggc ttgcatggtc ttggaaagga	840
aatagcacag attggagcta tctggattta agcaacgatt ggtctggtaa cagttaact	900
gattggggta atacggttgt taatggggca aatgggttaa aagccacttc aaaactaagc	960
ggagtattcg gtagctcagc aggaacaaat aatatattgt atgattttga aagcggtaat	1020
caaaactgga ctggatcaaa tatcgcggtt ggaccttga acgaattcaa gcttgatatc	1080
attcaggacg agcctcagac tccagcgtaa	1110

<210> 46
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> *Bacillus nealsonii*

<400> 46

ES 2 728 758 T3

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

ES 2 728 758 T3

195					200					205					
Leu	Lys	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	Ile	His	Met	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Gly
210						215					220				
Asp	Ala	Ala	Thr	Val	Lys	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Val	Leu	Asn	Gln	Gly
225					230					235					240
Leu	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Glu	Phe	Gly	Gln	Lys	His	Thr	Asn	Gly	Asp
				245					250					255	
Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Tyr	Ser	Gln	Gln	Lys	Asn	Ile	Gly
			260					265					270		
Trp	Leu	Ala	Trp	Ser	Trp	Lys	Gly	Asn	Ser	Thr	Asp	Trp	Ser	Tyr	Leu
	275						280					285			
Asp	Leu	Ser	Asn	Asp	Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Leu	Thr	Asp	Trp	Gly	Asn
290						295					300				
Thr	Val	Val	Asn	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	Lys	Leu	Ser
305					310					315					320
Gly	Val	Phe	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Ile	Leu	Tyr	Asp	Phe
				325					330					335	
Glu	Ser	Gly	Asn	Gln	Asn	Trp	Thr	Gly	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro
			340					345					350		
Trp	Asn	Glu	Phe	Lys	Leu	Asp	Ile	Ile	Gln	Asp	Glu	Pro	Gln	Thr	Pro
		355					360					365			

Ala

<210> 47
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> *Bacillus circulans*
 <400> 47

ES 2 728 758 T3

atgatgttga tatggatgca gggatggaag tctattctag tcgcatctt ggcgtgtgtg	60
tcagtaggcg gtgggcttcc tagtccagaa gcagccacag gattttatgt aaacgggtacc	120
aagctgtatg attcaacggg caaggccttt gtgatgaggg gtgtaaatca tccccacacc	180
tgggtacaaga atgatctgaa cgcggctatt ccggctatcg cgcaaacggg agccaatacc	240
gtacgagtcg tcttgctgaa cgggtcgaa tggaccaagg atgacctgaa ctccgtcaac	300
agtatcatct cgctgggtgc gcagcatcaa atgatagccg ttctggaggt gcatgatgcg	360
acaggcaaag atgagtatgc ttcccttgaa gcggccgtcg actattggat cagcatcaaa	420
ggggcattga tcggaaaaga agaccgcgtc atcgtcaata ttgctaata atggtatgga	480
aattggaaca gcagcggatg ggccgatggg tataagcagg ccattcccaa attaagaaac	540
gcgggcatta agaatacgtt gatcgttgat gcagcgggat gggggcaata cccgcaatcc	600
atcgtggatg agggggccgc ggtatttgct tccgatcaac tgaagaatac ggtattctcc	660
atccatatgt atgagtatgc cggtaaggat gccgctacgg tgaaaacgaa tatggacgat	720
gttttaaaaca aaggattgcc tttaatcatt ggggagttcg gcggctatca tcaagtgcc	780
gatgtcgatg agattgctat tatgaagtac ggacagcaga aggaagtggg ctggctggct	840
tggtcctggt acggaaacag cccggagctg aacgatttgg atctggctgc agggccaagc	900
ggaaacctga cgggctgggg aaacacggtg gttcatggaa ccgacgggat tcagcaaacc	960
tccaagaaag cgggcattta ttaa	984

<210> 48
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Bacillus circulans*
 <400> 48

ES 2 728 758 T3

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

ES 2 728 758 T3

Leu Glu Ala Ala Val Asp Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Gly Ala Leu Ile
 130 135 140

Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Val Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly
 145 150 155 160

Asn Trp Asn Ser Ser Gly Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala Ile Pro
 165 170 175

Lys Leu Arg Asn Ala Gly Ile Lys Asn Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala
 180 185 190

Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile Val Asp Glu Gly Ala Ala Val
 195 200 205

Phe Ala Ser Asp Gln Leu Lys Asn Thr Val Phe Ser Ile His Met Tyr
 210 215 220

Glu Tyr Ala Gly Lys Asp Ala Ala Thr Val Lys Thr Asn Met Asp Asp
 225 230 235 240

Val Leu Asn Lys Gly Leu Pro Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gly Tyr
 245 250 255

His Gln Gly Ala Asp Val Asp Glu Ile Ala Ile Met Lys Tyr Gly Gln
 260 265 270

Gln Lys Glu Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Ser Pro
 275 280 285

Glu Leu Asn Asp Leu Asp Leu Ala Ala Gly Pro Ser Gly Asn Leu Thr
 290 295 300

Gly Trp Gly Asn Thr Val Val His Gly Thr Asp Gly Ile Gln Gln Thr
 305 310 315 320

Ser Lys Lys Ala Gly Ile Tyr
 325

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de detergente que comprende al menos una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 74 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en el que la al menos una enzima tiene actividad degradativa de manano.
- 10 2. La composición de detergente de la reivindicación 1, en la que la al menos una enzima tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
- 15 3. La composición de detergente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, comprendiendo la composición además una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, xantanasa, lacasa y/o peroxidasa.
- 20 4. La composición de detergente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición está en forma de una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido regular, compacto o concentrado.
- 25 5. La composición detergente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición de detergente es una composición de detergente de lavandería, preferentemente una composición de detergente de lavandería líquida o sólida.
- 30 6. Uso de una composición de detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para degradar manano.
- 35 7. Uso de una composición de detergente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un proceso de lavandería.
8. Un método para eliminar una mancha de una superficie, que comprende poner en contacto la superficie con una composición de detergente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Un método para degradar manano que comprende aplicar al manano una composición de detergente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, preferentemente, el manano está en la superficie de un textil.

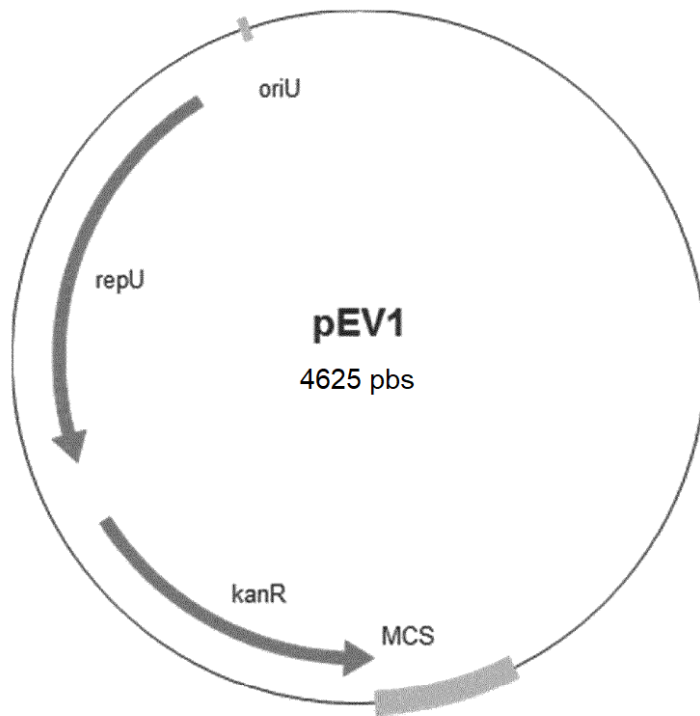


Fig.1

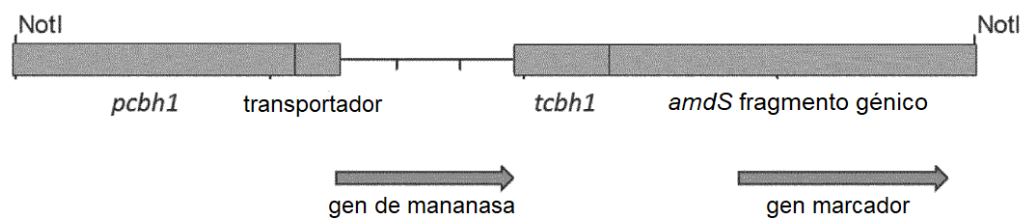


Fig. 2

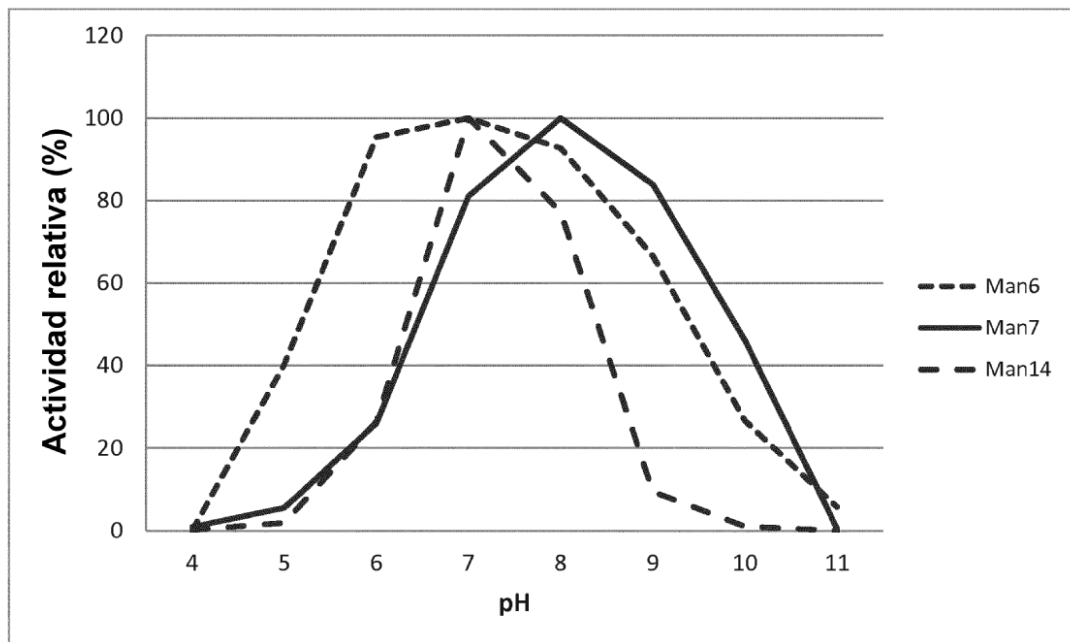


Fig. 3

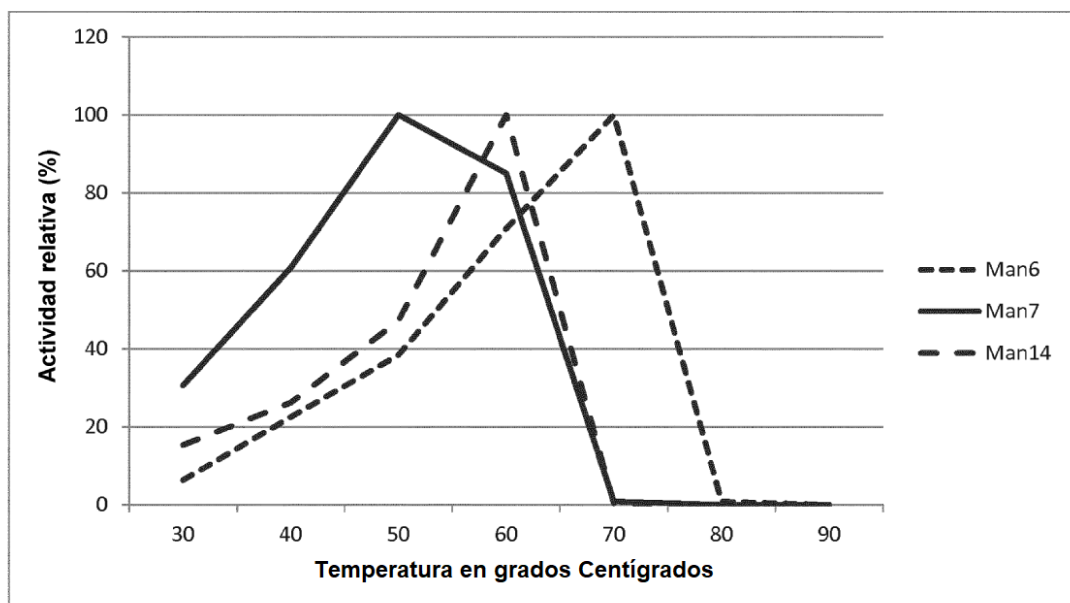


Fig. 4

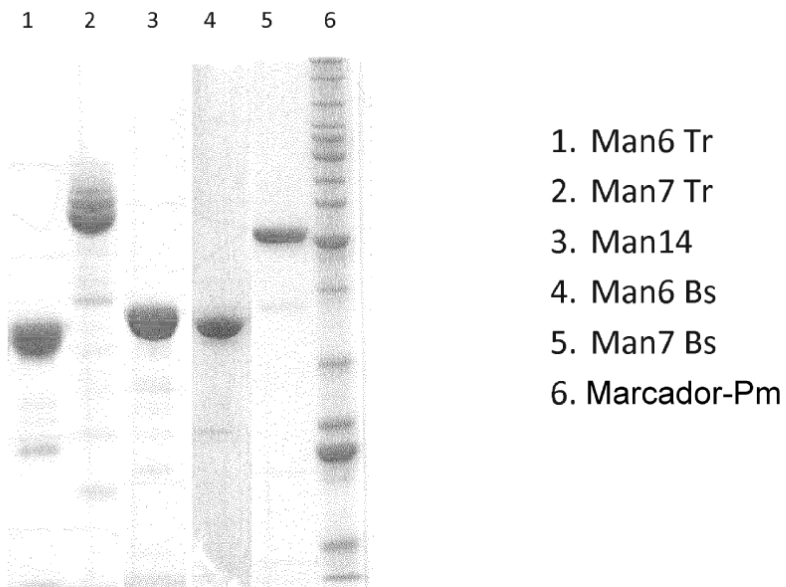


Fig. 5

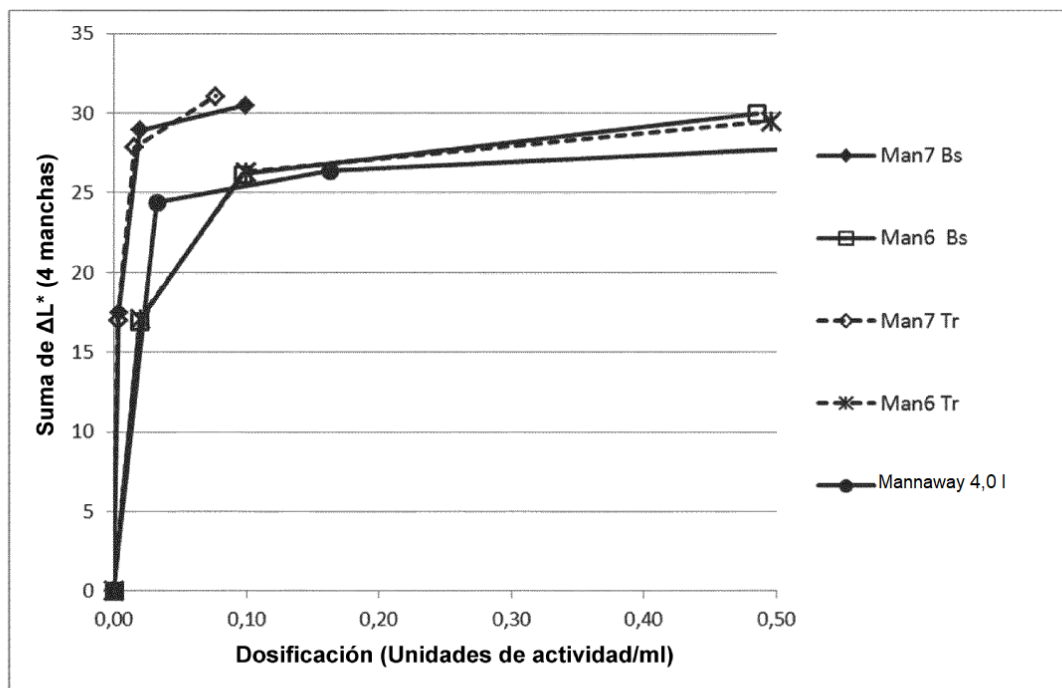


Fig 6.

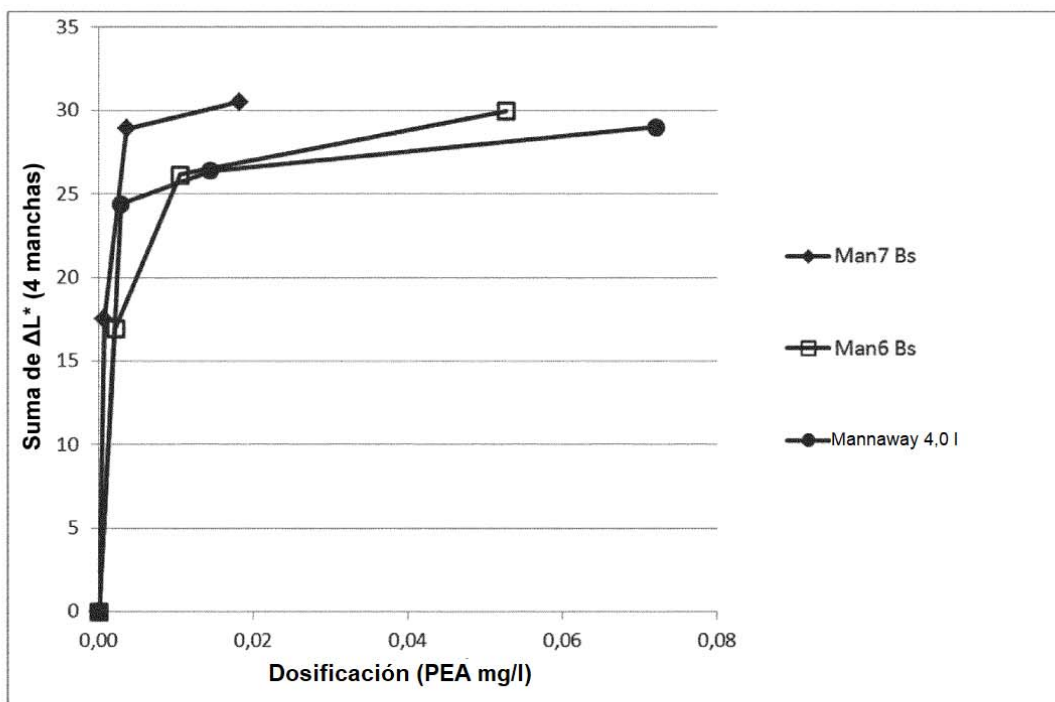


Fig 7.

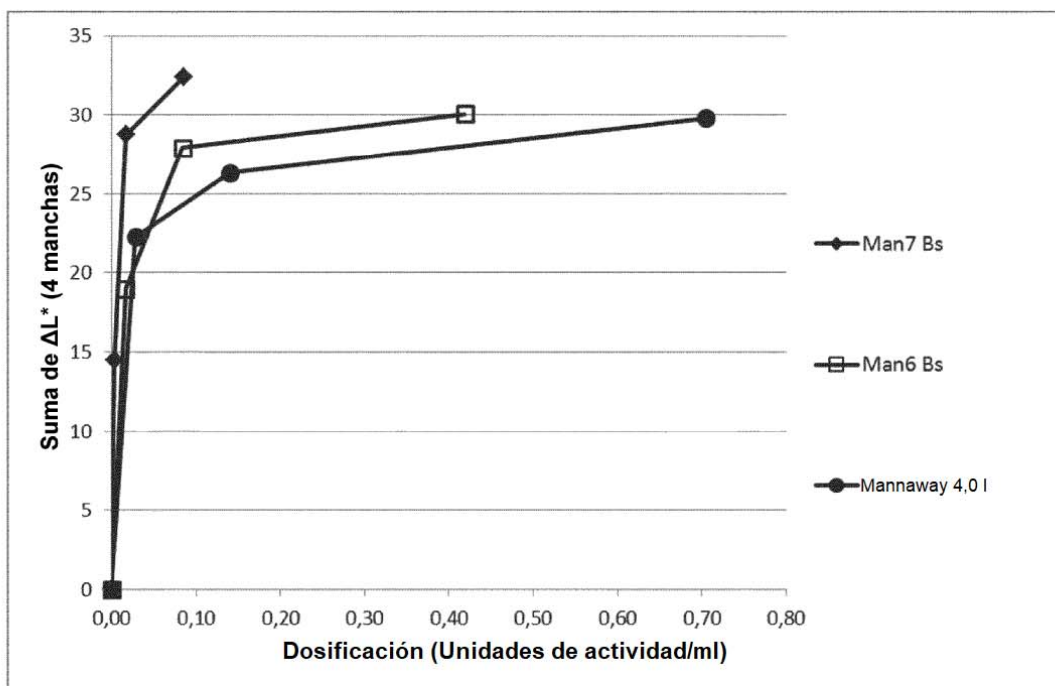


Fig 8.

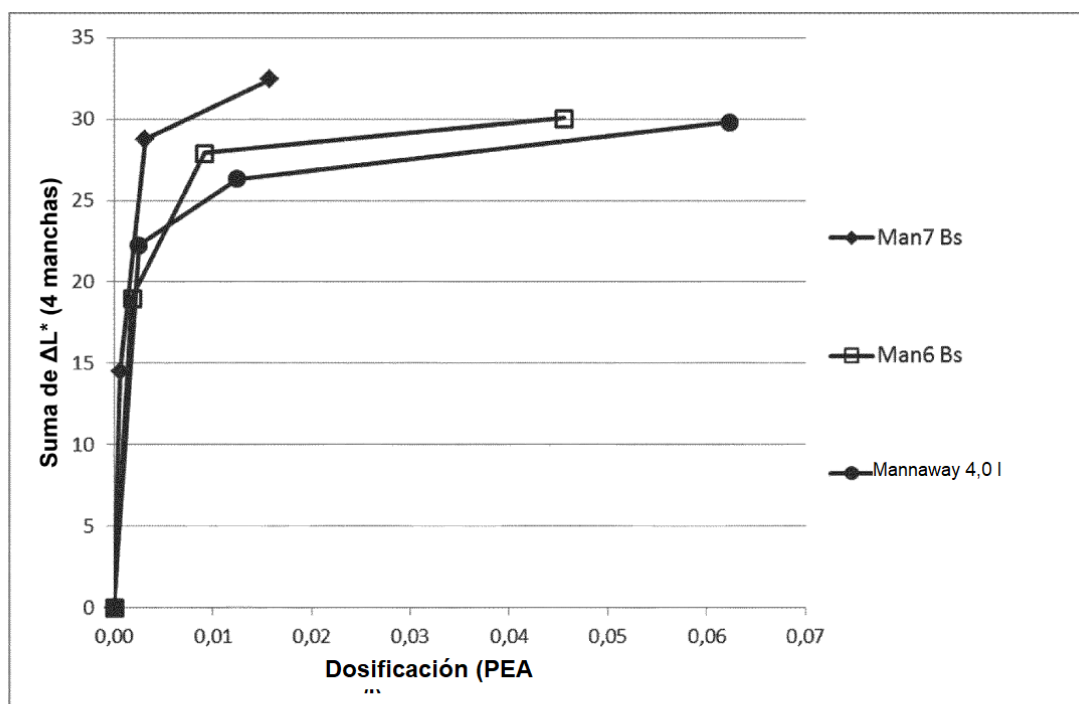


Fig 9.

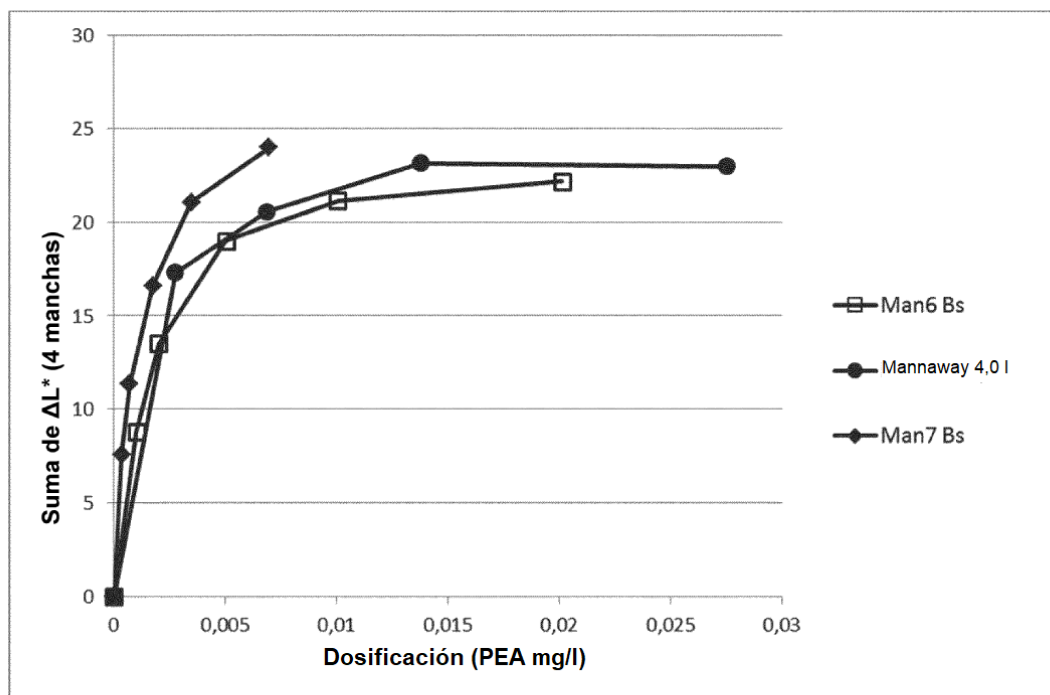


Fig 10 .

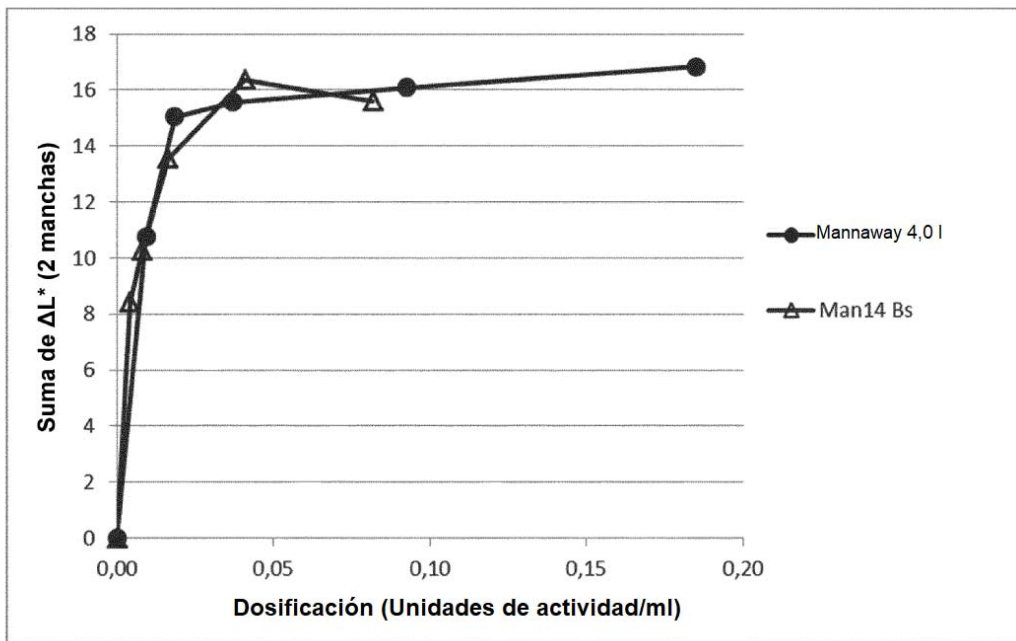


Fig. 11

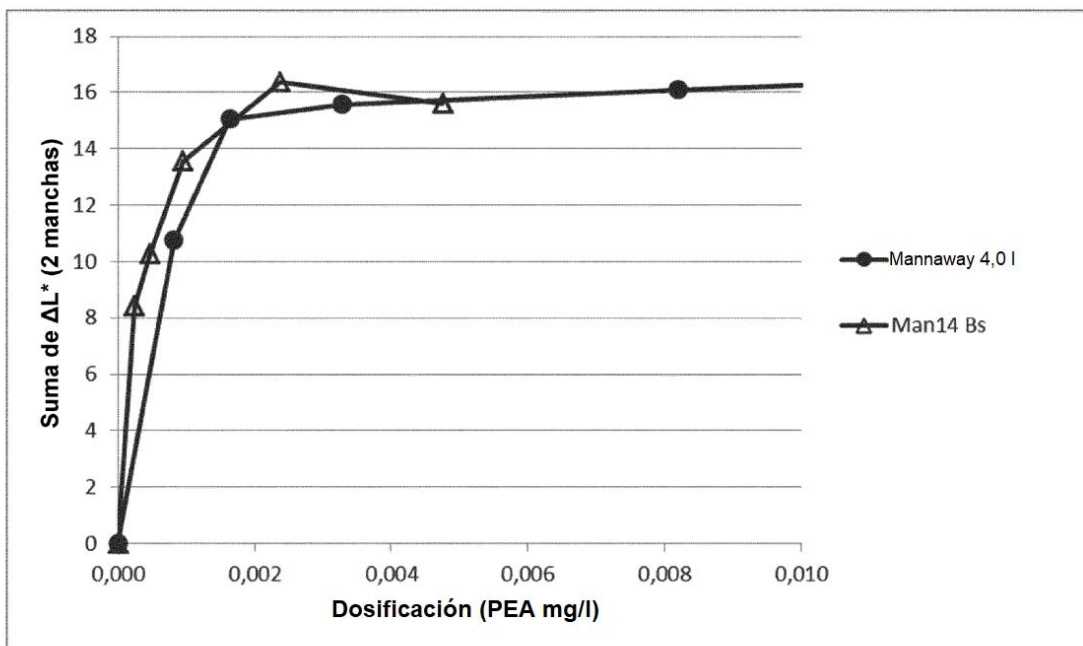


Fig. 12

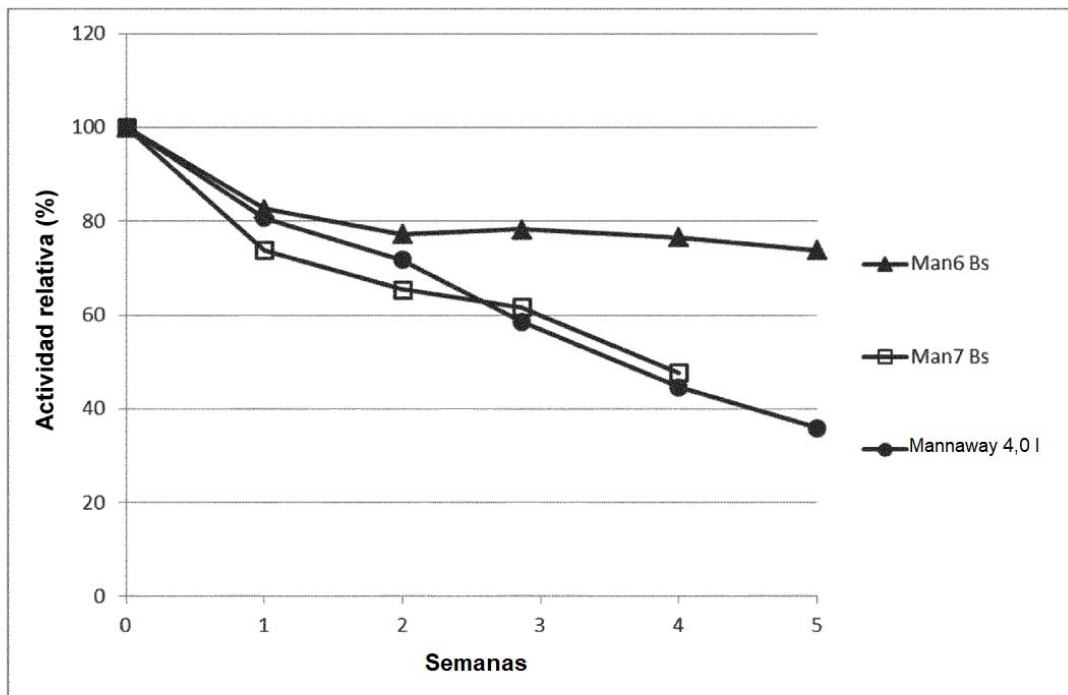


Fig. 13

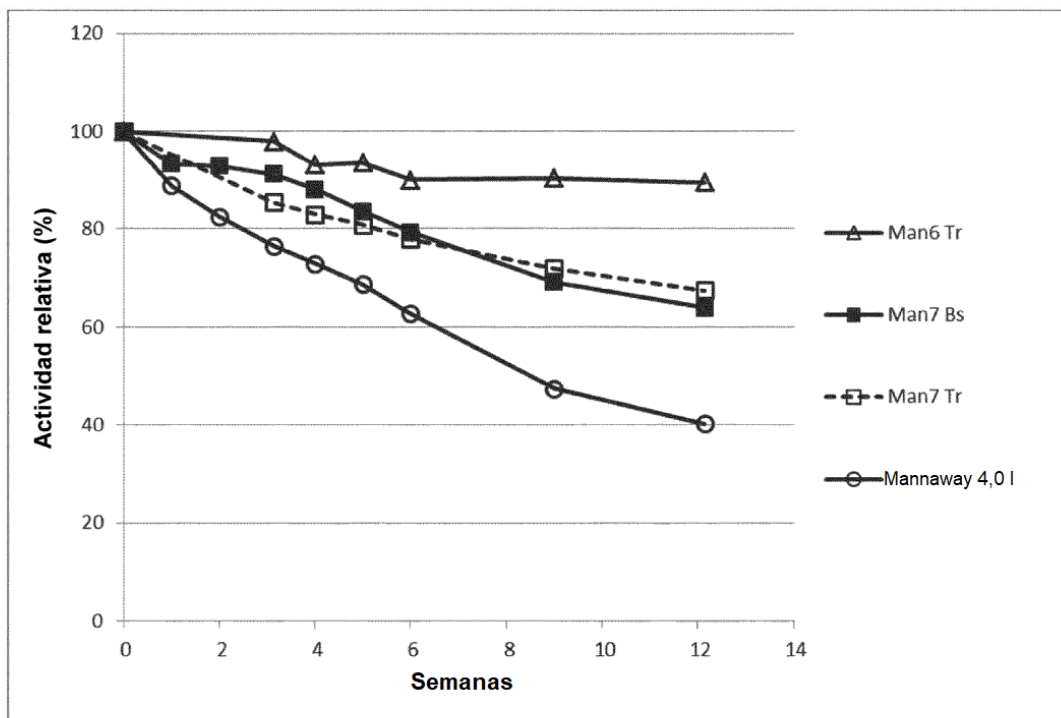


Fig. 14