(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110709498 B
(45)授权公告日 2022.01.14

(21)申请号 201880019983.X
(22)申请日 2018.03.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110709498 A
(43)申请公布日 2020.01.17
(30)优先权数据
17164901.5 2017.04.05 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/055007 2018.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/184767 EN 2018.10.11
(73)专利权人 AB酶股份有限公司
地址 德国达姆施塔特
(72)发明人 丹妮拉·赫布斯特 苏珊娜·威兰尼娜·穆斯曼 泰雅·雷诺宁 利纳·瓦塔卡里 迈克尔·拉辛格 卡里·朱图宁 丹妮拉·多拉克 帕特里克·洛伦兹 贾里·韦曼帕拉 彭蒂·奥贾帕洛 特瑞·普兰 克里斯蒂纳·贾维南
(74)专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理有限公司 11758
代理人 张颖 王朋飞
(51)Int.Cl.
C11D 3/386(2006.01)
审查员 陈伊诺

权利要求书1页 说明书33页
序列表40页 附图10页

(54)发明名称

包含细菌甘露聚糖酶的洗涤剂组合物

(57)摘要

本发明涉及包含细菌甘露聚糖酶的新的洗涤剂组合物。包含细菌甘露聚糖酶的洗涤剂组合物可用于希望甘露聚糖降解或改性的洗衣和清洁应用中。本发明还涉及所述洗涤剂组合物在洗衣和清洁应用中的用途以及降解甘露聚糖的方法。

CN 110709498 B

1.洗涤剂组合物,其包含至少一种酶,所述酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

2.根据权利要求1所述的洗涤剂组合物,其中所述至少一种酶具有甘露聚糖降解活性。

3.根据权利要求1所述的洗涤剂组合物,所述组合物还包含一种或多种其他酶,所述其他酶选自蛋白酶、脂肪酶、角质酶、糖酶、果胶酸裂解酶、氧化酶、黄原胶酶、漆酶和/或过氧化物酶。

4.根据权利要求3所述的洗涤剂组合物,其中所述糖酶选自淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶和/或木聚糖酶。

5.根据权利要求1所述的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物是棒剂、均质片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个隔室的小袋剂、颗粒剂、糊剂、凝胶剂或者常规、致密或浓缩液体剂的形式。

6.根据权利要求5所述的洗涤剂组合物,其中所述颗粒剂为常规或致密粉末剂。

7.根据权利要求1所述的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物是衣物洗涤剂组合物。

8.根据权利要求7所述的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物为液体或固体衣物洗涤剂组合物。

9.权利要求1-8中任一项所述的洗涤剂组合物在降解甘露聚糖中的应用。

10.权利要求1-8中任一项所述的洗涤剂组合物在洗衣过程中的应用。

11.一种从表面去除污渍的方法,所述方法包括使所述表面与权利要求1-8中任一项所述的洗涤剂组合物相接触。

12.一种降解甘露聚糖的方法,所述方法包括将权利要求1-8中任一项所述的洗涤剂组合物应用于甘露聚糖。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述甘露聚糖在纺织品的表面上。

包含细菌甘露聚糖酶的洗涤剂组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含细菌甘露聚糖酶的新的洗涤剂组合物。所述包含细菌甘露聚糖酶的洗涤剂组合物可用于希望甘露聚糖降解或改性的洗衣和清洁应用中。本发明还涉及所述洗涤剂组合物在洗衣和清洁应用中的用途以及降解甘露聚糖的方法。

背景技术

[0002] 甘露聚糖是在多种植物中发现的含有甘露糖的多糖。甘露聚糖在水性环境中溶解性差,并且它们的物理化学性质产生粘性分散体。此外,甘露聚糖具有高度的水结合能力。所有这些特征在包括酿造、烘焙、动物营养以及洗衣和清洁应用在内的若干行业中都引起问题。

[0003] 在基于植物的饮食中,存在不同的β-甘露聚糖,并且取决于它们的量和性质,它们可以损害营养物消化、微生物定殖和生长性能。甘露聚糖的酶促降解降低了高水溶性甘露聚糖的消化物粘度,并导致甘露寡糖的产生,甘露寡糖可形成豆科中存在的水不溶性线性甘露聚糖。甘露聚糖酶增加所有单胃动物的平均日增重、饲料效率、重量均匀度和存活率。

[0004] 对于动物饲料应用,例如用谷物食料喂养单胃动物,甘露聚糖是造成肠内容物粘稠的因素,因此它对饲料消化性和动物生长速率产生不利影响。对于反刍动物,甘露聚糖代表了纤维摄入的重要组分,甘露聚糖的更完全消化将促进更高的饲料转化效率。

[0005] 对于洗衣和清洁应用,包含甘露聚糖酶的洗涤剂组合物可用于降解甘露聚糖。然而,提供在不同的储存和使用条件下稳定同时仍显示出良好的甘露聚糖降解活性的甘露聚糖酶是困难的。

[0006] 本发明的一个目的是提供洗涤剂组合物,其包含当应用于这些洗涤剂组合物中时表现出甘露聚糖酶活性的新的酶。本发明的另一个目的是提供对含甘露聚糖的污渍的去污性能增加的洗涤剂组合物。

发明内容

[0007] 根据本发明的第一方面,提供了一种洗涤剂组合物,其包含至少一种酶,所述酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:16(Man7)的氨基酸序列具有至少74%的序列同一性、和/或与SEQ ID NO:12(Man6)的氨基酸序列具有至少93%的序列同一性、和/或与SEQ ID NO:20(Man14)的氨基酸序列具有至少79%的序列同一性。

[0008] 在本发明的一个实施方式中,所述至少一种酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:16具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0009] 在本发明的一个实施方式中,所述至少一种酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:12具有至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0010] 在本发明的一个进一步的实施方式中，所述至少一种酶具有甘露聚糖降解活性。包含在本发明的洗涤剂组合物中的甘露聚糖酶适用于在各种化学环境中、优选在洗涤剂组合物中降解和改性含甘露聚糖的材料。

[0011] 在本发明的一个实施方式中，所述洗涤剂组合物还包含一种或多种其他酶，所述其他酶选自蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、黄原胶酶、漆酶和/或过氧化物酶，优选选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和脂肪酶。

[0012] 在本发明的一个进一步的实施方式中，所述洗涤剂组合物为棒剂、均质片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个隔室的小袋剂、常规或致密粉末剂、颗粒剂、糊剂、凝胶剂或者常规、致密或浓缩液体剂的形式。在一个实施方式中，所述洗涤剂组合物可以是衣物洗涤剂组合物，优选为液体或固体衣物洗涤剂组合物。

[0013] 本发明还涉及如本文公开的洗涤剂组合物在降解甘露聚糖中的用途。

[0014] 在一个进一步的实施方式中，本发明涉及如本文公开的洗涤剂组合物在洗衣过程中的用途。

[0015] 本发明还涉及一种从表面去除污渍的方法，所述方法包括使所述表面与如本文公开的洗涤剂组合物相接触。

[0016] 本发明还涉及一种降解甘露聚糖的方法，所述方法包括将如本文公开的洗涤剂组合物应用于甘露聚糖，优选地，其中所述甘露聚糖在纺织品的表面上。

附图说明

[0017] 图1显示了用于在芽孢杆菌中复制的载体pEV1的示意图。

[0018] 图2示意性地显示了用于转化里氏木霉(Trichoderma reesei)原生质体以过量产生重组甘露聚糖酶蛋白(Man6、Man7和Man14)的表达盒。所述甘露聚糖酶基因在里氏木霉(T.reesei)cel7A/cbh1启动子(pcbh1)的控制下，并通过使用里氏木霉cel7A/cbh1终止子序列(tab/71)确保转录的终止。包含amdS基因作为转化标记。

[0019] 图3显示了在40mM Britton-Robinson缓冲液pH 7中使用10分钟反应时间测定的重组Man6、Man7和Man14(芽孢杆菌(Bacillus)产生的)甘露聚糖酶的温度曲线，使用天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖作为底物。所有测量至少一式两份进行。数据点是单独测量的平均值。

[0020] 图4描述了在pH 4至pH 11的40mM Britton-Robinson缓冲液中，pH对重组Man6、Man7和Man14(芽孢杆菌产生的)甘露聚糖酶蛋白的活性的效应。反应温度为50℃，反应时间为10分钟。使用天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖作为底物。所有测量至少一式两份进行。数据点是单独测量的平均值。

[0021] 图5显示了细菌甘露聚糖酶的SDS PAGE分析。

[0022] 图6描述了在4.4g/l商业重垢液体洗涤剂A存在下，在40℃、16°dH、60min、pH约8.3和按活性单位计量配给的酶下，Man6和Man7(在芽孢杆菌和木霉(Trichoderma)中产生)按光亮度增加(4个污渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0023] 图7描述了在4.4g/l商业重垢液体洗涤剂A存在下，在40℃、16°dH、60min、pH约8.3和按活性酶蛋白(AEP)配量的酶下，Man6和Man7(在芽孢杆菌中产生)按光亮度增加(4个污

渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0024] 图8描述了在3.8g/l商业护色洗涤剂粉末存在下,在40℃、16°dH、60min、pH约10和按活性单位配量的酶下,Man6和Man7(在芽孢杆菌中产生)按光亮度增加(4个污渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0025] 图9描述了在3.8g/l商业护色洗涤剂粉末存在下,在40℃、16°dH、60min、pH约10和按活性酶蛋白配量的酶下,Man6和Man7(在芽孢杆菌中产生)按光亮度增加(4个污渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0026] 图10描述了在4.2g/l商业漂白洗涤剂粉末存在下,在40℃、16°dH、60min、pH约10和按活性酶蛋白配量的酶下,Man6和Man7(在芽孢杆菌中产生)按光亮度增加(3个污渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0027] 图11在5g/l商业重垢液体洗涤剂B存在下,在40℃、16°dH、60min、pH约8.3和按活性单位配量的酶下,Man14(在芽孢杆菌中产生)按光亮度增加(2个污渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0028] 图12在5g/l商业重垢液体洗涤剂B存在下,在40℃、16°dH、60min、pH约8.3和按活性酶蛋白配量的酶下,Man14(在芽孢杆菌中产生)按光亮度增加(2个污渍的ΔL*之和)的去污性能。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0029] 图13描述了Man6和Man7(在芽孢杆菌中产生)在37℃下液体洗涤剂(OMO Color)中的稳定性。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0030] 图14描述了Man6(在芽孢杆菌中产生)在商业重垢液体洗涤剂A中的稳定性。商业制品Mannaway®4.0L用于比较。

[0031] 序列表

[0032] SEQ ID NO:1寡核苷酸引物Man6_1的序列

[0033] SEQ ID NO:2寡核苷酸引物Man6_2的序列

[0034] SEQ ID NO:3寡核苷酸引物Man7_1的序列

[0035] SEQ ID NO:4寡核苷酸引物Man7_2的序列

[0036] SEQ ID NO:5寡核苷酸引物Man14_1的序列

[0037] SEQ ID NO:6寡核苷酸引物Man14_2的序列

[0038] SEQ ID NO:7寡核苷酸引物Vec_1的序列

[0039] SEQ ID NO:8寡核苷酸引物Vec_2的序列

[0040] SEQ ID NO:9克劳氏芽孢杆菌(Bacillus clausii)man6的核苷酸序列

[0041] SEQ ID NO:10克劳氏芽孢杆菌man6的核苷酸序列,没有信号肽编码序列并具有对里氏木霉的密码子优化

[0042] SEQ ID NO:11克劳氏芽孢杆菌Man6的推断的氨基酸序列

[0043] SEQ ID NO:12克劳氏芽孢杆菌Man6的推断的氨基酸序列,没有信号肽

[0044] SEQ ID NO:13解半纤维素芽胞杆菌(Bacillus hemicellulosilyticus)man7的核

苷酸序列

[0045] SEQ ID NO:14解半纤维素芽胞杆菌man7的核苷酸序列,没有信号肽编码序列并具有对里氏木霉的密码子优化

[0046] SEQ ID NO:15解半纤维素芽孢杆菌Man7的推断的氨基酸序列

[0047] SEQ ID NO:16解半纤维素芽孢杆菌Man7的推断的氨基酸序列,没有信号肽

[0048] SEQ ID NO:17土壤枝芽孢杆菌(Virgibacillus soli)man14的核苷酸序列

[0049] SEQ ID NO:18土壤枝芽孢杆菌man14的核苷酸序列,没有信号肽编码序列并具有对里氏木霉的密码子优化

[0050] SEQ ID NO:19土壤枝芽孢杆菌man14的推断的氨基酸序列

[0051] SEQ ID NO:20土壤枝芽孢杆菌man14的推断的氨基酸序列,没有信号肽

[0052] SEQ ID NO:21寡核苷酸引物BMAN1的序列

[0053] SEQ ID NO:22寡核苷酸引物BMAN2的序列

[0054] SEQ ID NO:23寡核苷酸引物BMAN3的序列

[0055] SEQ ID NO:24寡核苷酸引物BMAN4的序列

[0056] SEQ ID NO:25短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)man31的核苷酸序列

[0057] SEQ ID NO:26短小芽孢杆菌man31的推断的氨基酸序列

[0058] SEQ ID NO:27解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)man32的核苷酸序列

[0059] SEQ ID NO:28解淀粉芽孢杆菌man32的推断的氨基酸序列

[0060] SEQ ID NO:29木聚糖兼性芽胞杆菌(Amphibacillus xylanus)man33的核苷酸序列

[0061] SEQ ID NO:30木聚糖兼性芽胞杆菌man33的推断的氨基酸序列

[0062] SEQ ID NO:31多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)man34的核苷酸序列

[0063] SEQ ID NO:32多粘类芽孢杆菌man34的推断的氨基酸序列

[0064] SEQ ID NO:33解半纤维素芽胞杆菌man35的核苷酸序列

[0065] SEQ ID NO:34解半纤维素芽胞杆菌man35的推断的氨基酸序列

[0066] SEQ ID NO:35嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alcalophilus)man36的核苷酸序列

[0067] SEQ ID NO:36嗜碱芽孢杆菌man36的推断的氨基酸序列

[0068] SEQ ID NO:37芽孢杆菌菌种(Bacillus sp.)man37的核苷酸序列

[0069] SEQ ID NO:38芽孢杆菌菌种man37的推断的氨基酸序列

[0070] SEQ ID NO:39环状芽孢杆菌(Bacillus circulans)man38的核苷酸序列

[0071] SEQ ID NO:40环状芽孢杆菌man38的推断的氨基酸序列

[0072] SEQ ID NO:41类芽孢杆菌菌种(Paenibacillus sp.)man39的核苷酸序列

[0073] SEQ ID NO:42类芽孢杆菌菌种man39的推断的氨基酸序列

[0074] SEQ ID NO:43环状芽孢杆菌man40的核苷酸序列

[0075] SEQ ID NO:44环状芽孢杆菌man40的推断的氨基酸序列

[0076] SEQ ID NO:45尼氏芽孢杆菌(Bacillus nealsonii)man41的核苷酸序列

[0077] SEQ ID NO:46尼氏芽孢杆菌man41的推断的氨基酸序列

[0078] SEQ ID NO:47环状芽孢杆菌man42的核苷酸序列

[0079] SEQ ID NO:48环状芽孢杆菌man42的核苷酸序列

具体实施方式

[0080] 用于本文中时,“分离的”是指自然界中不存在的形式的或环境中的物质。分离的物质的非限制性例子包括(1)任何非天然存在的物质,(2)从与其天然相关的一种或多种或所有天然存在的成分中至少部分去除的任何物质,包括任何酶、变体、核酸、蛋白、肽或辅因子;(3)相对于自然界中发现的物质被人工修饰的任何物质;或(4)通过相对于与其天然相关的其他组分增加或减少所述物质的量进行修饰的任何物质(例如,宿主细胞中的重组体产生,编码该物质的基因的一个或多个拷贝,以及使用与编码该物质的基因天然相关的启动子的替代启动子)。在一个实施方式中,分离的是本发明的多肽、酶、多核苷酸、宿主细胞或组合物。

[0081] 用于本文中时,术语“包含”涵盖“包括”、“含有”和“理解”的更广泛含义,以及“由...组成”和“仅由...组成”的较窄表达。

[0082] 用于本文中时,“片段”是指缺失一个或多个氨基酸或核苷酸的蛋白质或多核苷酸。在DNA的背景下,片段包括任何长度的单链和双链DNA。片段可以是活性片段,其具有蛋白质或多核苷酸的生物学功能,例如酶活性或调节活性。片段也可以是无活性片段,即它不具有天然蛋白质或多核苷酸的一种或多种生物效应。

[0083] 用于本文中时,“变体”是指插入或缺失一个或多个核苷酸/氨基酸或经化学修饰的序列(核苷酸或氨基酸)的片段。

[0084] 用于本文中时,“肽”和“多肽”是包含多个连续聚合的氨基酸残基的氨基酸序列。出于本发明的目的,肽是包含至多20个氨基酸残基的分子,并且多肽包含多于20个氨基酸残基。肽或多肽可包括修饰的氨基酸残基、不由密码子编码的天然存在的氨基酸残基和非天然存在的氨基酸残基。用于本文中时,“蛋白质”可以指任何大小的肽或多肽。蛋白质可以是酶、蛋白、抗体、膜蛋白、肽激素、调节剂或任何其他蛋白。

[0085] 术语“多核苷酸”表示从5’至3’末端读取的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。多核苷酸包括RNA和DNA,并且可以从天然来源分离、在体外合成、或由天然分子和合成分子的组合制备。

[0086] 用于本文中时,多核苷酸背景中的“修饰”、“修饰的”和类似术语是指在多核苷酸的编码或非编码区中的修饰,所述编码或非编码区例如调节序列、5’非翻译区、3’非翻译区、上调遗传元件、下调遗传元件、增强子、抑制子、启动子、外显子或内含子区域。在一些实施方式中,修饰可以仅是结构性的,对多核苷酸的生物效应、作用或功能没有影响。在其他实施方式中,修饰是提供多核苷酸的生物效应、作用或功能方面变化的结构修饰。这样的修饰可以增强、抑制或改变多核苷酸的生物功能。

[0087] 用于本文中时,“同一性”是指在两个比对序列中有残基存在的位置数量上,这两个序列之间的氨基酸残基精确匹配的百分比。当一个序列具有的残基在另一个序列中没有相应残基时,比对程序允许比对中的间隙,并且该位置不计入同一性计算的分母中。同一性是使用EMBL-EBI网站(www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)上的成对序列比对(Pairwise Sequence Alignment)工具EMBOSS Needle确定的值。

[0088] 用于本文中时,“宿主细胞”是指容易受到用包含多核苷酸的核酸构建体或表达载

体转化、转染、转导、配合、杂交等的任何细胞类型。术语“宿主细胞”包括由于复制期间发生的突变而不相同的任何后代。宿主细胞的非限制性例子是真菌细胞，来自子囊菌门(Ascomycota)、盘菌亚门(Pezizomycotina)的丝状真菌细胞；优选选自粪壳菌纲(Sordariomycetes)、肉座菌亚纲(Hypocreomycetidae)、肉座菌目(Hypocreales)和小囊菌目(Microascales)以及曲霉属(Aspergillus)、金孢霉属(Chrysosporium)、毁丝霉属(Myceliophthora)和腐质霉属(Humicola)的成员；更优选选自肉座菌科(Hypocreacea)、丛赤壳科(Nectriaceae)、麦角菌科(Clavicipitaceae)、小囊菌科(Microascaceae)，以及木霉属(Trichoderma)(肉座菌属(Hypocrea)的无性型)、镰刀菌属(Fusarium)、赤霉属(Gibberella)、丛赤壳属(Nectria)、葡萄状穗霉属(Stachybotrys)、麦角菌属(Claviceps)、绿僵菌属(Metarhizium)、Villosiclava、线虫草属(Ophiocordyceps)、头孢霉属(Cephalosporium)和赛多孢子菌属(Scedosporium)；更优选选自里氏木霉(红褐肉座菌(Hypocrea jecorina))、桔绿木霉(T.citrinoviridae)、长枝木霉(T.longibrachiatum)、绿木霉(T.virens)、哈茨木霉(T.harzianum)、棘孢木霉(T.asperellum)、深绿木霉(T.atroviridae)、近里氏木霉(T.parareesei)、尖孢镰刀菌(Fusarium oxysporum)、禾谷镰刀菌(F.graminearum)、假禾谷镰刀菌(F.pseudograminearum)、F.venenatum、藤仓赤霉(Gibberella fujikuroi)、串珠赤霉(G.moniliformis)、玉蜀黍赤霉(G.zeaea)、鞭毛藻丛赤壳菌(血赤壳菌)(Nectria(Haematonectria)haematococca)、黑葡萄穗霉(Stachybotrys chartarum)、S.chlorohalonata、黑麦麦角菌(Claviceps purpurea)、黄绿绿僵菌(Metarhizium acridum)、金龟子绿僵菌(M.anisopliae)、Villosiclava virens、冬虫夏草菌(Ophiocordyceps sinensis)、产黄枝顶孢霉(头孢霉)(Acremonium((Cephalosporium))chrysogenum)和尖端赛多孢子菌(Scedosporium apiospermum)以及黑曲霉(Aspergillus niger)、泡盛曲霉(A.awamori)、米曲霉(A.oryzae)、Chrysosporium lucknowense、嗜热毁丝霉(Myceliophthora thermophila)、特异腐质霉(Humicola insolens)和灰腐质霉(Humicola grisea)；最优选是里氏木霉。宿主细胞的非限制性例子是细菌细胞，优选革兰氏阳性杆菌(例如枯草芽孢杆菌(B.subtilis)、地衣芽孢杆菌(B.licheniformis)、巨大芽孢杆菌(B.megaterium)、解淀粉芽孢杆菌(B.amyloliquefaciens)、短小芽孢杆菌(B.pumilus))、放线菌(例如链霉菌属(链霉属)菌种)和酵母(例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、巴斯德毕赤氏酵母(Pichia pastoris)、解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica))。

[0089] 在一个示例性实施方式中，宿主细胞是真菌细胞，优选丝状真菌细胞，例如木霉属或里氏木霉。在一个示例性实施方式中，宿主细胞是细菌细胞，优选革兰氏阳性芽孢杆菌细胞，例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌。

[0090] “重组细胞”或“重组宿主细胞”是指经遗传修饰或改变以包含对所述细胞或宿主细胞不是天然的核酸序列的细胞或宿主细胞。在一个实施方式中，遗传修饰包括将所述多核苷酸整合到宿主细胞的基因组中。在另一个实施方式中，与宿主细胞相比，所述多核苷酸是外源的。

[0091] 用于本文中时，“表达”包括参与宿主细胞中产生多肽的任何步骤，包括但不限于转录、翻译、翻译后修饰和分泌。表达之后可以收获、即回收宿主细胞或表达产物。

[0092] 术语“表达载体”表示线性或环状的DNA分子，其包含编码目的多肽的区段，所述区段与提供其转录的其他区段可操作地连接。这样的其他区段可包括启动子和终止子序列，并且可任选包括一个或多个复制起点、一个或多个选择性标记、增强子、多腺苷酸化信号、载体等。表达载体通常源自于质粒或病毒DNA，或可含有这两者的元件。表达载体可以是方便进行重组DNA程序的任何表达载体，并且载体的选择往往取决于所述载体将要导入的宿主细胞。因此，所述载体可以是自主复制载体，即作为染色体外实体存在、其复制独立于染色体复制的载体，例如质粒。

[0093] 或者，所述载体可以是当被导入宿主细胞时整合到宿主细胞基因组中并与其所整合的染色体一起复制的载体。

[0094] 本文中关于多肽或蛋白质表达的术语“重组性表达的”或“重组表达的”根据本领域的标准定义来定义。

[0095] 本文所用的关于特定微生物来源的术语“获得自”和“可获得的”是指多核苷酸和/或多肽由特定来源产生(同源表达)，或由其中已插入来自所述来源的基因的细胞产生(异源表达)。

[0096] 术语“酶组合物”是指来自单一微生物物种的常规酶促发酵产物，可能是分离和纯化的，这样的制剂通常包含许多不同的酶活性；或单组分酶的混合物，优选通过使用常规重组技术从细菌或者真菌物种得来的酶，所述酶已经分别发酵并且可能分离和纯化，并且其可以来源于不同物种，优选真菌或细菌物种，或微生物的发酵产物，所述微生物充当用于表达重组甘露聚糖酶的宿主细胞，但该微生物同时产生其他酶。

[0097] 当提及DNA区段时，术语“可操作地连接”表示所述区段被安排成使得所述区段为了它们的预期目的一齐起作用，例如在启动子中启动转录并通过编码区段进行到终止子。

[0098] 术语“启动子”表示含有DNA序列的基因的一部分，其提供RNA聚合酶的结合和转录的起始。启动子序列通常、但不总是存在于基因的5’非编码区中。

[0099] 术语“分泌信号序列”表示一种编码多肽(“分泌肽”)的DNA序列，所述多肽作为较大的多肽的组分，引导该较大的多肽通过合成它的宿主细胞的分泌途径。分泌信号序列可以是天然的，或者它可以用来自另一来源的分泌信号序列或载体序列替换。取决于宿主细胞，可以切割所述较大的肽以在运输通过分泌途径期间除去所述分泌肽。

[0100] 术语“核心区”表示酶的结构域，其可以经过或可以不经过修饰或改变，但保持其原始活性；本领域已知的催化结构域保持功能性。

[0101] 术语“接头”或“间隔区”是指包含至少两个氨基酸的多肽，其可存在于多结构域蛋白、例如包含酶核心和结合结构域例如碳水化合物结合模块(CBM)的酶或任何其他酶杂合体的结构域之间，或在表达为融合多肽的两种蛋白或多肽、例如包含两种核心酶的融合蛋白之间。例如，通过将编码酶核心的DNA序列、编码接头的DNA序列和编码CBM的DNA序列依次融合到一个开放阅读框中并表达该构建体来提供酶核心与CBM的融合蛋白。

[0102] 除非另有说明，术语“洗涤剂组合物”包括颗粒或粉末形式的通用或重垢洗涤剂，尤其是清洁洗涤剂；液体、凝胶或糊剂形式的通用洗涤剂，尤其是所谓的重垢液体(HDL)类型；液体精细织物洗涤剂；手洗洗碗剂或轻垢洗碗剂，尤其是高发泡型洗碗剂；机器洗碗剂，包括用于家庭和机构用途的各种片剂、颗粒、液体和漂洗辅助类型；液体清洁和消毒剂，汽车或地毯香波，浴室清洁剂；金属清洁剂；以及清洁助剂，例如漂白添加剂和“污渍棒”或预

处理类型。术语“洗涤剂组合物”和“洗涤剂制剂”用于指意欲用于洗涤介质中以清洁脏污物体的混合物。在一些实施方案中，该术语用于指洗涤织物和/或衣服(例如“衣物洗涤剂”)。在另外的实施方式中，该术语是指其他洗涤剂，例如用于清洁餐具、刀具等的那些洗涤剂(例如，“洗碗洗涤剂”)。并未意欲将本发明限于任何特定的洗涤剂制剂或组合物。意欲除了本发明的变体之外，该术语还包括可以含有例如表面活性剂、助洗剂、螯合剂、漂白剂体系或漂白剂组分、聚合物、织物调理剂、泡沫促进剂、抑泡剂、染料，香料、褐变抑制剂、光学增亮剂、杀菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、抗腐蚀剂、酶抑制剂或稳定剂、酶活化剂、转移酶、水解酶、氧化还原酶、上蓝剂和荧光染料、抗氧化剂和增溶剂的洗涤剂。

[0103] 术语“纺织品”是指任何纺织材料，包括纱线、纱线中间体、纤维、非织造材料、天然材料、合成材料和任何其他纺织材料、由这些材料制成的织物和由织物制成的产品(例如，服装和其他制品)。纺织品或织物可以是针织物、机织物、牛仔布、无纺布、毡、纱线和毛巾布的形式。纺织品可以是纤维素基的，例如天然纤维素，包括棉、亚麻、黄麻、苎麻、剑麻或椰纤维，或人造纤维素质(例如源自木浆)，包括粘胶/人造丝、苎麻、醋酸纤维素纤维(tricell)、莱赛尔(lyocell)或其掺合物。纺织品或织物也可以是非纤维素基的，例如天然聚酰胺，包括羊毛、驼毛、羊绒、马海毛、兔毛和丝，或合成聚合物，例如尼龙、芳纶、聚酯、丙烯腈系纤维、聚丙烯和氨纶纤维(spandex)/弹性纤维，或其掺合物，以及纤维素基纤维和非纤维素基纤维的掺合物。掺合物的例子是棉和/或人造丝/粘胶与一种或多种伴侣材料的掺合物，所述伴侣材料例如羊毛、合成纤维(例如聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚乙烯醇纤维、聚氯乙烯纤维、聚氨酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)以及含纤维素的纤维(例如人造丝/粘胶、苎麻、亚麻、黄麻、醋酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。织物可以是常规可洗的洗衣物，例如沾污的家用洗衣物。当使用术语织物或服装时，其意欲也包括更广义的术语纺织品。

[0104] 术语“稳定性”包括储存稳定性和使用期间的稳定性，例如在洗涤过程期间的稳定性(洗涤稳定性)，并反映本发明的蛋白酶变体随时间变化的稳定性，例如当蛋白酶保持在溶液中、特别是在洗涤剂溶液中时保留了多少活性。稳定性受许多因素例如pH、温度、洗涤剂组成例如助洗剂的量、表面活性剂等的影响。蛋白酶稳定性可以使用如本文中的材料和方法部分所述的“稳定性测定”来测量。术语“稳定性改善”或“稳定性增加”在本文中定义为相对于亲本蛋白酶的稳定性，变体蛋白酶显示出在溶液中的稳定性增加。术语“稳定性改善”和“稳定性增加”包括“化学稳定性改善”、“洗涤剂稳定性”或“洗涤剂稳定性改善”。

[0105] 洗涤剂组合物

[0106] 本发明涉及包含细菌甘露聚糖酶的新的洗涤剂组合物。所述包含细菌甘露聚糖酶的洗涤剂组合物可用于希望甘露聚糖降解或改性的洗衣和清洁应用中。本发明还涉及所述洗涤剂组合物在洗衣和清洁应用中的用途以及降解甘露聚糖的方法。

[0107] 用于本文中时，术语“甘露聚糖”是指由通过β-1,4-键连接在一起的甘露糖主链与通过α-1,6-键附着于所述主链上的半乳糖侧链组成的多糖。甘露聚糖包含植物基材料，例如瓜尔胶和刺槐豆胶。葡甘露聚糖是具有或多或少规则交替的β-1,4连接的甘露糖和葡萄糖的主链的多糖，半乳甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖是具有α-1,6连接的半乳糖侧链的甘露聚糖和葡甘露聚糖。

[0108] 用于本文中时，术语“甘露聚糖酶”或“半乳甘露聚糖酶”表示根据本领域定义为甘露聚糖内切-1,4-β-甘露糖苷酶并具有替代名称β-甘露聚糖酶和内切-1,4-甘露聚糖酶并

催化甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖中的1,4-β-D-甘露糖苷键水解的甘露聚糖酶。甘露聚糖酶根据酶命名法分类为EC 3.2.1.78。

[0109] 如本文所用的“甘露聚糖酶活性”是指多肽的甘露聚糖降解活性。如本文所用的降解或修饰意指通过甘露聚糖酶从甘露聚糖水解甘露糖单元。本发明多肽的甘露聚糖降解活性可以根据本领域已知的标准试验程序测试。实施例7提供了用于确定甘露聚糖酶活性的标准方法的示例。

[0110] 根据第一方面，本发明的洗涤剂组合物包含至少一种酶，所述酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:16(Man7)的氨基酸序列具有至少74％的序列同一性，和/或与SEQ ID NO:12(Man6)的氨基酸序列具有93％的序列同一性，和/或与SEQ ID NO:20(Man14)的氨基酸序列具有79％的序列同一性。

[0111] 在本发明的一个实施方式中，所述至少一种酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0112] 在本发明的一个实施方式中，所述至少一种酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0113] 在本发明的一个进一步的实施方式中，所述至少一种酶具有甘露聚糖降解活性。包含在本发明的洗涤剂组合物中的所述甘露聚糖酶适用于在各种化学环境中、优选在洗涤剂组合物中降解和改性含甘露聚糖的材料。

[0114] 在本发明的一个实施方式中，所述洗涤剂组合物还包含一种或多种其他酶，所述其他酶选自蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、黄原胶酶、漆酶和/或过氧化物酶，优选选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和脂肪酶。

[0115] 一般而言，所选择的酶的性质应与所选择的洗涤剂相容(即，pH最适、与其他酶性和非酶性成分的相容性等)，并且所述酶应以有效量存在。

[0116] 纤维素酶

[0117] 合适的纤维素酶包括细菌或真菌来源的纤维素酶。化学修饰的或蛋白质工程的突变体包括在内。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰刀菌属、梭孢壳属、枝顶孢属的纤维素酶，例如，在US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757和WO 89/09259中公开的由特异腐质霉、嗜热毁丝霉和尖孢镰刀菌产生的真菌纤维素酶。特别合适的纤维素酶是具有护色益处的碱性或中性纤维素酶。这样的纤维素酶的例子是在EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940中描述的纤维素酶。其他例子是纤维素酶变体，例如在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和PCT/DK98/00299中描述的那些。表现出内切-β-1,4-葡聚糖酶活性的纤维素酶(EC 3.2.1.4)的例子是在WO02/099091中描述的那些。纤维素酶的其他例子包括WO96/29397中描述的45族纤维素酶，尤其是其在WO 02/099091的SEQ ID NO:8中对应于以下位置的一个或多个位置处具有取代、插入和/或缺失的

变体:第2位、第4位、第7位、第8位、第10位、第13位、第15位、第19位、第20位、第21位、第25位、第26位、第29位、第32位、第33位、第34位、第35位、第37位、第40位、第42位、第42a位、第43位、第44位、第48位、第53位、第54位、第55位、第58位、第59位、第63位、第64位、第65位、第66位、第67位、第70位、第72位、第76位、第79位、第80位、第82位、第84位、第86位、第88位、第90位、第91位、第93位、第95位、第95d位、第95h位、第95j位、第97位、第100位、第101位、第102位、第103位、第113位、第114位、第117位、第119位、第121位、第133位、第136位、第137位、第138位、第139位、第140a位、第141位、第143a位、第145位、第146位、第147位、第150e位、第150j位、第151位、第152位、第153位、第154位、第155位、第156位、第157位、第158位、第159位、第160c位、第160e位、第160k位、第161位、第162位、第164位、第165位、第168位、第170位、第171位、第172位、第173位、第175位、第176位、第178位、第181位、第183位、第184位、第185位、第186位、第188位、第191位、第192位、第195位、第196位、第200位和/或第201位,优选选自P19A、G20K、Q44K、N48E、Q119H或Q146R。可商购的纤维素酶包括Celluclean™、Celluzyme™和Carezyme™(Novozymes A/S),Clazinase™和Puradax HA™(Genencor International Inc.),以及KAC-500(B)™(Kao Corporation)。

[0118] 蛋白酶

[0119] 合适的蛋白酶包括细菌、真菌、植物、病毒或动物来源、例如植物或微生物来源的蛋白酶。微生物来源是优选的。化学修饰的或蛋白质工程的突变体包括在内。它可以是碱性蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是S1家族,例如胰蛋白酶,或S8家族,例如枯草杆菌蛋白酶。金属蛋白酶可以是来自例如家族M4的嗜热菌蛋白酶,或其他金属蛋白酶,例如来自M5、M7或M8家族的那些。

[0120] 术语“枯草杆菌酶”是指根据Siezen等人,Protein Engng.4(1991)719-737和Siezen等人Protein Science 6(1997)501-523的丝氨酸蛋白酶亚组。丝氨酸蛋白酶是以在活性位点具有丝氨酸为特征的蛋白酶亚组,其与底物形成共价加合物。枯草属酶可分为6个分支,即枯草杆菌蛋白酶家族、热酶(Thermitase)家族、蛋白酶K家族、Lantibiotic肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。枯草杆菌酶的例子是US8962042和WO09/021867中描述的源自于芽孢杆菌例如缓慢芽孢杆菌(Bacillus lentus)、微小芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌(Bacillus gibsonii)的那些,以及WO89/06279中描述的缓慢枯草杆菌蛋白酶(subtilisin lentus)、Novo枯草杆菌蛋白酶(subtilisin Novo)、Carlsberg枯草杆菌蛋白酶(subtilisin Carlsberg)、地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)、枯草杆菌蛋白酶BPN’、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147和枯草杆菌蛋白酶168,以及WO93/18140中描述的蛋白酶PD138。其他有用的蛋白酶可以是WO92/175177、WO01/016285、WO02/026024和WO02/016547中描述的那些。胰蛋白酶样蛋白酶的例子是胰蛋白酶(例如猪或牛来源的)和在WO89/06270、WO94/25583和WO05/040372中描述的镰刀菌蛋白酶,以及WO05/052161和WO05/052146中描述的源自于纤维菌属(Cellumonas)的胰凝乳蛋白酶。进一步优选的蛋白酶是如例如WO95/23221中所述的来自缓慢芽胞杆菌DSM 5483的碱性蛋白酶,以及WO92/21760、WO95/23221、EP1921147和EP1921148中描述的其变体。金属蛋白酶的例子是如WO07/044993(Genencor Int.)中所述的中性金属蛋白酶,例如源自于解淀粉芽孢杆菌的那些。

[0121] 有用的蛋白酶的例子是下列文献中描述变体:WO92/19729、WO96/034946、WO98/

20115、WO98/20116、WO99/011768、WO01/44452、WO03/006602、WO04/03186、WO04/041979、WO07/006305、WO11/036263、WO11/036264，尤其是在以下一个或多个使用BPN'编号的位置处具有取代的变体：第3位、第4位、第9位、第15位、第27位、第36位、第57位、第68位、第76位、第87位、第95位、第96位、第97位、第98位、第99位、第100位、第101位、第102位、第103位、第104位、第106位、第118位、第120位、第123位、第128位、第129位、第130位、第160位、第167位、第170位、第194位、第195位、第199位、第205位、第206位、第217位、第218位、第222位、第224位、第232位、第235位、第236位、第245位、第248位、第252位和第274位。更优选的是，所述枯草杆菌酶变体可以包含下列突变：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(使用BPN'编号)。合适的可商购蛋白酶包括：以商品名Alcalase®、Duralase™、Durazym™、Relase®、Relase® Ultra、Savinase®、Savinase® Ultra、Primase®、Polarzyme®、Kannase®、Liquanase®、Liquanase® Ultra、Ovozyme®、Coro-nase®、Coronase® Ultra、Neutrase®、Everlase®和Esperase®(Novozymes A/S)出售的那些，以商品名Maxatase®、Maxacal®、Maxapem®、Purafect®、Purafect Prime®、Preferenz™、Purafect MA®、Purafect Ox®、Purafect OxP®、Puramax®、Properase®、Effectenz™、FN2®、FN3®、FN4®、Excellase®、Opticlean®和Optimase®(Danisco/DuPont)、Axapem™(Gist-Brocases N.V.)出售的那些，BLAP(序列示于US5352604的图29中)及其变体(Henkel AG)和来自Kao的KAP(嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alkalophilus)枯草杆菌蛋白酶)。

[0122] 脂肪酶和角质酶

[0123] 合适的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。化学修饰的或蛋白质工程的突变酶包括在内。实例包括来自嗜热丝孢菌(Thermomyces)的脂肪酶，例如如EP258068和EP305216中所述的疏棉状嗜热丝孢菌(T.lanuginosus)(以前称为柔毛腐质霉(Humicola lanuginosa))，来自腐质霉、例如特异腐质霉(H.insolens)的角质酶(WO96/13580)，来自假单胞菌(Pseudomonas)菌株(其中一些现在更名为伯克氏菌(Burkholderia))、例如产碱伯克氏菌(P.alcaligenes)或类产碱伯克氏菌(P.pseudoalcaligenes)(EP218272)、洋葱伯克氏菌(P.cepacia)(EP331376)，伯克氏菌菌种(P.sp.)菌株SD705(WO95/06720&WO96/27002)、P.wisconsinensis(WO96/12012)的脂肪酶，GDSL-型GDSL链霉菌(Streptomyces)脂肪酶(WO10/065455)，来自稻梨孢菌(Magnaporthe grisea)的角质酶(WO10/107560)，来自门多萨假单胞菌(Pseudomonas mendocina)的角质酶(US5,389,536)，来自褐色喜热裂孢菌(Thermobifida fusca)的脂肪酶(WO11/084412)，嗜热脂肪土芽孢杆菌(Geobacillus stearothermophilus)脂肪酶(WO11/084417)，来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶(WO11/084599)，以及来自灰色链霉菌(Streptomyces griseus)(WO11/150157)和始旋链霉菌

(S.pristinaespiralis)(WO12/137147)的脂肪酶。

[0124] 其他例子是脂肪酶变体,例如在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和WO09/109500中描述的那些。

[0125] 优选的商业脂肪酶产品包括Lipolase™,Lipex™;Lipolex™和Lipoclean™(Novozymes A S),Lumafast(来源于Genencor)和Lipomax(来源于Gist-Brocades)。

[0126] 还有其他例子是脂肪酶,有时称为酰基转移酶或过水解酶,例如与南极假丝酵母(Candida antarctica)脂肪酶A具有同源性的酰基转移酶(WO10/111143),来自耻垢分枝杆菌(Mycobacterium smegmatis)的酰基转移酶(WO05/56782),来自CE7家族的过水解酶(WO09/67279),以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体,特别是来自Huntsman Textile Effects Pte Ltd的商品Gentle Power Bleach中使用的S54V变体(WO10/100028)。

[0127] 淀粉酶

[0128] 可以与本发明的枯草杆菌酶变体一起使用的合适的淀粉酶可以是α-淀粉酶或葡糖淀粉酶,并且可以是细菌或真菌来源的。化学修饰的或蛋白质工程的突变体包括在内。淀粉酶包括,例如,从芽孢杆菌例如在GB 1,296,839中有更详细描述的地衣芽孢杆菌特殊菌株获得的α-淀粉酶。

[0129] 合适的淀粉酶包括WO 95/10603中具有SEQ ID NO:3的淀粉酶或与SEQ ID NO:3具有90%的序列同一性的其变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中,例如在一个或多个以下位置具有取代的变体:第15位、第23位、第105位、第106位、第124位、第128位、第133位、第154位、第156位、第178位、第179位、第181位、第188位、第190位、第197位、第201位、第202位、第207位、第208位、第209位、第211位、第243位、第264位、第304位、第305位、第391位、第408位和第444位。

[0130] 不同的合适淀粉酶包括WO 02/010355中的具有SEQ ID NO:6的淀粉酶或与该淀粉酶具有90%的序列同一性的该淀粉酶的变体。优选的变体是在181和182位具有缺失并且在193位具有取代的那些。

[0131] 其他合适的淀粉酶是包含WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中显示的源自于解淀粉芽孢杆菌的α-淀粉酶的残基1-33和WO 2006/066594的SEQ ID NO:4中所示的地衣芽孢杆菌α-淀粉酶的残基36-483的杂合α-淀粉酶,或具有90%的序列同一性的其变体。该杂合α-淀粉酶的优选变体是在一个或多个以下位置具有取代、缺失或插入的变体:G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209和Q264。包含WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中显示的源自于解淀粉芽孢杆菌的α-淀粉酶的残基1-33和WO 2006/066594的SEQ ID NO:4的残基36-483的杂合α-淀粉酶的最优选变体是具有下列取代的那些:

[0132] M197T;

[0133] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S;或

[0134] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0135] 其他合适的淀粉酶是WO 99/019467中具有SEQ ID NO:6的淀粉酶或与SEQ ID NO:6具有90%的序列同一性的其变体。SEQ ID NO:6的优选变体是在一个或多个以下位置具有取代、缺失或插入的变体:R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216和K269。特别优选的淀粉酶是在R181和G182位或H183和G184位具有缺失的淀粉酶。可以使用的其他淀粉酶是

具有WO 96/023873的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的那些或与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7具有90％的序列同一性的其变体。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的优选变体是在一个或多个以下位置具有取代、缺失或插入的变体：第140位、第181位、第182位、第183位、第184位、第195位、第206位、第212位、第243位、第260位、第269位、第304位或第476位。更优选的变体是在第181位和第182位或者第183位和第184位具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的最优选淀粉酶变体是在第183位和第184位具有缺失并且在第140位、第195位、第206位、第243位、第260位、第304位和第476位中的一个或多个具有取代的那些。

[0136] 其他可以使用的淀粉酶是具有WO 08/153815的SEQ ID NO:2、WO 01/66712的SEQ ID NO:10的淀粉酶或与WO 08/153815的SEQ ID NO:2具有90％的序列同一性或与WO 01/66712中的SEQ ID NO:10具有90％的序列同一性的其变体。WO 01/66712中SEQ ID NO:10的优选变体是在一个或多个以下位置具有取代、缺失或插入的变体：第176位、第177位、第178位、第179位、第190位、第201位、第207位、第211位和第264位。

[0137] 其他合适的淀粉酶是具有WO 09/061380的SEQ ID NO:2的淀粉酶或与SEQ ID NO:2具有90％的序列同一性的其变体。SEQ ID NO:2的优选变体是具有C-末端截短和/或在一个或多个以下位置具有取代、缺失或插入的那些：Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444和G475。SEQ ID NO:2的更优选变体是在一个或多个以下位置：Q87E,R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E,R、N272E,R、S243Q,A,E,D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E和G475K具有取代和/或在R180和/或S181或T182和/或G183位具有缺失的那些。SEQ ID NO:2的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些：

[0138] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；

[0139] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K；

[0140] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；或

[0141] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K，其中所述变体是C末端截短的并且任选还包含243位的取代和/或180位和/或181位的缺失。

[0142] 其他合适的淀粉酶是WO01/66712中具有SEQ ID NO:12的α-淀粉酶或与SEQ ID NO:12具有至少90％序列同一性的变体。优选的淀粉酶变体是在WO 01/66712中SEQ ID NO:12的一个或多个以下位置具有取代、缺失或插入的变体：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。特别优选的淀粉酶包括具有D183和G184的缺失并具有取代R118K、N195F、R320K和R458K的变体，以及在选自下列的一个或多个位置另外具有取代的变体：M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345和A339，最优选的是在所有这些位置另外具有取代的变体。

[0143] 其他例子是淀粉酶变体，例如在WO2011/098531、WO2013/001078和WO2013/001087中描述的那些。

[0144] 可商购的淀粉酶是Duramyl™、Termamyl™、Fungamyl™、Stainzyme™、Stainzyme Plus™、Natalase™、Liquozyme X和BAN™(来自Novozymes A/S)，以及Rapidase™、Purastar™/Effectenz™、Powerase和Preferenz S100(来自Genencor International

Inc./DuPont)。

[0145] 过氧化物酶/氧化酶

[0146] 合适的过氧化物酶/氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。化学修饰的或蛋白质工程的突变体包括在内。有用的过氧化物酶的例子包括来自鬼伞属(Coprinus)、例如来自灰盖鬼伞(C.cinereus)的过氧化物酶,及它们的变体,如WO 93/24618、WO 95/10602和WO 98/15257中描述的那些。

[0147] 可商购的过氧化物酶包括Guardzyme™(Novozymes A/S)。

[0148] 所述洗涤剂酶可以通过添加分别含有一种或多种酶的添加剂或通过添加包含所有这些酶的组合添加剂而包含在洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂,即分别的添加剂或组合的添加剂,可以配制为例如颗粒、液体、浆液等。优选的洗涤剂添加剂制剂是颗粒、特别是无尘颗粒,液体、特别是稳定的液体,或浆液。

[0149] 无尘颗粒可以,例如,如US 4,106,991和4,661,452中所公开的那样生产,并且可以任选通过本领域已知的方法进行涂覆。蜡质涂料的例子是平均摩尔量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16至50个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;其中醇含有12至20个碳原子并且其中有15至80个环氧乙烷单元的乙氧基化脂肪醇;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油一酯和二酯和三酯。适用于流化床技术应用的成膜涂料的例子在GB1483591中给出。例如,可以通过根据已建立的方法添加多元醇例如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸来稳定液体酶制剂。受保护的酶可以根据EP 238,216中公开的方法制备。

[0150] 用于固体衣物洗涤剂的组合物,例如,按组合物的总量计,可包含0.000001%-5%、例如0.000005%-2%、例如0.00001%-1%、例如0.00001%-0.1%的酶蛋白。

[0151] 用于洗衣液的组合物,例如,按组合物的总量计,可包含0.000001%-3%、例如0.000005-1%、例如0.00001%-0.01%的酶蛋白。

[0152] 用于自动洗碗机的组合物,例如,按组合物的总量计,可包含0.000001%-5%、例如0.000005%-2%、例如0.00001%-1%、例如0.00001%-0.1%的酶蛋白。

[0153] 本发明的洗涤剂组合物的酶可以使用常规稳定剂来稳定,所述常规稳定剂是例如多元醇例如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸、或硼酸衍生物例如芳族硼酸酯、或苯基硼酸衍生物例如4-甲酰基苯基硼酸,并且所述组合物可以如例如WO92/19709和WO92/19708中所述进行配制。

[0154] 在一个实施方式中,本发明涉及洗涤剂组合物,其包含本发明的酶与一种或多种另外的清洁组合物组分的组合。另外的组分的选择在技术人员的技能范围内,并且包括常规成分,包括下面列出的示例性的非限制性组分。

[0155] 对于纺织品护理,组分的选择可包括考虑待清洁的纺织品类型、脏污的类型和/或程度、进行清洁的温度,以及洗涤剂产品的配方。虽然下面提到的组分根据特定功能通过普通标题进行分类,但是这不应被解释为限制,因为组分可以包含本领域技术人员将领会的另外的功能。

[0156] 1.表面活性剂

[0157] 所述洗涤剂组合物可包含一种或多种表面活性剂,其可以是阴离子和/或阳离子和/或非离子和/或半极性和/或两性离子的,或其混合物。在一个特定实施方式中,所述洗涤剂组合物包含一种或多种非离子表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。

所述表面活性剂通常以约0.1至60重量％的水平存在，例如以约1％至约40％、或约3％至约20％、或约3％至约10％。所述表面活性剂基于所需的清洁应用进行选择，并包括本领域已知的任何常规表面活性剂。可以利用本领域已知的用于洗涤剂的任何表面活性剂。

[0158] 当其中包含时，所述洗涤剂将通常含有约1至约40重量％、例如约5％至约30％、包括约5％至约15％、或约20％至约25％的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性例子包括硫酸盐和磺酸盐，特别是直链烷基苯磺酸盐(LAS)、LAS的异构体、支链烷基苯磺酸盐(BABS)、苯基链烷磺酸盐、α-烯烃磺酸盐(AOS)、烯烃磺酸盐、链烯磺酸盐、链烷-2,3-二基双(硫酸盐)、羟基链烷磺酸盐和二磺酸盐、烷基硫酸盐(AS)例如十二烷基硫酸钠(SDS)、脂肪醇硫酸盐(FAS)、伯醇硫酸盐(PAS)、醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES，也称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐)、仲链烷磺酸盐(SAS)、石蜡磺酸盐(PS)、酯磺酸盐、磺化脂肪酸甘油酯、α-磺基脂肪酸甲酯(α-SFMe或SES)包括甲酯磺酸盐(MES)、烷基-或烯基琥珀酸、十二烯基/十四烯基琥珀酸(DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺基琥珀酸或皂的二酯和单酯，及其组合。

[0159] 当其中包含时，所述洗涤剂将通常含有约0至约10重量％的阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂的非限制性例子包括烷基二甲基乙醇胺季铵盐(ADMEAQ)、鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基二硬脂基氯化铵(DSDMAC)和烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵(AQA)化合物及其组合。

[0160] 当其中包含时，所述洗涤剂将通常含有约0.2至约40重量％的非离子表面活性剂，例如约0.5％至约30％，特别是约1％至约20％，约3％至约10％，例如约3％至约5％，或约8％至约12％。非离子表面活性剂的非限制性例子包括醇乙氧基化物(AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化脂肪醇(PFA)、烷氧基化脂肪酸烷基酯例如乙氧基化和/或丙氧基化脂肪酸烷基酯、烷基酚乙氧基化物(APE)、壬基酚乙氧基化物(NPE)、烷基多糖苷(APG)、烷氧基化胺、脂肪酸单乙醇酰胺(FAM)、脂肪酸二乙醇酰胺(FADA)、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM)、丙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM)、多羟基烷基脂肪酸酰胺、或葡糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺，GA，或脂肪酸葡糖酰胺，FAGA)，以及商品名SPAN和TWEEN的现有产品，及其组合。

[0161] 当其中包含时，所述洗涤剂将通常含有约0至约10重量％的半极性表面活性剂。半极性表面活性剂的非限制性例子包括氧化胺(AO)例如烷基二甲基氧化胺、N-(椰油烷基)-N,N-二甲基氧化胺和N-(牛油烷基)-N、N-双(2-羟乙基)氧化胺、脂肪酸烷醇酰胺和乙氧基化脂肪酸链烷醇酰胺，及其组合。

[0162] 当其中包含时，所述洗涤剂将通常含有约0至约10重量％的两性离子表面活性剂。两性离子表面活性剂的非限制性例子包括甜菜碱、烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱及其组合。

[0163] 2.水溶助剂

[0164] 水溶助剂是能将疏水性化合物溶解在水溶液中(或相反地，将极性物质溶解在非极性环境中)的化合物。通常，水溶助剂兼具亲水和疏水特性(从表面活性剂中已知的所谓两亲性质)；然而，水溶助剂的分子结构通常不利于自发的自聚集。水溶助剂不显示临界浓度，即高于该浓度发生自聚集，如发现表面活性剂和脂质形成胶束、片层或其他界限分明的中间相。相反，许多水溶助剂显示出连续型聚集过程，其中聚集体的尺寸随着浓度增加而增

长。然而，许多水溶助剂改变含有极性和非极性特性物质的体系、包括水、油、表面活性剂和聚合物的混合物的相行为、稳定性和胶体性质。传统上在跨越从制药、个人护理、食品到技术应用的行业中都使用水溶助剂。在洗涤剂组合物中使用水溶助剂允许例如更浓缩的表面活性剂制剂(如在通过除去水使液体洗涤剂紧缩的过程中)而不会引起不希望的现象，例如相分离或高粘度。

[0165] 所述洗涤剂可含有0-5重量％、例如约0.5至约5％、或约3％至约5％的水溶助剂。可以利用本领域已知的用于洗涤剂的任何水溶助剂。水溶助剂的非限制性例子包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、异丙苯磺酸钠(SCS)、甲基异丙苯磺酸钠、氧化胺、醇和聚二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基硫酸钠及其组合。

[0166] 3.助洗剂和共助洗剂

[0167] 所述洗涤剂组合物可含有约0-65重量％、例如约5％至约45％的洗涤剂助洗剂或共助洗剂，或其混合物。在餐具洗涤剂中，助洗剂的水平通常为40-65％，特别是50-65％。助洗剂和/或共助洗剂特别可以是与Ca和Mg形成水溶性络合物的螯合剂。可以利用本领域已知用于洗衣洗涤剂的任何助洗剂和/或共助洗剂。助洗剂的非限制性例子包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐例如三磷酸钠(STP或STPP)、碳酸盐例如碳酸钠、可溶性硅酸盐例如偏硅酸钠、层状硅酸盐(例如来自Hoechst的SKS-6)、乙醇胺例如2-氨基乙-1-醇(MEA)、二乙醇胺(DEA、也称为亚氨基二乙醇)、三乙醇胺(TEA，也称为2,2',2″-硝基三乙醇)和羧甲基菊粉(CMI)，及其组合。

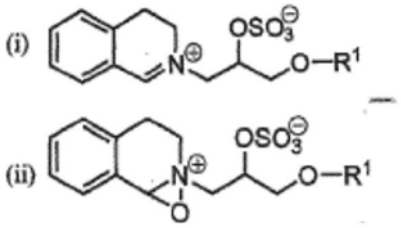
[0168] 所述洗涤剂组合物也可以含有约0-20重量％、例如约5％至约10％的洗涤剂共助洗剂，或其混合物。洗涤剂组合物可以只包含共助洗剂，或与助洗剂、例如沸石助洗剂组合。共助洗剂的非限制性例子包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物，例如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。其他非限制性例子包括柠檬酸盐、螯合剂如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐，以及烷基或烯基琥珀酸。另外的具体例子包括2,2',2″-次氮基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、乙二胺-N,N-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(HEDP)、乙二胺四(亚甲基膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMPA或DTMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二琥珀酸(IDA)、N-(2-磺基甲基)-天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺基乙基)-天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺基甲基)-谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺基乙基)-谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、α-丙氨酸-N,N-二乙酸(α-ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、磺胺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)和磺基甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、N-(2-羟乙基)-乙二胺-N,N',N-三乙酸酯(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸)(ATMP)及其组合和盐。其他示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如WO 09/102854、US 5977053中。

[0169] 4.漂白体系

[0170] 洗涤剂可含有0-50重量％、例如约0.1％至约25％的漂白体系。可以利用本领域已知用于洗衣洗涤剂的任何漂白体系。合适的漂白体系组分包括漂白催化剂、光漂白剂、漂白

活化剂、过氧化氢源例如过碳酸钠和过硼酸钠、预制的过酸及其混合物。合适的预制过酸包括但不限于过氧羧酸和盐、过碳酸和盐、过亚氨酸和盐、过氧单硫酸和盐例如Oxone(R)，及其混合物。漂白体系的非限制性例子包括基于过氧化物的漂白体系，其可包含例如无机盐，包括碱金属盐，例如过硼酸(通常为单或四水合物)、过碳酸、过硫酸、过磷酸、过硅酸的钠盐，与形成过酸的漂白活化剂的组合。术语漂白活化剂在本文中是指与过氧漂白剂如过氧化氢反应形成过酸的化合物。由此形成的过酸构成活化的漂白剂。在此使用的合适的漂白活化剂包括属于酯、酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。合适的例子是四乙酰基乙二胺(TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰基)氧基]苯磺酸钠(ISONOBS)、二过氧十二烷酸、4-(十二烷酰氧基)苯磺酸盐(LOBS)、4-(癸酰氧基)苯磺酸盐、4-(癸酰氧基)苯甲酸酯(DOBS)、4-(壬酰氧基)-苯磺酸盐(NOBS)和/或WO98/17767中公开的那些。在EP624154中公开了一种特定的目标漂白活化剂，特别优选该家族是乙酰基柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC或短链甘油三酯如三醋精具有环境友好的优点，因为它最终降解成柠檬酸和醇。此外，乙酰基柠檬酸三乙酯和三醋精在储存时在产品中具有良好的水解稳定性，并且它是有效的漂白活化剂。最后，ATC为洗衣添加剂提供了良好的助洗能力。或者，所述漂白体系可包含例如酰胺、酰亚胺或砜类型的过氧酸。所述漂白体系也可以包含过酸，例如6-(邻苯二甲酰亚氨基)过氧己酸(PAP)。所述漂白体系也可包含漂白催化剂。在一些实施方式中，所述漂白组分可以是选自具有下式的有机催化剂及其混合物的有机催化剂：

[0171]



[0172] (iii)；其中每个R^1独立地是含有9至24个碳的支链烷基基团或含有11至24个碳的直链烷基基团，优选每个R^1独立地是含有9至18个碳的支链烷基基团或含有11至18个碳的直链烷基基团，更优选每个R^1独立地选自2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、正十二烷基、正十四烷基、正十六烷基、正十八烷基、异壬基、异癸基、异十三烷基和异十五烷基。其他示例性漂白体系在例如WO2007/087258、WO2007/087244、WO2007/087259和WO2007/087242中描述。合适的光漂白剂可以是例如磺化的锌酞菁。

[0173] 5.聚合物

[0174] 所述洗涤剂可含有0-10重量%、例如0.5-5%、2-5%、0.5-2%或0.2-1%的聚合物。可以利用本领域已知的用于洗涤剂的任何聚合物。聚合物可以如同上文所述的共助洗剂那样起作用，或者可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油脂清洁和/或消泡性质。一些聚合物可多于一种上述性质和/或多于一种下述基序。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚(乙烯基吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化聚(乙烯亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)和聚羧酸盐如PAA、PAA/PMA、聚天冬氨酸，以及甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物、疏水改性的CMC(HM-CMC)和有机硅、对苯二甲酸与低聚二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)与聚(对苯二甲酸乙氧酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯基吡啶-N-氧化物)(PVPO或PVPNO)和聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑(PVPVI)。其他示例性聚合物包括磺化多羧酸酯、聚环氧乙烷和聚

环氧丙烷(PEO-PPO)和二季铵乙氧基硫酸酯。其他示例性聚合物公开在例如WO 2006/130575中。还考虑了上述聚合物的盐。

[0175] 6.织物调色剂

[0176] 本发明的洗涤剂组合物也可以包含织物调色剂,例如染料或颜料,其当配制在洗涤剂组合物中时,当织物与包含所述洗涤剂组合物的洗涤液相接触时可沉积在所述织物上并由此通过吸收/反射可见光而改变所述织物的色调。荧光增白剂发射至少一些可见光。相反,织物调色剂在它们吸收至少一部分可见光谱时改变表面的色调。合适的织物调色剂包含染料和染料-粘土结合物,并且也可包含颜料。合适的染料包括小分子染料和聚合物染料。合适的小分子染料包括选自落入直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红的颜色指数(C.I.)分类内的染料或其混合物的小分子染料,例如,如WO2005/03274、WO2005/03275、WO2005/03276和EP1876226(在此通过引用并入)中所述。所述洗涤剂组合物优选包含约0.00003wt%至约0.2wt%、约0.00008wt%至约0.05wt%、或甚至约0.0001wt%至约0.04wt%的织物调色剂。所述组合物可包含0.0001wt%至0.2wt%的织物调色剂,当所述组合物是单位剂量小袋的形式时,这可能是特别优选的。合适的调色剂也公开于例如WO 2007/087257和WO2007/087243中。

[0177] 7.辅助材料

[0178] 也可以利用本领域已知的用于洗衣洗涤剂的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括抗腐蚀剂、抗收缩剂、抗污垢再沉积剂、抗皱剂、杀菌剂、粘合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂、染料、酶稳定剂(包括硼酸、硼酸盐、CMC、和/或多元醇例如丙二醇)、织物调理剂包括粘土、填料/加工助剂、荧光增白剂/光学增亮剂、泡沫促进剂、泡沫(泡沫)调节剂、香料、污垢悬浮剂、软化剂、抑泡剂、褐变抑制剂和芯吸剂,单独地或组合地。可以利用本领域已知用于洗衣洗涤剂的任何成分。这样的成分的选择完全在技术人员的技能范围内。

[0179] 分散剂:本发明的洗涤剂组合物也可含有分散剂。特别是粉末状洗涤剂可包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括均聚或共聚酸或它们的盐,其中多羧酸包含至少两个被不多于两个碳原子彼此分开的羧基基团。合适的分散剂例如描述于Marcel Dekker,Inc.的粉末状洗涤剂(Powdered Detergents),表面活性剂科学系列第71卷(Surfactant science series volume 71)中。

[0180] 染料转移抑制剂:本发明的洗涤剂组合物也可包含一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺N-氧化物聚合物、N-乙烯基吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯基噁唑烷酮和聚乙烯基咪唑,或其混合物。当存在于主题组合物中时,所述染料转移抑制剂的存在水平可以为组合物重量的约0.0001%至约10%、约0.01%至约5%或甚至约0.1%至约3%。

[0181] 荧光增白剂:本发明的洗涤剂组合物将优选还含有可以着色被清洁的物品的其他组分,例如荧光增白剂或光学增亮剂。当存在时,所述增亮剂优选为约0.01%至约0.5%的水平。适用于衣物洗涤剂组合物的任何荧光增白剂均可用于本发明的组合物中。最常用的荧光增白剂是属于二氨基芪-磺酸衍生物、二芳基吡唑啉衍生物和双苯基-二苯乙烯基衍生物的那些。二氨基芪-磺酸衍生物类型的荧光增白剂的例子包括以下的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸酯;4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸酯;4,4'-双-(2-苯胺基-4-(N-甲基-N-2-羟基-乙氨基)-

s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸酯,4,4'-双-(4-苯基-2,1,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸酯;4,4'-双-(2-苯胺基-4-(1-甲基-2-羟基-乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸酯和2-(芪基-4″-萘基-1.,2':4,5)-1,2,3-三唑-2″-磺酸酯。优选的荧光增白剂是Tinopal DMS和Tinopal CBS,可得自瑞士Basel的Ciba-Geigy AG。Tinopal DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪二磺酸酯的二钠盐。Tinopal CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)二磺酸酯的二钠盐。还优选荧光增白剂是可商购的Parawhite KX,由印度Mumbai的Paramount Minerals and Chemicals提供。适用于本发明的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡唑啉和7-烷基氨基香豆素。合适的荧光增白剂水平包括从约0.01、0.05、约0.1或甚至约0.2wt%的较低水平至0.5或甚至0.75wt%的较高水平。

[0182] 污垢释放聚合物:本发明的洗涤剂组合物也可包含一种或多种污垢释放聚合物,其有助于从织物例如棉和聚酯基织物上除去污垢,特别是从聚酯基织物上除去疏水污垢。所述污垢释放聚合物可以是例如非离子或阴离子型对苯二甲酸酯基聚合物、聚乙烯基己内酰胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺,参见例如Marcel Dekker,Inc.的粉末状洗涤剂(Powdered Detergents),表面活性剂科学系列71卷(Surfactant science series 71)中的第7章。另一种类型的污垢释放聚合物是两亲性烷氧基化油脂清洁聚合物,其包含核心结构和连接于该核心结构的多个烷氧基化物基团。所述核心结构可包含聚亚烷基亚胺结构或聚链烷醇胺结构,如WO2009/087523中详细描述的(在此通过引用并入)。此外,无规接枝共聚物是合适的污垢释放聚合物。合适的接枝共聚物在WO 2007/138054、WO 2006/108856和WO 2006/113314(在此通过引用并入)中有更详细的描述。其他污垢释放聚合物是取代的多糖结构,尤其是取代的纤维素结构,例如改性纤维素衍生物,例如EP 1867808或WO 2003/040279中描述的那些(两者均在此通过引用并入)。合适的纤维素性聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺及其混合物。合适的纤维素聚合物包括阴离子改性纤维素、非离子改性纤维素、阳离子改性纤维素、两性离子改性纤维素,及其混合物。合适的纤维素性聚合物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素,及其混合物。

[0183] 抗再沉积剂:本发明的洗涤剂组合物也可包含一种或多种抗再沉积剂,例如羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚氧乙烯和/或聚乙二醇(PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸与马来酸的共聚物以及乙氧基化聚乙烯亚胺。上面在污垢释放聚合物下描述的纤维素基聚合物也可以起抗再沉积剂的作用。

[0184] 其他合适的辅助材料包括但不限于,用于液体洗涤剂和/或结构弹性化剂的抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、粘合剂、载剂、染料、酶稳定剂、织物柔软剂、填料、泡沫调节剂、水溶助剂、香料、颜料、抑泡剂、溶剂和结构剂。

[0185] 在本发明的一个进一步的实施方式中,所述洗涤剂组合物为棒剂、均质片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个隔室的小袋剂、常规或致密粉末剂、颗粒剂、糊剂、凝胶剂或者常规、致密或浓缩液体剂。在一个实施方式中,所述洗涤剂组合物可以是衣物洗涤剂组合物,优选为液体或固体衣物洗涤剂组合物。存在许多洗涤剂制剂形式例如层(相同或不同的相)、小袋,以及用于机器配料单元的形式。

[0186] 小袋可以构造为单隔室或多隔室。它可以是适合于保持所述组合物、例如在接触水之前不允许从小袋中释放组合物的的任何形式、形状和材料。所述小袋由包围内部容积

的水溶性薄膜制成。所述内部容积可以划分成小袋的隔室。优选的膜是聚合材料，优选形成为膜或片的聚合物。优选的其聚合物、共聚物或衍生物是所选择的聚丙烯酸酯，以及水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯，最优选聚乙烯醇共聚物和羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地，所述膜例如PVA中的聚合物水平为至少约60％。优选的平均分子量将通常为约20,000至约150,000。膜也可以是包含可水解降解和水溶性聚合物掺合物例如聚丙交酯和聚乙烯醇(已知商品名为M8630，由美国美印第安纳州Gary的Chris Craft In.Prod.出售)加上增塑剂如甘油、乙烯甘油、丙二醇、山梨糖醇及其混合物的掺合组合物。所述小袋可包含由水溶性薄膜分开的固体衣物洗涤剂组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或部分组分。液体组分的隔室的组成可以与含有固体的隔室不同。参考：(US2009/001 1970A1)。

[0187] 洗涤剂成分可以通过水溶性小袋中的隔室或片剂中的不同层彼此物理分离。从而可以避免组分之间的负储存相互作用。各隔室的不同溶解规律也可以产生选定的组分在洗涤溶液中的延迟溶解。

[0188] 不是按单位配量的液体或凝胶洗涤剂可以是含水的，通常含有至少20重量％和至多95％的水，例如至多约70％的水，至多约65％的水，至多约50％的水，至多约45％的水，至多约35％的水。其他类型的液体，包括但不限于，烷醇、胺、二醇、醚和多元醇，可以包含在含水液体或凝胶中。含水液体或凝胶洗涤剂可含有0-30％的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以是不含水的。

[0189] 本发明的洗涤剂组合物可以提供成洗衣皂条的形式，并用于手洗衣物、织物和/或纺织品。术语洗衣皂条包括洗衣条、肥皂条、组合条(combo bars)、合成洗涤剂条和洗涤剂条。条的类型通常在它们含有的表面活性剂的类型方面有所不同，并且术语洗衣皂条包括含有来自脂肪酸的皂和/或合成皂的那些皂条。洗衣皂条具有在室温下是固体而不是液体、凝胶或粉末的物理形式。术语“固体”定义为不随时间显著变化的物理形式，即，如果将固体物体(例如洗衣皂条)放置在容器内，则固体物体不会变化以填充其所处的容器。所述条是通常呈条形式的固体，但也可以是其他固体形状，例如圆形或椭圆形。

[0190] 所述洗衣皂条可含有一种或多种其他酶、蛋白酶抑制剂例如肽醛(或亚硫酸氢盐加合物或半缩醛加合物)、硼酸、硼酸盐、硼砂和/或苯基硼酸衍生物例如4-甲酰基苯基硼酸、一种或多种皂或合成表面活性剂、多元醇例如甘油、pH控制化合物如脂肪酸、柠檬酸、乙酸和/或甲酸、和/或一价阳离子和有机阴离子的盐，其中所述一价阳离子可以是例如Na^+、K^+或NH_4^+，以及所述有机阴离子可以是例如甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐或乳酸盐，使得一价阳离子和有机阴离子的盐可以是例如甲酸钠。

[0191] 所述洗衣皂条也可含有络合剂如EDTA和HEDP、香料和/或不同类型的填料、表面活性剂例如阴离子合成表面活性剂、助洗剂、聚合污垢释放剂、洗涤剂螯合剂、稳定剂、填料、染料、着色剂、染料转移抑制剂、烷氧基化聚碳酸酯、抑泡剂、结构剂、粘合剂、浸出剂、漂白活化剂、粘土去污剂、抗再沉积剂、聚合分散剂、增亮剂、织物柔软剂、香料和/或本领域已知的其他化合物。

[0192] 所述洗衣皂条可以在常规的洗衣皂条制造设备中加工，所述制造设备例如但不限于：混合器，压条机例如两级真空压条机，挤出机，切断机，徽标冲压机，冷却隧道和包装机。本发明不限于通过任何单一的方法制备洗衣皂条。本发明的预混物可以在过程的不同阶段

添加到到皂中。例如，可以制备含有皂、酶、任选的一种或多种附加的酶、蛋白酶抑制剂以及一价阳离子和有机阴离子的盐的预混物，然后将所述混合物压条。所述酶和任选的附加酶可以与蛋白酶抑制剂同时例如以液体形式加入。除混合步骤和压条步骤之外，所述过程还可包括研磨、挤出、切断、冲压、冷却和/或包裹的步骤。

[0193] 本发明还涉及如本文公开的洗涤剂组合物的不同用途，例如用于降解甘露聚糖和用于洗衣过程。

[0194] 本发明还涉及一种从表面除去污渍的方法，所述方法包括使所述表面与如本文公开的洗涤剂组合物相接触。

[0195] 本发明还涉及一种降解甘露聚糖的方法，所述方法包括将如本文公开的洗涤剂组合物应用于甘露聚糖，优选地，其中所述甘露聚糖在纺织品的表面上。通过降解附着在纺织品或织物上的甘露聚糖，与甘露聚糖结合的污物或污垢被释放并且不能再次与甘露聚糖或甘露聚糖污渍结合。

[0196] 在本发明的一个实施方式中，包含在本发明的洗涤剂组合物中的甘露聚糖酶在45℃至65℃的温度范围内具有至少30％的相对活性。提供在高于环境温度的温度下和在酸性pH中保持活性的甘露聚糖酶对于需要在这样的条件下降解甘露聚糖的应用是有利的。

[0197] 在一个实施方式中，包含在本发明洗涤剂组合物中的甘露聚糖酶随机水解内切-β-1,4-甘露糖苷键。

[0198] 在一个实施方式中，包含在本发明洗涤剂组合物中的甘露聚糖酶可从细菌来源获得或衍生。

[0199] 在一个实施方式中，包含在本发明洗涤剂组合物中的甘露聚糖酶与至少一种其他多肽融合，从而形成融合多肽。除甘露聚糖酶的活性外，所述融合多肽或其他多肽还可具有其他催化或结合活性。在一个实施方式中，所述其他多肽包含碳水化合物结合模块或由其组成，所述碳水化合物结合模块任选地是源自于与甘露聚糖酶相同或不同的生物体的另一种蛋白或酶的片段。甘露聚糖酶可以通过接头与所述其他多肽连接。

[0200] 实施例

[0201] 提供以下实施例以说明本发明的各个方面。它们不意欲限制本发明，本发明由所附权利要求限定。

[0202] 实施例1:筛选

[0203] 为了鉴定新的β-1,4-甘露聚糖酶，筛选了公共数据库(NCBI,EBI)和选定的专有和公共基因组。本工作中使用的所有专有和公共基因组示于表1。将所有的命中进行分组，最后基于相互之间的系统发育距离选择15个细菌来源基因在芽孢杆菌中进行克隆(表2)。

[0204] 表1:用于筛选β-1,4-甘露聚糖酶的专有和公共基因组列表

[0205]

物种	菌株	来源
短小芽孢杆菌	MS8	ABE
木聚糖兼性芽胞杆菌	NBRC 15112	NCBI
解半纤维素芽胞杆菌	JCM 9152	NCBI
克劳氏芽孢杆菌	KSM-K16	NCBI

[0206]

解淀粉芽孢杆菌	RH1330	ABE
土壤枝芽孢杆菌	PL205	NCBI

[0207] 表2:选择用于在芽孢杆菌中克隆的基因列表

[0208]

序列 ID	物种	GH 家族	长度
orf2511	解淀粉芽孢杆菌	26	360 aa
AXY_08250	木聚糖兼性芽胞杆菌	5	497 aa
Man7	解半纤维素芽胞杆菌	5	490 aa
T1Z249.2	尼氏芽孢杆菌	5	369 aa
Man6	克劳氏芽孢杆菌	5	324 aa
Q9EYQ3	解纤梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)	5	424 aa
YdhT	解纤维素芽胞杆菌(*Bacillus cellulosilyticus*)	26	1183 aa
V5X1N9	多粘类芽抱杆菌	5	588 aa
Q9ZI87	嗜热脂肪土芽孢杆菌	5	694 aa
Q49HI4	环状芽孢杆菌	5	327 aa
orf0659	短小芽孢杆菌	5	376 aa
JCM9152_1090	解半纤维素芽胞杆菌	26	489 aa
D3HC62	没食子酸链球菌(*Streptococcus gallolyticus*)	5	487 aa
A0LSH9	解纤维热酸菌(*Acidothermus cellulolyticus*)	5	763 aa
Man14	土壤枝芽孢杆菌	5	482 aa

[0209] 实施例2:细菌甘露聚糖酶在芽孢杆菌中的克隆

[0210] 除非另有说明,否则包括DNA操作和转化在内的分子生物学方法如Sambrook和Russell(2001)以及Harwood和Cutting(1990)中所述进行。使用Pfx Accu Prime聚合酶(Invitrogen)通过PCR扩增基因man6、man7和man14。根据制造商的说明书进行PCR。以下PCR条件用于构建表达质粒:94℃初始变性120秒,然后在94℃下进行15秒的35个循环,在下面50/55℃之一下退火30秒,在68℃下延伸110/290秒,在68℃下最后延伸10分钟。为了扩增man7,使用解半纤维素芽孢杆菌JCM 9152的基因组DNA。man6和man14作为没有密码子优化的合成基因订购(Eurofins MWG,德国)。用于克隆的引物的序列示于表3中。用于杂交的突出端有下划线。

[0211] 表3:用于扩增man6、man7和man14的引物列表

[0212]

模板	引物	bp	序列	Seq ID No
合成基因 man6	Man6_1	39	CAACCGCCTCTGCAGCTTATGCACAAAACGGATTTCACG	1
合成基因 man6	Man6_2	39	CGGTATATCTCTGTCTTAATCACTCTTAAGCCCATTTTC	2
gDNA 解半纤维素芽胞杆菌	Man7_1	37	CAACCGCCTCTGCAGCTTCTGATGGTCATAGCCAAAC	3
gDNA 解半纤维素芽胞杆菌	Man7_2	36	CGGTATATCTCTGTCTTATTGGATTGTTACATGATC	4
合成基因 man14	Man14_1	40	CAACCGCCTCTGCAGCTGCAAGCGGGTTTTATGTAAACGG	5
合成基因 man14	Man14_2	39	CGGTATATCTCTGTCTTATTTAATGGTAACGTTATCAAC	6
pUB110 衍生物	Vec_1	17	AGCTGCAGAGGCGGTTG	7
pUB110 衍生物	Vec_2	21	GACAGAGATATACCGACAGTG	8

[0213] 通过使用NEBuilder®高保真DNA组装主混合物(NEB,Frankfurt),将基因克隆到标准载体pEV1pEV1(图1)中,pUB110衍生物包括来自地衣芽孢杆菌的启动子PaprE和来自解淀粉芽孢杆菌的木聚糖酶信号肽。载体:插入片段比例1:3用于克隆。片段的总量是在总体积20μl中0.2pmol。将样品在50℃下温育40分钟。为了构建目的,通过如Zhang&Zhang 2011中所述,在枯草芽孢杆菌SCK6中的诱导感受态来转化表达质粒。将转化的细胞在补充有10mg/l卡那霉素的LB(Luria-Bertani)平板上铺板。将平板在37℃温育20小时。挑取出突起的集落,用QiaPrep微量制备试剂盒(Qiagen,Hilden)分离质粒。根据制造商对革兰氏阳性质粒制剂的推荐进行分离程序。通过Sanger测序(GATC,德国)对插入片段进行测序,并展现对应于甘露聚糖酶Man6、Man7和Man14的成熟部分的DNA序列。使用ClustalW序列比对(Thompson等人1994)进行序列比较。最后,通过电穿孔将表达质粒转化到合适的芽孢杆菌生产菌株中。芽孢杆菌生产菌株在含有20g/l胰蛋白胨、10g/l酵母提取物、10g NaCl和2M蔗糖的电穿孔培养基中生长,并在OD(600nm)为0.4时收获10ml。用含有0.272M蔗糖、1mM $MgCl_2$和7mM KH_2PO_4的电穿孔缓冲液洗涤细胞,最后重悬于250μl电穿孔缓冲液中。使用以下条件进行电穿孔:1.2kV,150Ω,50μF。之后添加1ml电穿孔培养基,并将细胞在37℃温育3小时。将细胞在补充有20mg/l卡那霉素的LB平板上铺板,并在37℃温育18小时。如上所述验证克隆并用于产生用于分析测试的材料。因此,以在蛋白质诱导条件下标准表达来接种菌株,并在37℃温育30小时。收获上清液并用于分析和应用测试。基因和酶特征如表4和5所示。

[0214] 表4.对来自克劳氏芽胞杆菌KSM-K16、解半纤维素芽胞杆菌JCM 9152和土壤枝芽孢杆菌PL205的GH5家族甘露聚糖酶编码基因的概述

[0215]

基因	包括SP在内的长度(bp)	SEQ ID NO
man6	975	9
man7	1473	13
man14	1449	17

[0216] 表5.对来自克劳氏芽胞杆菌KSM-K16、解半纤维素芽胞杆菌JCM 9152和土壤枝芽孢杆菌PL205的GH5家族甘露聚糖酶编码基因的推断氨基酸序列的概述

[0217]

Man 蛋白	AA 的数量	SS 的长度	CBM	预测的 MW (Da)，不包括 ss	预测的 pl，不包括 ss	SEQ ID NO
Man6	324	35		31.84	4.56	11
Man7	490	21	是	51.36	4.81	15
Man14	482	16	是	50.68	4.35	19

[0218] 实施例3:细菌甘露聚糖酶man6和man7在里氏木霉中的PCR克隆

[0219] 标准分子生物学方法用于DNA的分离和酶处理(例如,质粒DNA的分离,DNA的消化以产生DNA片段)、大肠杆菌转化、测序等。使用的基本方法或是如酶、试剂或试剂盒制造商所述,或是如标准分子生物学手册、例如Sambrook和Russell(2001)中所述。基因组DNA的分离如Raeder和Broda(1985)详细描述的那样进行。

[0220] 还分别克隆了来自克劳氏芽孢杆菌和解半纤维素芽孢杆菌的man6和man7,以在里氏木霉中表达。使用具有里氏木霉密码子优化的合成基因对所述基因进行PCR克隆。使用PCR除去编码man6和man7的信号肽的DNA序列,并创建新的克隆位点。引物的序列示于表6(SEQ ID NO:21-24)。

[0221] 表6.用作PCR引物以扩增解半纤维素芽孢杆菌和克劳氏芽孢杆菌甘露聚糖酶基因的寡核苷酸

[0222]

模板(合成的)DNA 来自	寡核苷酸	长度(bp)	序列[a]	SEQ ID NO:

[0223]

解半纤维素芽孢杆菌	BMAN1	60	5'-AGTCAATCGCGACAAGCGCCAGACCCACTCGGGCTTCTACATCGAGGGCTCGACGCTCTA-3' (s)	21
解半纤维素芽孢杆菌	BMAN2	46	5'-CGCGCCGGATCCTTACTGGATCGTGACGTGGTCCAGGTAGATGGCG-3' (as)	22
克劳氏芽孢杆菌	BMAN3	60	5'-AGTCAATCGCGACAAGCGCCAGAACGGCTTCCACGTCTCCGGCACGGAGCTCCTGGACAA-3' (s)	23
克劳氏芽孢杆菌	BMAN4	50	5'-CGCGCCGGATCCTTAGTCGCTCTTCAGGCCGTTCTCGCCGTAGACGATGCG-3' (as)	24

[0224] [a]括号中的"s"=有义链,"as"=反义链。

[0225] 用表6中所述的引物并使用合成的DNA作为反应中的模板,通过PCR扩增所述基因。克劳氏芽胞杆菌man6和解半纤维素芽胞杆菌man7的PCR混合物各含有1x用于Phusion HF聚合酶的HF缓冲液(NEB/BioNordika,芬兰)、0.2mM dNTP混合物(Thermo Fisher Scientific,芬兰)、每种引物1μM、3%DMSO(Thermo Fisher Scientific)、1单位的Phusion高保真聚合酶(NEB/BioNordika,芬兰)和50ng相应的质粒DNA。以下PCR反应的条件如下:98℃初始变性30秒,然后在98℃下进行10秒的28个循环,在下面45/50/55/60℃之一下退火30秒,在72℃下延伸45秒,在72℃下最后延伸7分钟。

[0226] 表6中描述的引物组合产生具有预期大小的特定DNA产物。用GenJet凝胶提取试剂盒(Thermo Fisher Scientific)根据制造商的说明从琼脂糖凝胶中分离PCR产物,用NruI和BamHI限制酶(Thermo Fisher Scientific)消化,并克隆到用NruI和BamHI切割的表达载体中。将连接混合物转化到大肠杆菌XL1-Blue(AH Diagnostics)中并在含有50-100μg/ml氨苄青霉素的LB(Luria-Bertani)平板上铺板。从所述平板收集几个大肠杆菌菌落,用GenJet质粒微量制备试剂盒(Thermo Fisher Scientific)分离DNA。使用限制性消化筛选阳性克隆。对编码克劳氏芽胞杆菌man6和解半纤维素芽胞杆菌man7GH5甘露聚糖酶且没有自身信号肽编码序列的基因进行测序,并将质粒分别命名为pALK4274和pALK4273(详见实施例6)。

[0227] 实施例4:合成的细菌甘露聚糖酶man14的克隆

[0228] 标准分子生物学方法用于DNA的分离和酶处理(例如,质粒DNA的分离,DNA的消化以产生DNA片段)、大肠杆菌转化、测序等。使用的基本方法或是如酶、试剂或试剂盒制造商所述,或是如标准分子生物学手册、例如Sambrook和Russell(2001)中所述。基因组DNA的分离如Raeder和Broda(1985)详细描述的那样进行。

[0229] 还将来自土壤枝芽孢杆菌的甘露聚糖酶基因man14克隆用于木霉表达。来自土壤枝芽孢杆菌的GH5家族甘露聚糖酶Man14的编码基因作为具有里氏木霉密码子优化的合成构建体从GenScript订购。

[0230] 将从GenScript获得的包含man14基因的质粒DNA重悬于无菌水中,用NruI和BamHI限制酶(Thermo Fisher Scientific)根据制造商的说明书消化,并克隆到用NruI和BamHI切割的表达载体中。将连接混合物转化到大肠杆菌XL1-Blue(AH Diagnostics)中并在含有50-100μg/ml氨苄青霉素的LB(Luria-Bertani)平板上铺板。从所述平板收集几个大肠杆菌菌落,用GenJet质粒微量制备试剂盒(Thermo Fisher Scientific)分离DNA。阳性克隆使用限制性消化来筛选,并且它们显示出含有预期大小的插入片段。对土壤枝芽孢杆菌属man14与表达质粒的融合位点进行测序,并将所述质粒命名为pALK4414(详情参见实施例6)。

[0231] 实施例5:芽孢杆菌中重组细菌GH5甘露聚糖酶蛋白的产生

[0232] 构建表达质粒用于产生来自克劳氏芽孢杆菌、解半纤维素芽孢杆菌和土壤枝芽孢杆菌的重组GH5甘露聚糖酶(Man6、Man7和Man14)蛋白。构建的表达质粒列于表7中。将没有自声信号序列的重组GH5基因(man6、man7和man14)与地衣芽孢杆菌PaprE启动子和解淀粉芽孢杆菌木聚糖酶信号肽融合。通过强终止子确保转录终止,并使用卡那霉素抗性标记选择转化体。转化如实施例2中所述进行。

[0233] 表7.被构建成在适当的芽孢杆菌表达菌株中产生来自克劳氏芽孢杆菌、解半纤维素芽孢杆菌和土壤枝芽孢杆菌的Man6、Man7和Man14重组蛋白的表达质粒

[0234]

甘露聚糖酶(GH5)蛋白	表达质粒
Man6	pEV1 Man6
Man7	pEV1 Man7
Man14	pEV1 Man14

[0235] 从摇瓶培养的培养上清液中分析转化体的GH5产生。将所述转化体从LB平板接种到含有2%葡萄糖、6%玉米浆干粉、1.3% $(NH_4)_2HPO_4$、0.05% $MgSO_4 \times 7H_2O$和0.5% $CaCl_2$的摇瓶中。将pH调节至pH 7.5。在转化体在37℃、180rpm下生长30小时后,从培养物上清液中分

析它们的GH5蛋白质产量。通过SDS-PAGE与随后的考马斯(Coomassie)染色分析重组蛋白的异源产生。选择最佳生产转化体在实验室规模的生物反应器中培养。将所述转化体在生物反应器中在蛋白质诱导条件下37℃培养并继续饲养直至达到合适的收率。通过离心或过滤回收上清液用于应用测试。

[0236] 实施例6:在里氏木霉中产生重组细菌GH5甘露聚糖酶蛋白

[0237] 构建表达质粒用于在里氏木霉中产生来自克劳氏芽孢杆菌、解半纤维素芽孢杆菌和土壤枝芽孢杆菌的重组GH5甘露聚糖酶(Man6、Man7和Man14)蛋白(参见实施例3和4)。构建的表达质粒列于表8中。用里氏木霉cel6A/cbh2CBM载体和接头将没有自身信号序列的重组GH5基因(man6、man7和man14)与里氏木霉cel7A/cbh1启动子融合,然后与Kex2蛋白酶识别位点融合。通过里氏木霉cel7A/cbh1终止子确保转录终止,并如Paloheimo等人所述(2003年),使用构巢曲霉(A.nidulans)amdS标记基因用于选择转化体。在NotI消化后从载体骨架分离线性表达盒(图2)并转化到里氏木霉原生质体中。使用的宿主菌株不产生四种主要的里氏木霉纤维素酶(CBHI,CBHII,EGI,EGII)中的任何一种。转化如Penttila等人(1987)中所述加以Karhunen等人所描述的修改(1993)进行,选择乙酰胺酶作为唯一的氮源(amdS标记基因)。在选择平板上通过单个分生孢子纯化转化体,然后将它们在PD上形成孢子。

[0238] 表8.被构建成在里氏木霉中产生来自克劳氏芽孢杆菌、解半纤维素芽孢杆菌和土壤枝芽孢杆菌的Man6、Man7和Man14重组蛋白的表达质粒。表达盒的总体结构如图2所述。

[0239]

露聚糖酶(GH5)蛋白	表达质粒	表达盒[a]
Man6	pALK4274	7.0kb NotI
Man7	pALK4273	7.5kb NotI
Man14	pALK4414	7.6kb NotI

[0240] [a]通过使用NotI消化从载体骨架分离用于里氏木霉转化的表达盒。

[0241] 从摇瓶培养的培养上清液分析转化体的甘露聚糖酶产生。将转化体从PD斜面接种到含有50ml用5%KH_2PO_4缓冲的复合乳糖基纤维素酶诱导培养基(Joutsjoki等人,1993)的摇瓶中。转化体在30℃、250rpm下生长7天后,从培养物上清液中分析它们的GH5蛋白产生。通过SDS-PAGE与随后的考马斯(Coomassie)染色分析重组蛋白的异源产生。选择最佳生产转化体在实验室规模的生物反应器中培养。在典型的喜中温真菌培养温度和微酸性条件下,在蛋白诱导条件下,在生物反应器中分批或通过另外的饲养类型的方法培养所述转化体。连续培养直至培养基糖耗尽或直至达到合适的收率。通过离心或过滤回收上清液用于应用测试。

[0242] 实施例7:通过DNS方法测定半乳甘露聚糖酶活性

[0243] 甘露聚糖酶活性(MNU)按50℃和pH 7.0下5分钟内从半乳甘露聚糖(0.3w/w%)释放的还原糖测量。使用二硝基水杨酸通过分光光度法确定释放的还原性碳水化合物的量。如下制备所述测定中使用的底物(0.3w/w%):0.6g刺槐豆胶(Sigma G-0753)溶于使用加热磁力搅拌器为约80℃的50mM柠檬酸钠缓冲液pH 7(或柠檬酸盐磷酸盐缓冲液pH 7)中,并加热至沸点。将溶液在冷室(2-8℃)中冷却并使其在连续搅拌下溶解过夜,通过离心除去不溶残渣。之后,通过缓冲液将溶液填充至200ml。将底物冷冻保存并在沸水浴中加热融化至约80℃,冷却至室温并在使用前小心混合。通过将50g的3,5-二硝基水杨酸(Sigma D-550)溶

解在约4升水中来制备所述测定中使用的DNS试剂。在连续磁力搅拌下，逐渐添加80.0g的NaOH并使其溶解。在连续搅拌下分小份添加1500g量的罗谢尔盐(Rochelle Salt)(酒石酸盐钾钠，Merck 8087)。将可能已经小心温热至最高温度45℃的溶液冷却至室温并填充至5000ml。之后，将其通过Whatman 1号滤纸过滤并在室温下储存在深色瓶中。首先通过向两个试管中的每一个添加1.8ml底物溶液来开始反应，并使其在50℃下平衡5分钟，之后将200μl适当稀释的酶溶液添加到其中一个试管，用涡旋混合器充分混合并在50℃温育正好5分钟。酶空白不需要平衡或温育。通过向两个试管中添加3.0ml DNS试剂并混合来终止反应。将200μl样品溶液添加到酶空白管中。将这两个管置于沸水浴中。煮沸正好5分钟后，将所述试管置于冷却水浴中并使其冷却至室温。在540nm处针对酶空白测量样品的吸光度，并从校准曲线读取活性并乘以稀释因子。合适的稀释样品产生0.15-0.4的吸光度差异。通过将360mg甘露糖(SigmaM-6020，储存在干燥器中)溶解在测定缓冲液中并稀释成含有3、6、10和14μmol/ml甘露糖的溶液，从20mM甘露糖原液制备标准曲线。除了在50℃下温育之外，标准品的处理与样品相同。在540nm处针对试剂空白(含有缓冲液而不是甘露糖标准稀释液)测量吸光度。为每个测定系列构建校准曲线。一个甘露聚糖酶单位(MNU)定义为在测定条件下，在1秒内产生的还原性碳水化合物具有相当于来自半乳甘露聚糖的1nmol甘露糖的还原能力的酶量(1MNU＝1nkat)。

[0244] 实施例8:Man6甘露聚糖酶的纯化

[0245] 通过在4℃下以4000g离心10分钟，从发酵培养基中除去细胞和固体。10ml上清液用于蛋白质纯化。将样品通过0.44μm PVDF膜(Millex-HV，Merck Millipore Ltd，Carrigtwohill，IRL)过滤。将滤液加载到在20mM HEPES pH 7中平衡的HiPrep 26/10脱盐柱(GE Healthcare，Uppsala，瑞典)上。然后将脱盐的样品加载到用20mM HEPES pH7预平衡的5ml HiTrap Q HP柱(GE Healthcare，Uppsala，瑞典)上。样品加载后，用相同的缓冲液20ml洗涤柱子。用在15个CV中的线性盐梯度20mM HEPES、500mM NaCl pH7洗脱蛋白质。收集5ml的级分并在SDS-PAGE上分析。将含有靶蛋白的级分合并，并使用Vivaspin 20、10kDa MWCO超滤装置(GE Healthcare)浓缩至2ml。所述浓缩的样品使用用20mM MES，200mM NaCl pH 6.5平衡的Superdex 7526/60凝胶过滤柱进一步分级。收集2ml的级分并通过SDS-PAGE分析。将含有纯甘露聚糖酶的级分合并。其他甘露聚糖酶使用相同的方案纯化，但在脱盐和离子交换步骤中改变缓冲液组成。缓冲液组合物示于表9中。

[0246] 表9.用于离子交换色谱的缓冲液

[0247]

甘露聚糖酶	用于离子交换色谱的缓冲液
Man6	20mM HEPES pH 7
Man7	20mM HEPES pH 7
Man14	20mM MES pH 6

[0248] 纯化的样品纯度超过95％。

[0249] 使用UV吸光度280nm测量来确定纯化样品的酶含量。通过使用ExPASy服务器http://web.expasy.org/protparam/，根据所述酶的氨基酸序列计算每种甘露聚糖酶的激发系数(Gasteiger E等人2005)。纯化样品的酶活性(MNU)如实施例7中所述按还原糖的释放进行测量。通过将纯化样品的MNU活性除以纯化酶的量，来计算甘露聚糖酶的比活性(MNU/mg)。获得的值用于计算实施例10和11中使用的酶剂量。

[0250] 甘露聚糖酶的pH曲线

[0251] 使用来自Megazyme的β-甘露糖酶片剂测定天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖(T-MNZ 11/14),对所建议的方案进行少许修改,确定纯化的甘露聚糖酶的pH曲线。已经用每种纯化的酶检查了所述测定的线性。所述测定在40mM Britton-Robinson缓冲液中进行,所述缓冲液被调节至pH值在4和11之间。将所述酶溶液稀释到测定缓冲液中,并将500μl的酶溶液在50℃水浴中平衡5分钟,然后加入一个底物片剂。10分钟后,通过添加10ml 2%Tris pH 12终止反应。将反应试管在室温下放置5分钟,搅拌并将液体通过Whatman 1号滤纸过滤。通过测量595nm处的吸光度来定量从底物释放的蓝色染料。将每种pH下的酶活性报告为相对活性,其中将在最适pH下的活性设定为100%。pH曲线示于图3中。

[0252] 甘露聚糖酶的相对活性(%)通过将样品的甘露聚糖酶活性除以参比样品的甘露聚糖酶活性来计算。在pH曲线的情况下,参比样品是在最适pH下的样品。在温度曲线的情况下,参比样品是在最适温度下的样品。

[0253] 甘露聚糖酶的温度曲线

[0254] 使用来自Megazyme的β-甘露糖酶片剂测定天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖(T-MNZ 11/14),对所建议的方案进行少许修改,确定纯化的甘露聚糖酶的最适温度。所述测定在40mM Britton-Robinson缓冲液pH 7中、在30-90℃之间变化的温度下进行10分钟。将酶活性报告为相对活性,其中将最适温度下的活性设定为100%。温度曲线示于图4中。

[0255] 甘露聚糖酶的温度和pH特征

[0256] Man6的分子量在30-35kDa之间。所述酶在pH 7下的最适温度是50℃至70℃。所述酶在50℃下的最适pH在至少pH 6至pH 9的pH范围内。最适温度和最适pH使用10分钟反应时间和天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖作为底物确定。

[0257] Man7的分子量在50-55kDa之间。所述酶在pH 7下的最适温度是50℃至70℃。所述酶在50℃下的最适pH在至少pH 7至pH 10的pH范围内。最适温度和最适pH使用10分钟反应时间和天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖作为底物确定。

[0258] Man14的分子量在30-40kDa之间。所述酶在pH 7下的最适温度是50℃至70℃。所述酶在50℃下的最适pH在至少pH 7至pH 8的pH范围内。最适温度和最适pH使用10分钟反应时间和天青蛋白交联的角豆半乳甘露聚糖作为底物确定。

[0259] 实施例9:Man6和Man7甘露聚糖酶与没有漂白剂的商业洗涤剂一起的去污性能

[0260] 在芽孢杆菌(如实施例5中所述)和木霉(如实施例6中所述)中产生的Man6和Man7甘露聚糖酶,测试它们与没有漂白剂的商业洗涤剂一起在40℃和水硬度16°dH下除去甘露聚糖酶敏感的标准污渍的能力,并与商业甘露聚糖酶制剂Mannaway®4.0L(Novozymes)比较。使用来自测试材料中心B.V.(Center for testmaterial B.V.)(荷兰)的以下人工染污的测试布:在棉上甘露聚糖酶敏感的巧克力布丁(E-165),在棉上(CS-73)和聚酯/棉(PC-S-73)上刺槐豆胶与颜料,以及在棉上瓜尔胶与炭黑(CS-43)。将织物切成6cm x 6cm的样片,并将各2块用于测试。

[0261] 含有除甘露聚糖酶以外的所有其他酶的商业重垢液体洗涤剂A以每升洗液4.4g的浓度使用,而不含酶的商业护色洗涤剂粉末以3.8g/l使用。我们在硬度为16°dH的合成自来水中制备的含洗涤剂的洗液。将蛋白酶Savinase®16L(0.5w/w%)和淀粉酶Stainzyme®12L(0.4w/w%)加入与商业护色洗涤剂粉末一起使用的硬水中,所述液体洗涤剂已含有淀

粉酶和蛋白酶。所述护色洗涤剂粉末的洗液的pH值为约10，所述液体洗涤剂的pH值为约8.3。

[0262] 甘露聚糖酶的剂量在洗涤剂重量的0-0.2/0.25％范围内，但是为了评价，所述剂量计算为每毫升洗液的酶活性单位(MNU)或每升洗液的毫克活性酶蛋白(AEP)。如实施例7中所述测量活性。通过将酶活性除以实施例8中定义的比活性来计算每种制剂的AEP含量。对照样品含有洗涤剂溶液但没有甘露聚糖酶。

[0263] 对于硬度为16°dH的合成自来水，在去离子水(Milli-Q或等效物)中制备以下原液：

[0264] 钙硬度为1000°d的原液：$CaCl_2\times 2H_2O$(1.02382.1000，Merck KGaA，德国)26.22g/l

[0265] 镁硬度为200°d的原液：$MgSO_4\times 7H_2O$(1.05886.1000，Merck KGaA，德国)8.79g/l H_2O

[0266] $NaHCO_3$原液：$NaHCO_3$(1.06329.1000Merck KGaA，德国)29.6g/l

[0267] 将13.3ml $CaCl_2$溶液、13.3ml $MgSO_4$溶液和10.0ml新制备的$NaHCO_3$溶液以给出的顺序加入容量瓶中，用去离子水补足至1升并混合。通过络合滴定法确定水的硬度，发现是正确的。

[0268] 如下在Atlas LP-2水洗色牢度计(Launder-Ometer)中进行去污处理。水洗色牢度计首先被预热到40℃。然后将洗涤剂、250ml硬度为16°dH的合成自来水和稀释的酶(<1.0ml)加入1.2升容器中。添加污渍并将所述水洗色牢度计在40℃下以42rpm的转速运行60分钟。之后，将样品在流水下小心冲洗并在防日光的栅格上在室内空气中干燥过夜。通过用Konica Minolta CM-3610A分光光度计使用L*a*b*色空间坐标(光源D65/100，420nm截止)，按反射率值测量颜色来评价去污效果。污渍的褪色，表明甘露聚糖酶性能(去污效率)，以ΔL*(delta L*)计算，其意味着经酶处理的织物的亮度值L*减去用没有甘露聚糖酶的洗液(对照)处理的织物的亮度值L*。最终结果(总去污效果)显示为各污渍的ΔL*之和。各污渍的色值是2个样片的平均值。用商业液体洗涤剂获得的结果示于图6-7中。与商业甘露聚糖酶制剂Mannway®4.0L相比，当以活性单位或以活性酶蛋白计量配给时，本发明的甘露聚糖酶与液体洗涤剂一起具有相似的(Man6)或明显更好的(Man7)去污性能。不管表达宿主是芽孢杆菌还是木霉，用Man6和Man7都获得了相似的性能(图6)。用商业护色洗涤剂粉末获得的结果(图8-9)表明，与商业甘露聚糖酶制剂Mannaway®4.0L相比，当以活性单位或以活性酶蛋白计量配给时，本发明的甘露聚糖酶具有更好的去污性能。.

[0269] 实施例10：Man6和Man7甘露聚糖酶与含有漂白剂的洗涤剂一起的去污性能

[0270] 在芽孢杆菌(如实施例5中所述)和木霉(如实施例6中所述)中产生的Man6和Man7甘露聚糖酶，测试它们商业漂白洗涤剂一起在40℃和水硬度16°dH下除去甘露聚糖酶敏感的标准污渍的能力，并与商业甘露聚糖酶制剂Mannaway®4.0L(Novozymes)比较。测试系统类似于实施例9中所述，不同在于使用来自材料中心B.V.(荷兰)的3种不同的人工染污的测试布：在棉上甘露聚糖酶敏感的巧克力布丁(E-165)，在棉上刺槐豆胶与颜料(CS-73)，以及在棉上瓜尔胶与炭黑(CS-43)。商业护色洗涤剂粉末以每升洗液4.2g的浓度使用，洗液的pH值为约9.5。因为洗涤剂不含任何酶，所以将蛋白酶Savinase®16L(0.5w/w％)和淀粉酶Stainzyme®12L(0.4w/w％)添加到试验中使用的硬水中。测量所述样片在处理后的颜

色,并如实施例9中所述,将结果计算为各3个污渍的ΔL*的总和。用商业含漂白剂的洗涤剂获得的结果(图10)表明,当以活性酶蛋白计量配给时,本发明的甘露聚糖酶(Man7)与商品甘露聚糖酶Mannaway®4.0L相比具有明显更好的去污性能。与商业细菌甘露聚糖酶相比,用Man6获得了至少具有相似的性能。

[0271] 实施例11:Man14甘露聚糖酶与商业液体洗涤剂一起的去污性能

[0272] 测试芽孢杆菌中产生的Man14甘露聚糖酶(如实施例5中所述)与商业重垢液体洗涤剂B一起在40℃和水硬度为16°dH时去除甘露聚糖酶敏感性标准污渍的能力,并与商业甘露聚糖酶制剂Mannaway®4.0L(Novozymes)进行比较。测试系统类似于实施例9中所述,除了使用来自材料中心B.V.(荷兰)的两种不同的人工染污测试布:在棉上甘露聚糖酶敏感的巧克力布丁(E-165),和在棉上刺槐豆胶与颜料(CS-73)。商业重垢液体洗涤剂B以每升洗液5克的浓度使用,并且洗液的pH值为约8.3。将蛋白酶Savinase®16L(0.5w/w%)和淀粉酶Stainzyme®12L(0.4w/w%)添加到用于测试的硬水中,因为所述洗涤剂不含任何酶。测量所述样片在处理后的颜色,并如实施例9中所述,将结果计算为各2个污渍的ΔL*之和。用含洗涤剂的商业液体获得的结果(图11-12)表明,当按活性单位或按活性酶蛋白配量时,Man14在液体洗涤剂中具有与商业产品相当的良好性能。

[0273] 实施例12:Man6和Man7甘露聚糖酶在商业液体洗涤剂中的稳定性

[0274] 在从当地超市获得的OMO Color液中测试芽孢杆菌中产生的Man6和Man7甘露聚糖酶制剂的稳定性,并与商业甘露聚糖酶制剂Mannaway®4.0L进行比较。在洗涤剂中添加0.5w/w%的甘露聚糖酶制剂,并将样品在带盖的塑料管中于37℃温育5周。除了使用30分钟温育时间外,通过实施例7中描述的活性测定以一定间隔测量活性。结果计算为残余活性(%),其通过将在某个时间点取得的样品的活性除以样品的初始活性而获得。在芽孢杆菌和木霉属二者中产生的Man7的稳定性以及在木霉属中产生的Man6还在含有蛋白酶但不含甘露聚糖酶的商业液体重垢洗涤剂A中相对于Mannaway®4.0L测试。在该试验中,使用1%-(w/w)的甘露聚糖酶,并将样品在37℃下温育12周。在Omo Color中的结果(图13)表明,与Mannaway®4.0L相比,Man6明显更好并且Man7相似。与另一种商业液体洗涤剂A一起,Man7和Man6并且尤其Man6均比Mannaway®4.0L更稳定,如图14所示。

[0275] 在相同条件下的另一个测试中获得的结果显示,不管表达宿主是芽孢杆菌还是木霉,Man6都具有相似的稳定性(数据未显示)。稳定性实验的结果表明,即使当在高温如37℃下储存时,本发明的甘露聚糖酶在洗涤剂中稳定长达数周。与商业细菌甘露聚糖酶相比,本发明的甘露聚糖酶(Man6和Man7)在液体洗涤剂中的的稳定性改善。

[0276] 实施例13:本发明的液体洗涤剂组合物的洗涤性能

[0277] 本发明的液体洗涤剂组合物的洗涤性能通过使用可从CFT(测试材料中心)B.V.,Vlaardingen,荷兰(“CFT”);Eidgenössische Material-und Prufanstalt Testmaterialien AG[联邦材料和测试机构,测试材料]St.Gallen,瑞士(“EMPA”);和Warwick Equest Ltd Unit 55,Consett Business Park,Consett,County Durham(“EQUEST”)获得的标准化污渍确定。

[0278] 使用具有以下组成的液体洗剂作为基础配方(所有值均为重量百分比):

[0279]

化学名	活性物质原料[%]	活性物质洗涤剂配方[%]
去矿质水	100	余量
烷基苯磺酸	96	2-7
阴离子表面活性剂	70	6-10
C12-C18脂肪酸钠盐	30	1-4
非离子表面活性剂	100	4-7
膦酸盐	40	0.1-2
柠檬酸	100	1-3
NaOH	50	1-4
硼酸	100	0.1-2
消泡剂	100	0.01-1
甘油	100	1-3
酶	100	0.1-2
防腐剂	100	0.05-1
乙醇	93	0.5-2
光学增亮剂	90	0.01-1
香料	100	0.1-1
染料	100	0.001-0.1

[0280] 所述洗涤剂组合物的pH值在8.2-8.6之间。

[0281] 基于该基础配方,通过添加如下所示的相应酶来制备液体洗涤剂组合物1和2:

[0282] 组合物1:根据SEQ ID NO:12的酶(Man6)

[0283] 组合物2:根据SEQ ID NO:16的酶(Man7)

[0284] 根据AISE方法如下进行洗涤:3.5kg清洁压载布,4块SBL布,Miele洗衣机,20℃和40℃短程序。

[0285] 所有甘露聚糖酶均基于总蛋白质含量以相同的量添加。

[0286] 所述液体洗涤剂的配量比为每升洗液4.0克。洗涤程序在20℃和40℃的温度下进行60分钟,水的水硬度在15.5°和16.5°(德国硬度)之间。

[0287] 得到的结果是用所述洗涤剂得到的减退单位和用含有可商购的参比甘露聚糖酶(Mannaway 4.0L,得自Novozymes)的洗涤剂得到的减退单位之间的差值。因此,正值表明与包含所述参比甘露聚糖酶的相同洗涤剂组合物相比,包含本发明甘露聚糖酶的洗涤剂组合物的洗涤性能得到改善。在所述洗涤测试中,测试了大范围的污渍。

[0288] 通过光度法确定污渍的白度,即增亮,作为洗涤性能的指示。使用Minolta CM508d光谱仪装置,其使用随所述装置一起提供的白度标准预先校准。

[0289] 得到的结果是用所述洗涤剂得到的减退单位和用含有所述酶组合的洗涤剂得到的减退单位之间的差值。因此,正值表明由于洗涤剂中存在的所述酶组合而洗涤性能改善。洗涤剂组合物中本发明的甘露聚糖酶对各种含有甘露聚糖的污渍显示出改善的性能。

[0290]

	20°C		40°C	
污渍	组合物1	组合物2	组合物1	组合物2
巧克力冰淇淋(Equest)	1.3	4.2	未测	未测
Carte Dór 巧克力冰淇淋(Equest)	未测	3.3	未测	0.7
可可[CO](Equest)	未测	2.3	未测	未测
蛋黄酱/炭黑色素(CFT CS05S [CO])	1.3	4.3	1.1	2.2
沙拉酱，与天然黑色(CFT CS06 [CO])	1.2	3.5	1.2	2.6
口红，淡红色(CFT CS216 [CO])	未测	1.5	未测	0.7

[0291] 实施例14:本发明的粉末洗涤剂组合物的洗涤性能

[0292] 本发明的粉末洗涤剂组合物的洗涤性能通过使用可从CFT(测试材料中心)B.V.,Vlaardingen,荷兰(“CFT”);Eidgenössische Material-und Prufanstalt Testmaterialien AG[联邦材料和测试机构,测试材料]St.Gallen,瑞士(“EMPA”);和Warwick Equest Ltd Unit 55,Consett Business Park,Consett,County Durham(“EQUEST”)获得的标准化污渍确定。

[0293] 使用具有以下组成的固体洗剂作为基础配方(所有值均为重量百分比):

[0294]

化学名称	活性物质原料[%]	活性物质洗涤剂配方[%]
去矿质水	100	1-4
烷基苯磺酸	97	9-13
非离子表面活性剂	100	4-7
过碳酸盐	88	9-13
TAED	92	1-5
膦酸盐	60	0.1-3
聚丙烯酸酯	45	1-4
硅酸钠	40	5-10
碳酸钠	100	18-22
羧甲基纤维素	69	1-4
污垢释放聚合物	100	0.1-1
光学增亮剂	70	0.1-1
消泡剂	t.q.	0.01-1
硫酸钠	100	22-30
酶	100	0.1-1
香料	100	0.1-1
NaOH	100	0.1-1
其余	-	1-4

[0295] 基于该基础配方,通过添加如下所示的相应的酶来制备固体洗涤剂组合物3和4:

[0296] 组合物3:根据SEQ ID NO:12的酶(Man6)

[0297] 组合物4:根据SEQ ID NO:16的酶(Man7)

[0298] 根据AISE方法如下进行洗涤:3.5kg清洁压载布,4块SBL布,Miele洗衣机,20℃和40℃短程序。所有甘露聚糖酶均基于总蛋白质含量以相同的量添加。

[0299] 所述粉末洗涤剂的配量比为每升洗液3.8克。洗涤程序在20℃和40℃的温度下进行60分钟,水的水硬度在15.5°和16.5°(德国硬度)之间。

[0300] 通过光度法确定污渍的白度,即增亮,作为洗涤性能的指示。使用Minolta CM508d光谱仪装置,其使用随所述装置一起提供的白度标准预先校准。

[0301] 得到的结果是用所述洗涤剂得到的减退单位和用含有参比甘露聚糖酶(Mannaway 4.0L,得自Novozymes)的洗涤剂得到的减退单位之间的差值。因此,正值表明所述变体在洗涤剂中的洗涤性能改善。本发明的甘露聚糖酶对几种污渍显示出改善的性能。因此,显然本发明的甘露聚糖酶与Mannaway相比显示出改善的洗涤性能。

[0302]

	20°C		40°C	
污渍	组合物3	组合物4	组合物3	组合物4
Carte Dór 巧克力冰淇淋(Equest)	1.4	2.8	2.1	0.5
Vienetta (Equest)	0.5	0.8	0.5	未测
巧克力冰淇淋 L [CO](Equest)	0.9	0.9	1.1	未测
粥(EMPA 163 [CO])	未测	未测	1.3	5.1
可可(CFT CS02 [CO])	1.8	3.1	未测	未测
蛋黄酱/炭黑色素(CFT CS05S [CO])	未测	1.0	未测	2.7
沙拉酱, 与天然黑(CFT CS06 [CO])	2.0	4.8	1.3	5.1
皮脂 BEY 与炭黑(CFT CS32 [CO])	0.7	1.4	0.5	0.7
纯巧克力饮料(CFT CS44 [CO])	未测	1.4	未测	0.8

[0303] 在不限制专利权利要求的范围和解释的情况下,本文中公开的一个或多个方面或实施方式的某些技术效果在下面列出:技术效果是甘露聚糖的降解或改性。另一个技术效果是提供具有良好储存稳定性的甘露聚糖酶。前面的描述已经作为本发明的特定实现和实施方式的非限制性示例提供了发明人当前对于实施本发明所设想的最佳模式的完整且提供信息的描述。然而,对于本领域技术人员来说很清楚,本发明不局限于上面提供的实施方式的细节,而是可以在不偏离本发明特征的情况下使用等同手段在其他实施方式中实现。

[0304] 此外,可以有利地使用本发明的上述公开方面和实施方式的一些特征而无需相应地使用其他特征。因此,前面的描述应该被认为仅仅是对本发明原理的说明,而不是对其的限制。因而,本发明的范围仅受所附的专利权利要求的限制。在一个实施方式中,与至少一种组分所源自的相应天然组分相比,本发明组合物的所述至少一种组分具有不同的化学、结构或物理特征。在一个实施方式中,所述特征是大小均一、均匀分散、不同的同种型、不同的密码子简并、不同的翻译后修饰、不同的甲基化、不同的三级或四级结构、不同的酶活性、不同的亲和力、不同的结合活性和不同的免疫原性中的至少一种。

[0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> Henkel AG & Co. KGaA
[0003] <120> Detergent compositions comprising Bacterial mannanases
[0004] <130> PT034268WO
[0005] <160> 48
[0006] <170> PatentIn version 3.5
[0007] <210> 1
[0008] <211> 39
[0009] <212> DNA
[0010] <213> Artificial Sequence
[0011] <220>
[0012] <223> primer
[0013] <400> 1
[0014] caaccgcctc tgcagcttat gcacaaaacg gatttcacg 39
[0015] <210> 2
[0016] <211> 39
[0017] <212> DNA
[0018] <213> Artificial Sequence
[0019] <220>
[0020] <223> primer
[0021] <400> 2
[0022] cggtatatct ctgtcttaat cactcttaag cccattttc 39
[0023] <210> 3
[0024] <211> 37
[0025] <212> DNA
[0026] <213> Artificial Sequence
[0027] <220>
[0028] <223> primer
[0029] <400> 3
[0030] caaccgcctc tgcagcttct gatggtcata gccaaac 37
[0031] <210> 4
[0032] <211> 36
[0033] <212> DNA
[0034] <213> Artificial Sequence
[0035] <220>
[0036] <223> primer
[0037] <400> 4
[0038] cggtatatct ctgtcttatt ggattgttac atgatc 36
[0039] <210> 5
[0040] <211> 40
[0041] <212> DNA

[0042] <213> Artificial Sequence

[0043] <220>

[0044] <223> primer

[0045] <400> 5

[0046] caaccgcctc tgcagctgca agcgggtttt atgtaaacgg 40

[0047] <210> 6

[0048] <211> 39

[0049] <212> DNA

[0050] <213> Artificial Sequence

[0051] <220>

[0052] <223> primer

[0053] <400> 6

[0054] cggtatatct ctgtcttatt taatggtaac gttatcaac 39

[0055] <210> 7

[0056] <211> 17

[0057] <212> DNA

[0058] <213> Artificial Sequence

[0059] <220>

[0060] <223> primer

[0061] <400> 7

[0062] agctgcagag gcggttg 17

[0063] <210> 8

[0064] <211> 21

[0065] <212> DNA

[0066] <213> Artificial Sequence

[0067] <220>

[0068] <223> primer

[0069] <400> 8

[0070] gacagagata taccgacagt g 21

[0071] <210> 9

[0072] <211> 975

[0073] <212> DNA

[0074] <213> Bacillus clausii

[0075] <400> 9

[0076] atgaagaggg aggacatgga tcaaatgaaa agaaagcggt tacaattgtt tggaacacta 60

[0077] gtggtattgg ttttgttcgt gtacggtagc ggttcggcat atgcacaaaa cggatttcac 120

[0078] gtatccggta cagagttgtt ggacaaaaat ggcgatcctt atgttatgcg tggcgtcaac 180

[0079] catggacact cttggtttaa gcaagatctg gaggaagcaa tccctgccat agcagaaaca 240

[0080] ggggcgaaca cggtgagaat ggtcttatcc aatggacagc aatgggaaaa agatgatgcc 300

[0081] tctgagcttg cccgtgtgct ggctgccaca gaaacatatg gattgacaac tgtgctggaa 360

[0082] gtccatgacg ctacaggaag tgacgatcct gctgatttag agaaagcagt cgattattgg 420

[0083] atcgaaatgg ctgatgttct caaggggaca gaagaccgag taatcattaa cgttgccaat 480

[0084] gaatggtatg ggtcgtggag gagcgacgtt tgggcagaag catacgcaca agcgatcccg 540
[0085] cgcttgcgca gcgctggcct ctcccataca ttaatggttg atgcggcagg ttggggccag 600
[0086] taccctgcct ccatccacga gcggggagcc gatgtgtttg cgtccgatcc attaaaaaac 660
[0087] acgatgtttt cgatccatat gtacgaatat gcaggagctg atagggcgac aattgcctat 720
[0088] aacattgatc gtgtgcttgc tgaaaatctt gctgtggtga tcggtgaatt tggccatagg 780
[0089] catcatgatg gcgatgtcga tgaagatgcg attttggcct atacagcaga gcggcaagtg 840
[0090] ggctggctgg cctggtcatg gtatggcaac agcgggggtg ttgaatactt ggatttagct 900
[0091] gaaggcccat caggcccatt gacgagttgg ggcaaacgaa ttgtttatgg tgaaaatggg 960
[0092] cttaagagtg attaa 975
[0093] <210> 10
[0094] <211> 870
[0095] <212> DNA
[0096] <213> Bacillus clausii
[0097] <400> 10
[0098] cagaacggct tccacgtctc cggcacggag ctcctggaca agaacggcga cccttacgtc 60
[0099] atgcgcggcg tcaaccacgg ccacagctgg ttcaagcagg acctcgagga agccatccct 120
[0100] gctatcgctg agacgggcgc taacacggtc cgcatggtcc tgagcaacgg ccagcagtgg 180
[0101] gagaaggacg acgctagcga gctggctcgc gtcctcgctg ctacggagac gtacggcctc 240
[0102] accacggtcc tggaggtcca cgacgctacg ggctcggacg accccgccga cctcgagaag 300
[0103] gccgtcgact actggatcga gatggctgac gtcctgaagg gcaccgagga ccgcgtcatc 360
[0104] atcaacgtcg ccaacgagtg gtacggctcc tggcgcagcg acgtctgggc cgaggcctac 420
[0105] gctcaggcta tccctcgcct ccgctcggcc ggcctctccc acacgctcat ggtcgacgct 480
[0106] gccggctggg gccagtaccc tgcttccatc cacgagcgcg gcgctgacgt ctttgcttcg 540
[0107] gacccccctga agaacaccat gttctccatc cacatgtacg agtacgctgg cgctgaccgc 600
[0108] gctaccatcg cctacaacat cgaccgcgtc ctggctgaga acctggctgt cgtcatcggc 660
[0109] gagtttggcc accgccacca cgacggcgac gtcgacgagg acgctatcct ggcttacacc 720
[0110] gccgagcgcc aggtcggctg gctggcttgg tcgtggtacg gcaactcggg cggcgtcgag 780
[0111] tacctggacc tggctgaggg cccttcgggc cctctcacga gctggggcaa gcgcatcgtc 840
[0112] tacggcgaga acggcctgaa gagcgactaa 870
[0113] <210> 11
[0114] <211> 324
[0115] <212> PRT
[0116] <213> Bacillus clausii
[0117] <400> 11
[0118] Met Lys Arg Glu Asp Met Asp Gln Met Lys Arg Lys Arg Leu Gln Leu
[0119] 1 5 10 15
[0120] Phe Gly Thr Leu Val Val Leu Val Leu Phe Val Tyr Gly Ser Gly Ser
[0121] 20 25 30
[0122] Ala Tyr Ala Gln Asn Gly Phe His Val Ser Gly Thr Glu Leu Leu Asp
[0123] 35 40 45
[0124] Lys Asn Gly Asp Pro Tyr Val Met Arg Gly Val Asn His Gly His Ser
[0125] 50 55 60

[0126] Trp Phe Lys Gln Asp Leu Glu Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Thr
[0127] 65 70 75 80
[0128] Gly Ala Asn Thr Val Arg Met Val Leu Ser Asn Gly Gln Gln Trp Glu
[0129] 85 90 95
[0130] Lys Asp Asp Ala Ser Glu Leu Ala Arg Val Leu Ala Ala Thr Glu Thr
[0131] 100 105 110
[0132] Tyr Gly Leu Thr Thr Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp
[0133] 115 120 125
[0134] Asp Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Ala
[0135] 130 135 140
[0136] Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu Asp Arg Val Ile Ile Asn Val Ala Asn
[0137] 145 150 155 160
[0138] Glu Trp Tyr Gly Ser Trp Arg Ser Asp Val Trp Ala Glu Ala Tyr Ala
[0139] 165 170 175
[0140] Gln Ala Ile Pro Arg Leu Arg Ser Ala Gly Leu Ser His Thr Leu Met
[0141] 180 185 190
[0142] Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Ala Ser Ile His Glu Arg
[0143] 195 200 205
[0144] Gly Ala Asp Val Phe Ala Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser
[0145] 210 215 220
[0146] Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Ala Asp Arg Ala Thr Ile Ala Tyr
[0147] 225 230 235 240
[0148] Asn Ile Asp Arg Val Leu Ala Glu Asn Leu Ala Val Val Ile Gly Glu
[0149] 245 250 255
[0150] Phe Gly His Arg His His Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Ala Ile Leu
[0151] 260 265 270
[0152] Ala Tyr Thr Ala Glu Arg Gln Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr
[0153] 275 280 285
[0154] Gly Asn Ser Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Glu Gly Pro Ser
[0155] 290 295 300
[0156] Gly Pro Leu Thr Ser Trp Gly Lys Arg Ile Val Tyr Gly Glu Asn Gly
[0157] 305 310 315 320
[0158] Leu Lys Ser Asp
[0159] <210> 12
[0160] <211> 289
[0161] <212> PRT
[0162] <213> Bacillus clausii
[0163] <400> 12
[0164] Gln Asn Gly Phe His Val Ser Gly Thr Glu Leu Leu Asp Lys Asn Gly
[0165] 1 5 10 15
[0166] Asp Pro Tyr Val Met Arg Gly Val Asn His Gly His Ser Trp Phe Lys
[0167] 20 25 30

[0168] Gln Asp Leu Glu Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Thr Gly Ala Asn
[0169] 35 40 45
[0170] Thr Val Arg Met Val Leu Ser Asn Gly Gln Gln Trp Glu Lys Asp Asp
[0171] 50 55 60
[0172] Ala Ser Glu Leu Ala Arg Val Leu Ala Ala Thr Glu Thr Tyr Gly Leu
[0173] 65 70 75 80
[0174] Thr Thr Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp Asp Pro Ala
[0175] 85 90 95
[0176] Asp Leu Glu Lys Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Ala Asp Val Leu
[0177] 100 105 110
[0178] Lys Gly Thr Glu Asp Arg Val Ile Ile Asn Val Ala Asn Glu Trp Tyr
[0179] 115 120 125
[0180] Gly Ser Trp Arg Ser Asp Val Trp Ala Glu Ala Tyr Ala Gln Ala Ile
[0181] 130 135 140
[0182] Pro Arg Leu Arg Ser Ala Gly Leu Ser His Thr Leu Met Val Asp Ala
[0183] 145 150 155 160
[0184] Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Ala Ser Ile His Glu Arg Gly Ala Asp
[0185] 165 170 175
[0186] Val Phe Ala Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
[0187] 180 185 190
[0188] Tyr Glu Tyr Ala Gly Ala Asp Arg Ala Thr Ile Ala Tyr Asn Ile Asp
[0189] 195 200 205
[0190] Arg Val Leu Ala Glu Asn Leu Ala Val Val Ile Gly Glu Phe Gly His
[0191] 210 215 220
[0192] Arg His His Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Ala Ile Leu Ala Tyr Thr
[0193] 225 230 235 240
[0194] Ala Glu Arg Gln Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Ser
[0195] 245 250 255
[0196] Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Glu Gly Pro Ser Gly Pro Leu
[0197] 260 265 270
[0198] Thr Ser Trp Gly Lys Arg Ile Val Tyr Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ser
[0199] 275 280 285
[0200] Asp
[0201] <210> 13
[0202] <211> 1473
[0203] <212> DNA
[0204] <213> Bacillus hemicellulosilyticus
[0205] <400> 13
[0206] atgagaaatt tcggtaagtt aattgtcagt tcttgtcttc tattcagttt ttttcttttt 60
[0207] gcctctgatg gtcatagcca aacacattct ggtttttata tcgaaggttc aacccttttat 120
[0208] gacgccaacg gagagccctt tgtaatgaga ggtatcaatc atggacatgc ctggtataaa 180
[0209] catgattcta acgtcgctat accagctatt gctaatcaag gagcaaatac aattcgtatt 240

[0210] gttctgtcag atggtggtca atgggcaaaa gatgatataa acacattaaa tcaagtgctc 300

[0211] gatttagcag aggaacatga gatgattgct gttgttgagg ttcacgatgc aacaggatct 360

[0212] aattctatgg ctgacttaaa tcgtgctgtc gattattgga ttgaaatgaa agacgcttta 420

[0213] attggaaaag aagatcgcgt cataattaac attgccaatg aatggtatgg agcatgggac 480

[0214] ggacaaggct gggcaaatgg ctataaggag gttattccac gtttacgaaa tgctggcttc 540

[0215] actcatacat taatggtaga tgcagctggt tggggacaat accctcaatc gattcatgat 600

[0216] tatggtcaag aggtatttaa tgctgatcct ttagcaaata cgatgttttc catccatatg 660

[0217] tatgaatatg ctggcggaaa tgcttcaatg gtacaatcta atatcgatgg tgtcgtcgat 720

[0218] caagggttag ctcttgtaat aggagaattt gggcatatgc atacggacgg agatgttgat 780

[0219] gaagcaacga tattgagcta ctcgcaacaa agaggagtcg gttggctagc ttggtcttgg 840

[0220] aaaggcaatg ggactcaatg ggaatatcta gatttatctt atgattggca aggaacaaac 900

[0221] ttaacttctt ggggaaatac cattgtccac gggcctaatg gattactcga aacatccatt 960

[0222] ccaagctcga ttttccatac cgctccaaac aatggagatc cccctcctca taacggtaat 1020

[0223] gaaacgatct tatatgattt cgaacatggc actcaaggct ggtcaggttc ttcacttctt 1080

[0224] ggaggacctt ggacgacgaa tgaatggagt acaaatggta accattcatt aaaggccgat 1140

[0225] attttcttat cagctaactc caaacatgaa ttagcaaaag ttgaaaatcg aaatttatca 1200

[0226] ggctactcta ctttacaagc cactgtccgc catgcacatt ggggaaatgt tggtaattta 1260

[0227] acggcgagaa tgtatgtaaa aacgggctca aactatagct ggtttaatgg tgatcctatc 1320

[0228] ccagtaaact cagcaaatgg tacgactgtc actttgcctc tttcatctat tccaaaccta 1380

[0229] aatgacgtaa aagaaattgg cgttgaattt attggagctt caaatagcaa tggacaaacc 1440

[0230] gccatttatt tagatcatgt aacaatccaa taa 1473

[0231] <210> 14

[0232] <211> 1395

[0233] <212> DNA

[0234] <213> Bacillus hemicellulosilyticus

[0235] <400> 14

[0236] cagacccact cgggcttcta catcgagggc tcgacgctct acgacgctaa cggcgagcct 60

[0237] tttgtcatgc gcggcatcaa ccacggccac gcctggtaca agcacgactc caacgtcgct 120

[0238] atccctgcta tcgctaacca gggcgctaac accatccgca tcgtcctcag cgacggtggc 180

[0239] cagtgggcca aggacgacat caacacgctg aaccaggtcc tcgacctggc cgaggagcac 240

[0240] gagatgatcg ctgtcgtcga ggtccacgac gctaccggct ccaacagcat ggccgacctc 300

[0241] aaccgcgccg tcgactactg gatcgagatg aaggacgccc tgatcggcaa ggaagaccgc 360

[0242] gtcatcatca acatcgctaa cgagtggtac ggcgcttggg acggccaggg ctgggccaac 420

[0243] ggctacaagg aagtcatccc tcgcctgcgc aacgctggct tcacccacac cctcatggtc 480

[0244] gacgctgccg gctggggcca gtaccctcag agcatccacg actacggcca agaggtcttc 540

[0245] aacgccgacc ctctggccaa caccatgttc tccatccaca tgtacgagta cgctggcggc 600

[0246] aacgcctcca tggtccagag caacatcgac ggcgtcgtcg accagggcct cgctctggtc 660

[0247] atcggcgagt tcggccacat gcacacggac ggcgacgtcg acgaggctac catcctgagc 720

[0248] tactcgcagc agcgcggcgt cggctggctg gcctggtcgt ggaagggcaa cggcacccag 780

[0249] tgggagtacc tcgacctgag ctacgactgg cagggcacca acctcacgtc gtggggcaac 840

[0250] acgatcgtcc acggccctaa cggcctcctg gagacgtcca tcccttccag catctttcac 900

[0251] accgctccta acaacggcga ccctcctccc cacaacggca acgagacgat cctgtacgac 960

[0252] ttcgagcacg gcacgcaggg ctggtcgggc tcgtccctgc tgggcggccc ttggaccacc 1020
[0253] aacgagtggt cgaccaacgg caaccactcc ctcaaggccg acatcttcct gtccgccaac 1080
[0254] agcaagcacg agctcgccaa ggtcgagaac cgcaacctca gcggctactc gacgctgcag 1140
[0255] gctaccgtcc gccacgctca ctggggcaac gtcggcaacc tgacggctcg catgtacgtc 1200
[0256] aagacgggca gcaactactc gtggttcaac ggcgacccca tccctgtcaa ctcggctaac 1260
[0257] ggcaccaccg tcaccctccc tctgagctcg atccccaacc tcaacgacgt caaggagatc 1320
[0258] ggcgtcgagt tcatcggcgc tagcaacagc aacggccaga ccgccatcta cctggaccac 1380
[0259] gtcacgatcc agtaa 1395
[0260] <210> 15
[0261] <211> 490
[0262] <212> PRT
[0263] <213> Bacillus hemicellulosilyticus
[0264] <400> 15
[0265] Met Arg Asn Phe Gly Lys Leu Ile Val Ser Ser Cys Leu Leu Phe Ser
[0266] 1 5 10 15
[0267] Phe Phe Leu Phe Ala Ser Asp Gly His Ser Gln Thr His Ser Gly Phe
[0268] 20 25 30
[0269] Tyr Ile Glu Gly Ser Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly Glu Pro Phe Val
[0270] 35 40 45
[0271] Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr Lys His Asp Ser Asn
[0272] 50 55 60
[0273] Val Ala Ile Pro Ala Ile Ala Asn Gln Gly Ala Asn Thr Ile Arg Ile
[0274] 65 70 75 80
[0275] Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Ala Lys Asp Asp Ile Asn Thr Leu
[0276] 85 90 95
[0277] Asn Gln Val Leu Asp Leu Ala Glu Glu His Glu Met Ile Ala Val Val
[0278] 100 105 110
[0279] Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asn Ser Met Ala Asp Leu Asn Arg
[0280] 115 120 125
[0281] Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Ala Leu Ile Gly Lys Glu
[0282] 130 135 140
[0283] Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Ala Trp Asp
[0284] 145 150 155 160
[0285] Gly Gln Gly Trp Ala Asn Gly Tyr Lys Glu Val Ile Pro Arg Leu Arg
[0286] 165 170 175
[0287] Asn Ala Gly Phe Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly
[0288] 180 185 190
[0289] Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Glu Val Phe Asn Ala
[0290] 195 200 205
[0291] Asp Pro Leu Ala Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala
[0292] 210 215 220
[0293] Gly Gly Asn Ala Ser Met Val Gln Ser Asn Ile Asp Gly Val Val Asp

[0294] 225 230 235 240
[0295] Gln Gly Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His Met His Thr Asp
[0296] 245 250 255
[0297] Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ser Tyr Ser Gln Gln Arg Gly
[0298] 260 265 270
[0299] Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly Thr Gln Trp Glu
[0300] 275 280 285
[0301] Tyr Leu Asp Leu Ser Tyr Asp Trp Gln Gly Thr Asn Leu Thr Ser Trp
[0302] 290 295 300
[0303] Gly Asn Thr Ile Val His Gly Pro Asn Gly Leu Leu Glu Thr Ser Ile
[0304] 305 310 315 320
[0305] Pro Ser Ser Ile Phe His Thr Ala Pro Asn Asn Gly Asp Pro Pro Pro
[0306] 325 330 335
[0307] His Asn Gly Asn Glu Thr Ile Leu Tyr Asp Phe Glu His Gly Thr Gln
[0308] 340 345 350
[0309] Gly Trp Ser Gly Ser Ser Leu Leu Gly Gly Pro Trp Thr Thr Asn Glu
[0310] 355 360 365
[0311] Trp Ser Thr Asn Gly Asn His Ser Leu Lys Ala Asp Ile Phe Leu Ser
[0312] 370 375 380
[0313] Ala Asn Ser Lys His Glu Leu Ala Lys Val Glu Asn Arg Asn Leu Ser
[0314] 385 390 395 400
[0315] Gly Tyr Ser Thr Leu Gln Ala Thr Val Arg His Ala His Trp Gly Asn
[0316] 405 410 415
[0317] Val Gly Asn Leu Thr Ala Arg Met Tyr Val Lys Thr Gly Ser Asn Tyr
[0318] 420 425 430
[0319] Ser Trp Phe Asn Gly Asp Pro Ile Pro Val Asn Ser Ala Asn Gly Thr
[0320] 435 440 445
[0321] Thr Val Thr Leu Pro Leu Ser Ser Ile Pro Asn Leu Asn Asp Val Lys
[0322] 450 455 460
[0323] Glu Ile Gly Val Glu Phe Ile Gly Ala Ser Asn Ser Asn Gly Gln Thr
[0324] 465 470 475 480
[0325] Ala Ile Tyr Leu Asp His Val Thr Ile Gln
[0326] 485 490
[0327] <210> 16
[0328] <211> 464
[0329] <212> PRT
[0330] <213> Bacillus hemicellulosilyticus
[0331] <400> 16
[0332] Gln Thr His Ser Gly Phe Tyr Ile Glu Gly Ser Thr Leu Tyr Asp Ala
[0333] 1 5 10 15
[0334] Asn Gly Glu Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp
[0335] 20 25 30

[0336] Tyr Lys His Asp Ser Asn Val Ala Ile Pro Ala Ile Ala Asn Gln Gly
[0337] 35 40 45
[0338] Ala Asn Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Ala Lys
[0339] 50 55 60
[0340] Asp Asp Ile Asn Thr Leu Asn Gln Val Leu Asp Leu Ala Glu Glu His
[0341] 65 70 75 80
[0342] Glu Met Ile Ala Val Val Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asn Ser
[0343] 85 90 95
[0344] Met Ala Asp Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp
[0345] 100 105 110
[0346] Ala Leu Ile Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu
[0347] 115 120 125
[0348] Trp Tyr Gly Ala Trp Asp Gly Gln Gly Trp Ala Asn Gly Tyr Lys Glu
[0349] 130 135 140
[0350] Val Ile Pro Arg Leu Arg Asn Ala Gly Phe Thr His Thr Leu Met Val
[0351] 145 150 155 160
[0352] Asp Ala Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly
[0353] 165 170 175
[0354] Gln Glu Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Ala Asn Thr Met Phe Ser Ile
[0355] 180 185 190
[0356] His Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Met Val Gln Ser Asn
[0357] 195 200 205
[0358] Ile Asp Gly Val Val Asp Gln Gly Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe
[0359] 210 215 220
[0360] Gly His Met His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ser
[0361] 225 230 235 240
[0362] Tyr Ser Gln Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly
[0363] 245 250 255
[0364] Asn Gly Thr Gln Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Tyr Asp Trp Gln Gly
[0365] 260 265 270
[0366] Thr Asn Leu Thr Ser Trp Gly Asn Thr Ile Val His Gly Pro Asn Gly
[0367] 275 280 285
[0368] Leu Leu Glu Thr Ser Ile Pro Ser Ser Ile Phe His Thr Ala Pro Asn
[0369] 290 295 300
[0370] Asn Gly Asp Pro Pro Pro His Asn Gly Asn Glu Thr Ile Leu Tyr Asp
[0371] 305 310 315 320
[0372] Phe Glu His Gly Thr Gln Gly Trp Ser Gly Ser Ser Leu Leu Gly Gly
[0373] 325 330 335
[0374] Pro Trp Thr Thr Asn Glu Trp Ser Thr Asn Gly Asn His Ser Leu Lys
[0375] 340 345 350
[0376] Ala Asp Ile Phe Leu Ser Ala Asn Ser Lys His Glu Leu Ala Lys Val
[0377] 355 360 365

[0378] Glu Asn Arg Asn Leu Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Gln Ala Thr Val Arg
[0379] 370 375 380
[0380] His Ala His Trp Gly Asn Val Gly Asn Leu Thr Ala Arg Met Tyr Val
[0381] 385 390 395 400
[0382] Lys Thr Gly Ser Asn Tyr Ser Trp Phe Asn Gly Asp Pro Ile Pro Val
[0383] 405 410 415
[0384] Asn Ser Ala Asn Gly Thr Thr Val Thr Leu Pro Leu Ser Ser Ile Pro
[0385] 420 425 430
[0386] Asn Leu Asn Asp Val Lys Glu Ile Gly Val Glu Phe Ile Gly Ala Ser
[0387] 435 440 445
[0388] Asn Ser Asn Gly Gln Thr Ala Ile Tyr Leu Asp His Val Thr Ile Gln
[0389] 450 455 460
[0390] <210> 17
[0391] <211> 1449
[0392] <212> DNA
[0393] <213> Virgibacillus soli
[0394] <400> 17
[0395] atgttattct ctacttcact gtttacttct acttcaaaag cgaatgcagc aagcgggttt 60
[0396] tatgtaaacg gaaacacact ctatgacgca acaggtaccc cttttgtgat aagaggaatc 120
[0397] aatcatgctc actcttggtt taaagacgac acagcaaccg caatacctgc cattgcagca 180
[0398] actggggcga atactattag aatcgtatta tcggatggca gccaatatag tcgggatgat 240
[0399] attgatggcg tgaggaatct aatatcattg gctgaggaaa ataatctaat tgctatgtta 300
[0400] gaggtccacg atgctactgg aaaagatgat atcagctcat tagatagtgc ggcagattat 360
[0401] tggattagta taaaagaagc acttatcggc aaggaagaca aagtcctaat aaacatcgca 420
[0402] aatgaatggt acggtacttg ggatggggct agttgggcgg atggctacaa acaagtgatt 480
[0403] cccaaattaa gaaatgcagg acttaaccac acactaatag tagactctgc tggctggggg 540
[0404] caatttccgg agtccattca caattacgga aaagaagtat tcaatgctga ccccctacaa 600
[0405] aatacaatgt tctctattca tatgtatgaa tatgctggtg gggacgcttc tactgtcaaa 660
[0406] gcaaatattg acggtgtatt aaatcaaggt ctagccgtaa tcattggaga atttggacat 720
[0407] aggcatacag acggagatgt agatgaagca acaattatga attattccca agagaaaaat 780
[0408] gttggctggc tcgcatggtc gtggaaaggt aatggcatgg aatgggatta tttagactta 840
[0409] tcctatgatt gggccggaaa taacctaacc gactggggaa ataccattgt aaatagtaca 900
[0410] aacggcttaa aagctacatc tgaaataagt ccagtatttg gagatggaga tgacggtgta 960
[0411] ggcgacggtg gtcctgggga ttctaacgga actgaaacta cgctttataa cttcgaaacc 1020
[0412] gggacagaag gatggagcgg cgaaaatata gaaactggac cttggtcagt gaatgagtgg 1080
[0413] gcagcaaaag gtaaccactc tttaaaagct gatgttaatt tgggtgataa ctctgaacat 1140
[0414] tatctatacc taactcaaaa cctaaatttt agcggaaagt cacaactcac agcgactgta 1200
[0415] aagcatgctg attggggaaa cttcggggat gaaataaatg caaagttata tgtaaaaaca 1260
[0416] gaatcagatt ggcaatggtt tgatggagga attgaaaaga tcaattcttc aattggaact 1320
[0417] attataacct tagatttatc atcgctctca aacccaagtg atattaaaga agttggtgtt 1380
[0418] cagtttacgg gttcttcaaa tagttatggc ctaacagctt tatatgttga taacgttacc 1440
[0419] attaaataa 1449

[0420] <210> 18

[0421] <211> 1401

[0422] <212> DNA

[0423] <213> Virgibacillus soli

[0424] <400> 18

[0425] gcctcgggct tctacgtcaa cggcaacact ctctacgacg ccacgggcac cccatttgtc 60

[0426] atccgcggca tcaaccacgc tcactcgtgg ttcaaggacg acactgccac cgctatccct 120

[0427] gctatcgctg ctacgggcgc caacacgatc cgcatcgtcc tcagcgacgg ctcgcagtac 180

[0428] tcccgcgacg acatcgacgg cgtccgcaac ctcatctccc tggccgagga gaacaacctc 240

[0429] atcgccatgc tggaggtcca cgacgctacc ggcaaggacg acatcagctc gctggacagc 300

[0430] gccgccgact actggatctc gatcaaggaa gccctcatcg gcaaggaaga caaggtcctg 360

[0431] atcaacatcg ccaacgagtg gtacggcacc tgggacggcg ctagctgggc tgacggctac 420

[0432] aagcaggtca tccctaagct ccgcaacgcc ggcctcaacc acacgctcat cgtcgactcg 480

[0433] gctggctggg gccagttccc ggagagcatc cacaactacg gcaaggaagt cttcaacgcc 540

[0434] gacccccctgc agaacacgat gttctcgatc cacatgtacg agtacgccgg cggcgacgct 600

[0435] tccacggtca aggccaacat cgacggcgtc ctcaaccagg gcctggctgt catcatcggc 660

[0436] gagtttggcc accgccacac cgacggcgac gtcgacgagg ccaccatcat gaactacagc 720

[0437] caggagaaga acgtcggctg gctggcttgg agctggaagg gcaacggcat ggagtgggac 780

[0438] tacctcgacc tgagctacga ctgggccggc aacaacctca ccgactgggg caacacgatc 840

[0439] gtcaactcga ccaacggcct gaaggccacc tcggagatca gccctgtctt tggcgacggc 900

[0440] gacgacggcg tcggcgacgg tggccccggc gacagcaacg gcaccgagac gacgctgtac 960

[0441] aactttgaga cgggcaccga gggctggagc ggcgagaaca tcgagacggg cccttggtcg 1020

[0442] gtcaacgagt gggctgccaa gggcaaccac tccctcaagg ccgacgtcaa cctgggcgac 1080

[0443] aacagcgagc actacctcta cctgacgcag aacctcaact tctccggcaa gtcgcagctg 1140

[0444] acggctaccg tcaagcacgc tgactggggc aacttcggcg acgagatcaa cgccaagctc 1200

[0445] tacgtcaaga ccgagagcga ctggcagtgg ttcgacggtg gcatcgagaa gatcaactcc 1260

[0446] agcatcggca ccatcatcac gctcgacctg tcgtccctgt cgaacccgtc cgacatcaag 1320

[0447] gaagtcggcg tccagttcac tggctcgtct aactcttacg gcctcactgc tctttacgtc 1380

[0448] gacaacgtca ctatcaagta g 1401

[0449] <210> 19

[0450] <211> 482

[0451] <212> PRT

[0452] <213> Virgibacillus soli

[0453] <400> 19

[0454] Met Leu Phe Ser Thr Ser Leu Phe Thr Ser Thr Ser Lys Ala Asn Ala

[0455] 1 5 10 15

[0456] Ala Ser Gly Phe Tyr Val Asn Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Ala Thr Gly

[0457] 20 25 30

[0458] Thr Pro Phe Val Ile Arg Gly Ile Asn His Ala His Ser Trp Phe Lys

[0459] 35 40 45

[0460] Asp Asp Thr Ala Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Ala Thr Gly Ala Asn

[0461] 50 55 60

[0462] Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Ser Gln Tyr Ser Arg Asp Asp
[0463] 65 70 75 80
[0464] Ile Asp Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Glu Asn Asn Leu
[0465] 85 90 95
[0466] Ile Ala Met Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Lys Asp Asp Ile Ser
[0467] 100 105 110
[0468] Ser Leu Asp Ser Ala Ala Asp Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Glu Ala Leu
[0469] 115 120 125
[0470] Ile Gly Lys Glu Asp Lys Val Leu Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr
[0471] 130 135 140
[0472] Gly Thr Trp Asp Gly Ala Ser Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Val Ile
[0473] 145 150 155 160
[0474] Pro Lys Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Ile Val Asp Ser
[0475] 165 170 175
[0476] Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Glu Ser Ile His Asn Tyr Gly Lys Glu
[0477] 180 185 190
[0478] Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Gln Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
[0479] 195 200 205
[0480] Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Ser Thr Val Lys Ala Asn Ile Asp
[0481] 210 215 220
[0482] Gly Val Leu Asn Gln Gly Leu Ala Val Ile Ile Gly Glu Phe Gly His
[0483] 225 230 235 240
[0484] Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Asn Tyr Ser
[0485] 245 250 255
[0486] Gln Glu Lys Asn Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly
[0487] 260 265 270
[0488] Met Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Tyr Asp Trp Ala Gly Asn Asn
[0489] 275 280 285
[0490] Leu Thr Asp Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Ser Thr Asn Gly Leu Lys
[0491] 290 295 300
[0492] Ala Thr Ser Glu Ile Ser Pro Val Phe Gly Asp Gly Asp Asp Gly Val
[0493] 305 310 315 320
[0494] Gly Asp Gly Gly Pro Gly Asp Ser Asn Gly Thr Glu Thr Thr Leu Tyr
[0495] 325 330 335
[0496] Asn Phe Glu Thr Gly Thr Glu Gly Trp Ser Gly Glu Asn Ile Glu Thr
[0497] 340 345 350
[0498] Gly Pro Trp Ser Val Asn Glu Trp Ala Ala Lys Gly Asn His Ser Leu
[0499] 355 360 365
[0500] Lys Ala Asp Val Asn Leu Gly Asp Asn Ser Glu His Tyr Leu Tyr Leu
[0501] 370 375 380
[0502] Thr Gln Asn Leu Asn Phe Ser Gly Lys Ser Gln Leu Thr Ala Thr Val
[0503] 385 390 395 400

[0504] Lys His Ala Asp Trp Gly Asn Phe Gly Asp Glu Ile Asn Ala Lys Leu
[0505] 405 410 415
[0506] Tyr Val Lys Thr Glu Ser Asp Trp Gln Trp Phe Asp Gly Gly Ile Glu
[0507] 420 425 430
[0508] Lys Ile Asn Ser Ser Ile Gly Thr Ile Ile Thr Leu Asp Leu Ser Ser
[0509] 435 440 445
[0510] Leu Ser Asn Pro Ser Asp Ile Lys Glu Val Gly Val Gln Phe Thr Gly
[0511] 450 455 460
[0512] Ser Ser Asn Ser Tyr Gly Leu Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr
[0513] 465 470 475 480
[0514] Ile Lys
[0515] <210> 20
[0516] <211> 466
[0517] <212> PRT
[0518] <213> Virgibacillus soli
[0519] <400> 20
[0520] Ala Ser Gly Phe Tyr Val Asn Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Ala Thr Gly
[0521] 1 5 10 15
[0522] Thr Pro Phe Val Ile Arg Gly Ile Asn His Ala His Ser Trp Phe Lys
[0523] 20 25 30
[0524] Asp Asp Thr Ala Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Ala Thr Gly Ala Asn
[0525] 35 40 45
[0526] Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Ser Gln Tyr Ser Arg Asp Asp
[0527] 50 55 60
[0528] Ile Asp Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Glu Asn Asn Leu
[0529] 65 70 75 80
[0530] Ile Ala Met Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Lys Asp Asp Ile Ser
[0531] 85 90 95
[0532] Ser Leu Asp Ser Ala Ala Asp Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Glu Ala Leu
[0533] 100 105 110
[0534] Ile Gly Lys Glu Asp Lys Val Leu Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr
[0535] 115 120 125
[0536] Gly Thr Trp Asp Gly Ala Ser Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Val Ile
[0537] 130 135 140
[0538] Pro Lys Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Ile Val Asp Ser
[0539] 145 150 155 160
[0540] Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Glu Ser Ile His Asn Tyr Gly Lys Glu
[0541] 165 170 175
[0542] Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Gln Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
[0543] 180 185 190
[0544] Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Ser Thr Val Lys Ala Asn Ile Asp
[0545] 195 200 205

[0546] Gly Val Leu Asn Gln Gly Leu Ala Val Ile Ile Gly Glu Phe Gly His
[0547] 210 215 220
[0548] Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Asn Tyr Ser
[0549] 225 230 235 240
[0550] Gln Glu Lys Asn Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly
[0551] 245 250 255
[0552] Met Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Tyr Asp Trp Ala Gly Asn Asn
[0553] 260 265 270
[0554] Leu Thr Asp Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Ser Thr Asn Gly Leu Lys
[0555] 275 280 285
[0556] Ala Thr Ser Glu Ile Ser Pro Val Phe Gly Asp Gly Asp Asp Gly Val
[0557] 290 295 300
[0558] Gly Asp Gly Gly Pro Gly Asp Ser Asn Gly Thr Glu Thr Thr Leu Tyr
[0559] 305 310 315 320
[0560] Asn Phe Glu Thr Gly Thr Glu Gly Trp Ser Gly Glu Asn Ile Glu Thr
[0561] 325 330 335
[0562] Gly Pro Trp Ser Val Asn Glu Trp Ala Ala Lys Gly Asn His Ser Leu
[0563] 340 345 350
[0564] Lys Ala Asp Val Asn Leu Gly Asp Asn Ser Glu His Tyr Leu Tyr Leu
[0565] 355 360 365
[0566] Thr Gln Asn Leu Asn Phe Ser Gly Lys Ser Gln Leu Thr Ala Thr Val
[0567] 370 375 380
[0568] Lys His Ala Asp Trp Gly Asn Phe Gly Asp Glu Ile Asn Ala Lys Leu
[0569] 385 390 395 400
[0570] Tyr Val Lys Thr Glu Ser Asp Trp Gln Trp Phe Asp Gly Gly Ile Glu
[0571] 405 410 415
[0572] Lys Ile Asn Ser Ser Ile Gly Thr Ile Ile Thr Leu Asp Leu Ser Ser
[0573] 420 425 430
[0574] Leu Ser Asn Pro Ser Asp Ile Lys Glu Val Gly Val Gln Phe Thr Gly
[0575] 435 440 445
[0576] Ser Ser Asn Ser Tyr Gly Leu Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr
[0577] 450 455 460
[0578] Ile Lys
[0579] 465
[0580] <210> 21
[0581] <211> 60
[0582] <212> DNA
[0583] <213> Artificial Sequence
[0584] <220>
[0585] <223> primer
[0586] <400> 21
[0587] agtcaatcgc gacaagcgcc agacccactc gggcttctac atcgagggct cgacgctcta 60

[0588] <210> 22
[0589] <211> 46
[0590] <212> DNA
[0591] <213> Artificial Sequence
[0592] <220>
[0593] <223> primer
[0594] <400> 22
[0595] cgcgccggat ccttactgga tcgtgacgtg gtccaggtag atggcg 46
[0596] <210> 23
[0597] <211> 60
[0598] <212> DNA
[0599] <213> Artificial Sequence
[0600] <220>
[0601] <223> primer
[0602] <400> 23
[0603] agtcaatcgc gacaagcgcc agaacggctt ccacgtctcc ggcacggagc tcctggacaa 60
[0604] <210> 24
[0605] <211> 51
[0606] <212> DNA
[0607] <213> Artificial Sequence
[0608] <220>
[0609] <223> primer
[0610] <400> 24
[0611] cgcgccggat ccttagtcgc tcttcaggcc gttctcgccg tagacgatgc g 51
[0612] <210> 25
[0613] <211> 1846
[0614] <212> DNA
[0615] <213> Bacillus pumilus
[0616] <400> 25
[0617] atgaaaaaat gggttcaacg ggtggcttgt tttatgctgc tgatcacttt atgggcgggt 60
[0618] tggttcactc tgaccgtaaa ggcctcctcc tatgtgcaaa catctggtac acattttgta 120
[0619] ttgaacaacc acccatttta ctttgctggc acaaataatt attatttcca ttacaaatca 180
[0620] aaaaagatgg tagatgctgt ttttgacgat atgaaggcaa tggatttaaa ggttattcgt 240
[0621] atttggggat ttcacgatgg tacccctcaa gaaaactcag tcttacaatc tcgtccaggt 300
[0622] gtttatgaag aatccggttt tcaaaaacta gactatgcga tttataaagc agggcaggaa 360
[0623] ggaatcaagc tggtcatacc gctcgtgaac aattgggatg actttggcgg gatgaatcaa 420
[0624] tatgtgaagt ggtttcaggc aggatcacat gatcactttt atacagattc tcggattaaa 480
[0625] acagcttaca aaaactatgt gcgctatgta ttagagagaa ccaatacgta ctcaggtgtt 540
[0626] caatataaag atgaccctgc tattatgaca tgggagctcg ccaatgagcc gcgcgctcag 600
[0627] tcagaccctt cgggagatat actagtaaac tgggcagatg aaatgagtgc atggatcaaa 660
[0628] tcaattgact cgaatcatct tgttgctgta ggagacgaag ggttctttcg catgacaggt 720
[0629] catgatgatt ggttttacag tggaggagaa ggtgttgatt gggatcgttt gactgctctc 780

[0630] cctcatattg attatggaac ctatcattta tacccggatc actggaatca gtctgctgca 840
[0631] tggggagtga aatggatcaa agatcatatc acccgaggaa acgcaatcgg aaaacctgtt 900
[0632] gtattagaag agtttggcta tcaaaatcaa gcagcccgtc ctgatgtata tgatagctgg 960
[0633] ctgaagacaa ttgaacagct cggaggcgca ggtagccaat tttggatttt aacaagcatt 1020
[0634] caagacgatg attccctcta cccggattat gatggttttc gagttttaaa ggagagccgg 1080
[0635] gaggcaggaa ttattcgtga acacgccaaa agaatgaatg aaaagaactg atgaagaatg 1140
[0636] cctgtttata aggaacttca tttgcataaa aaaattggat atggtatagt ttttatggaa 1200
[0637] atgctaacga ttaccgagac aagagtgggg aaacccgctc ttttgtattg aacaggcaat 1260
[0638] ttttgtctcg acattattca tccgttttct gctccccctg ctcacaataa agcagggttt 1320
[0639] ttatgcagaa tgattgataa gagcgtttat cgaaagcaca aggaggaaga gaatgagcaa 1380
[0640] aaaagtagtg gatatcgtaa gcgacatggt gcagccaatt ttagatggct tacagcttga 1440
[0641] actcgttgat gttgaatttg tcaaagaggg tcaaaactgg ttccttcgcg tatttattga 1500
[0642] ctctgataaa ggcgtcgata tcgaggagtg tgccaaagtg agcgaagcct tgagcgaaaa 1560
[0643] gcttgatgag gcagatccaa ttagccaaaa ctactttctt gaagtgtcct ctcctggagc 1620
[0644] ggagcgccca ttaaagaaaa aagctgattt tgaaaaagca cttggaaaaa atgttttcat 1680
[0645] gaaaacatac gaaccaattg atggtgaaaa ggcatttgaa ggtgagctta caagctttga 1740
[0646] tggtgagatt gcaacagtga cagtgaagat caagacaaga aagaaagaga tcaatattcc 1800
[0647] atacgaaaaa attgctaacg caagattagc agtttcgttc aattaa 1846
[0648] <210> 26
[0649] <211> 376
[0650] <212> PRT
[0651] <213> Bacillus pumilus
[0652] <400> 26
[0653] Met Lys Lys Trp Val Gln Arg Val Ala Cys Phe Met Leu Leu Ile Thr
[0654] 1 5 10 15
[0655] Leu Trp Ala Gly Trp Phe Thr Leu Thr Val Lys Ala Ser Ser Tyr Val
[0656] 20 25 30
[0657] Gln Thr Ser Gly Thr His Phe Val Leu Asn Asn His Pro Phe Tyr Phe
[0658] 35 40 45
[0659] Ala Gly Thr Asn Asn Tyr Tyr Phe His Tyr Lys Ser Lys Lys Met Val
[0660] 50 55 60
[0661] Asp Ala Val Phe Asp Asp Met Lys Ala Met Asp Leu Lys Val Ile Arg
[0662] 65 70 75 80
[0663] Ile Trp Gly Phe His Asp Gly Thr Pro Gln Glu Asn Ser Val Leu Gln
[0664] 85 90 95
[0665] Ser Arg Pro Gly Val Tyr Glu Glu Ser Gly Phe Gln Lys Leu Asp Tyr
[0666] 100 105 110
[0667] Ala Ile Tyr Lys Ala Gly Gln Glu Gly Ile Lys Leu Val Ile Pro Leu
[0668] 115 120 125
[0669] Val Asn Asn Trp Asp Asp Phe Gly Gly Met Asn Gln Tyr Val Lys Trp
[0670] 130 135 140
[0671] Phe Gln Ala Gly Ser His Asp His Phe Tyr Thr Asp Ser Arg Ile Lys

[0672] 145 150 155 160
[0673] Thr Ala Tyr Lys Asn Tyr Val Arg Tyr Val Leu Glu Arg Thr Asn Thr
[0674] 165 170 175
[0675] Tyr Ser Gly Val Gln Tyr Lys Asp Asp Pro Ala Ile Met Thr Trp Glu
[0676] 180 185 190
[0677] Leu Ala Asn Glu Pro Arg Ala Gln Ser Asp Pro Ser Gly Asp Ile Leu
[0678] 195 200 205
[0679] Val Asn Trp Ala Asp Glu Met Ser Ala Trp Ile Lys Ser Ile Asp Ser
[0680] 210 215 220
[0681] Asn His Leu Val Ala Val Gly Asp Glu Gly Phe Phe Arg Met Thr Gly
[0682] 225 230 235 240
[0683] His Asp Asp Trp Phe Tyr Ser Gly Gly Glu Gly Val Asp Trp Asp Arg
[0684] 245 250 255
[0685] Leu Thr Ala Leu Pro His Ile Asp Tyr Gly Thr Tyr His Leu Tyr Pro
[0686] 260 265 270
[0687] Asp His Trp Asn Gln Ser Ala Ala Trp Gly Val Lys Trp Ile Lys Asp
[0688] 275 280 285
[0689] His Ile Thr Arg Gly Asn Ala Ile Gly Lys Pro Val Val Leu Glu Glu
[0690] 290 295 300
[0691] Phe Gly Tyr Gln Asn Gln Ala Ala Arg Pro Asp Val Tyr Asp Ser Trp
[0692] 305 310 315 320
[0693] Leu Lys Thr Ile Glu Gln Leu Gly Gly Ala Gly Ser Gln Phe Trp Ile
[0694] 325 330 335
[0695] Leu Thr Ser Ile Gln Asp Asp Asp Ser Leu Tyr Pro Asp Tyr Asp Gly
[0696] 340 345 350
[0697] Phe Arg Val Leu Lys Glu Ser Arg Glu Ala Gly Ile Ile Arg Glu His
[0698] 355 360 365
[0699] Ala Lys Arg Met Asn Glu Lys Asn
[0700] 370 375
[0701] <210> 27
[0702] <211> 1083
[0703] <212> DNA
[0704] <213> Bacillus amyloliquefaciens
[0705] <400> 27
[0706] atgctcaaaa agttcgcagt ctgtctgtct atcattttat tactcatctc agccgcccgt 60
[0707] ccgatatcgg ctcacaccgt ttaccctgtc aatcccaatg cccagcagac gacaaaagac 120
[0708] gtcatgaact ggctggcgca tttgcccaac cgttcagaaa acagggtcat gtccggtgca 180
[0709] ttcggcgggt acagcgatgt cacctttca atgacggagg aaaaccgctt gaaaaacgcg 240
[0710] acgggacagt ctcccgccat ctacggctgt gattatggga gagggtggct ggaaacatcg 300
[0711] gatatcaccg attctatcga ctacagctgc aacagcagcc tcatttcgta ctggaaaagc 360
[0712] ggcggcctcc ctcaggtcag cctgcatctc gcaaatccgg cctttccatc aggacactat 420
[0713] aaaacggcca tttcaaacag ccagtataaa aatatcctga acccttcaac tgttgaagga 480

[0714] cggcggcttg aggccttgct cagcaaaatc gccgacggcc ttactcagct gaaaaatcaa 540
[0715] ggcgtcaccg ttctgttcag gccgctgcat gagatgaacg gtgaatggtt ctggtggggg 600
[0716] ctgacaggct acaaccaaaa agacactgag agaatctcgc tgtacaaaga gctttacaag 660
[0717] aagatatacc gctatatgac agagacaaga ggattggata atcttttgtg ggtgtattcg 720
[0718] cctgatgcca acagagactt caaaacagac ttctacccag gctcatctta tgtggatatt 780
[0719] accggactgg atgcttactt caccgacccg tatgcgatat caggctatga tgaaatgctg 840
[0720] tctctgaaaa aaccgtttgc ctttgccgag accggtccgt ccggtaatat cggaagcttt 900
[0721] gattacgctg tttttatcaa tgcgatcagg caaaagtatc ccgagacaac ctacttttg 960
[0722] acatgggatg aacaattaag cccggcagcc aatcaaggcg cgcaaagcct ttatcaaaac 1020
[0723] agctggacgc tgaacaaggg cgaaatgtgg aatggcggaa ccttgacgcc gatcgcggaa 1080
[0724] taa 1083
[0725] <210> 28
[0726] <211> 360
[0727] <212> PRT
[0728] <213> Bacillus amyloliquefaciens
[0729] <400> 28
[0730] Met Leu Lys Lys Phe Ala Val Cys Leu Ser Ile Ile Leu Leu Leu Ile
[0731] 1 5 10 15
[0732] Ser Ala Ala Arg Pro Ile Ser Ala His Thr Val Tyr Pro Val Asn Pro
[0733] 20 25 30
[0734] Asn Ala Gln Gln Thr Thr Lys Asp Val Met Asn Trp Leu Ala His Leu
[0735] 35 40 45
[0736] Pro Asn Arg Ser Glu Asn Arg Val Met Ser Gly Ala Phe Gly Gly Tyr
[0737] 50 55 60
[0738] Ser Asp Val Thr Phe Ser Met Thr Glu Glu Asn Arg Leu Lys Asn Ala
[0739] 65 70 75 80
[0740] Thr Gly Gln Ser Pro Ala Ile Tyr Gly Cys Asp Tyr Gly Arg Gly Trp
[0741] 85 90 95
[0742] Leu Glu Thr Ser Asp Ile Thr Asp Ser Ile Asp Tyr Ser Cys Asn Ser
[0743] 100 105 110
[0744] Ser Leu Ile Ser Tyr Trp Lys Ser Gly Gly Leu Pro Gln Val Ser Leu
[0745] 115 120 125
[0746] His Leu Ala Asn Pro Ala Phe Pro Ser Gly His Tyr Lys Thr Ala Ile
[0747] 130 135 140
[0748] Ser Asn Ser Gln Tyr Lys Asn Ile Leu Asn Pro Ser Thr Val Glu Gly
[0749] 145 150 155 160
[0750] Arg Arg Leu Glu Ala Leu Leu Ser Lys Ile Ala Asp Gly Leu Thr Gln
[0751] 165 170 175
[0752] Leu Lys Asn Gln Gly Val Thr Val Leu Phe Arg Pro Leu His Glu Met
[0753] 180 185 190
[0754] Asn Gly Glu Trp Phe Trp Trp Gly Leu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Asp
[0755] 195 200 205

[0756] Thr Glu Arg Ile Ser Leu Tyr Lys Glu Leu Tyr Lys Lys Ile Tyr Arg
[0757] 210 215 220
[0758] Tyr Met Thr Glu Thr Arg Gly Leu Asp Asn Leu Leu Trp Val Tyr Ser
[0759] 225 230 235 240
[0760] Pro Asp Ala Asn Arg Asp Phe Lys Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Ser Ser
[0761] 245 250 255
[0762] Tyr Val Asp Ile Thr Gly Leu Asp Ala Tyr Phe Thr Asp Pro Tyr Ala
[0763] 260 265 270
[0764] Ile Ser Gly Tyr Asp Glu Met Leu Ser Leu Lys Lys Pro Phe Ala Phe
[0765] 275 280 285
[0766] Ala Glu Thr Gly Pro Ser Gly Asn Ile Gly Ser Phe Asp Tyr Ala Val
[0767] 290 295 300
[0768] Phe Ile Asn Ala Ile Arg Gln Lys Tyr Pro Glu Thr Thr Tyr Phe Leu
[0769] 305 310 315 320
[0770] Thr Trp Asp Glu Gln Leu Ser Pro Ala Ala Asn Gln Gly Ala Gln Ser
[0771] 325 330 335
[0772] Leu Tyr Gln Asn Ser Trp Thr Leu Asn Lys Gly Glu Met Trp Asn Gly
[0773] 340 345 350
[0774] Gly Thr Leu Thr Pro Ile Ala Glu
[0775] 355 360
[0776] <210> 29
[0777] <211> 1494
[0778] <212> DNA
[0779] <213> Amphibacillus xylanus
[0780] <400> 29
[0781] gtgaagttaa ctaaactaaa actattgagt agtgtatttt ttgttgtatt aactgtgtta 60
[0782] atgttgtttg tccctgggaa tattgtgaat gtaaaagctg ctaacggctt ttatgtaagc 120
[0783] gattccaatc tgtatgatgc aaatggaaat caatttgtta tgcgtggggt taatcatgcc 180
[0784] cattcatggt ataaggacac gtataccgag gcaattcctg caattgcggc tacaggagcg 240
[0785] aatactatcc gaattgtatt atctgatgga gggcaatacc aaaaagatga tataaacata 300
[0786] gtcagaaatt tgattgaaac cgcagaagcc aataatttag tcgctgtact tgaggttcat 360
[0787] gatgctactg ggtcggattc attatcggat ttgaaccggg ctgtagatta ttggattgaa 420
[0788] attaaagatg cgttaattgg taaagaagat acggtgatca taaacattgt caatgaatgg 480
[0789] tatggcactt gggatggtcg tctctgggca gatggttata aacaggcgat accgagatta 540
[0790] agagatgctg gattaacaca tacgttgatg attgatgcag caggttgggg gcaatttcct 600
[0791] agctcgatcc atcaatatgg tagagaagta tttaatgcag atcgtttagg gaatacaatg 660
[0792] ttttcgattc atatgtatga atatgctggc ggtgatgatc aaatggttag agataatatt 720
[0793] aacggtgtga tcaatcaaga cttagctcta gtgattggtg aatttggtca ttatcacaca 780
[0794] gatggcgatg ttgatgaaga tacgattttg agttacgcgg agcagacagg tgttggttgg 840
[0795] ttagcatggt catggaaagg caatggaact gagtgggagt atcttgatct atcaaatgat 900
[0796] tggggaggaa attatttaac atcttggggt gacaggattg taaatggagc aaatggatta 960
[0797] agagaaacga gtcaaattgc ttctgttttt tcaggaaaca atggcgggac tcctggaaat 1020

[0798] ggtgaggaag agactcctgg tgatgtaagt catttcgcaa acttcgagaa tggtactgaa 1080
[0799] ggttgggaag caagcaatgt atctggtgga ccttgggcaa caaatgaatg gagtgctagt 1140
[0800] ggttcatatg ctttaaaagc cgatgcgcaa ttagcatctg gaagagaaca ctatttatat 1200
[0801] cgaatcggtc cctttaattt atctgggtca acattaaacg caacggtaag gggtgctaat 1260
[0802] tgggggaatt atggatctgg tatcgacgtg aagctatacg ttaagtacgg agatggctgg 1320
[0803] acgtggagag atagtggtgt acagacaatt agagcgggag aatctattga tctatcacta 1380
[0804] gatttatcaa atgttgatcg ctcaaacatt agagaagttg gtatccagtt tattggtgga 1440
[0805] aatcattcat ctggaaaaac cgctttttat gttgatcatg tttattcaca ttag 1494
[0806] <210> 30
[0807] <211> 497
[0808] <212> PRT
[0809] <213> Amphibacillus xylanus
[0810] <400> 30
[0811] Val Lys Leu Thr Lys Leu Lys Leu Leu Ser Ser Val Phe Phe Val Val
[0812] 1 5 10 15
[0813] Leu Thr Val Leu Met Leu Phe Val Pro Gly Asn Ile Val Asn Val Lys
[0814] 20 25 30
[0815] Ala Ala Asn Gly Phe Tyr Val Ser Asp Ser Asn Leu Tyr Asp Ala Asn
[0816] 35 40 45
[0817] Gly Asn Gln Phe Val Met Arg Gly Val Asn His Ala His Ser Trp Tyr
[0818] 50 55 60
[0819] Lys Asp Thr Tyr Thr Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Ala Thr Gly Ala
[0820] 65 70 75 80
[0821] Asn Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Tyr Gln Lys Asp
[0822] 85 90 95
[0823] Asp Ile Asn Ile Val Arg Asn Leu Ile Glu Thr Ala Glu Ala Asn Asn
[0824] 100 105 110
[0825] Leu Val Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp Ser Leu
[0826] 115 120 125
[0827] Ser Asp Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Ile Lys Asp Ala
[0828] 130 135 140
[0829] Leu Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Val Asn Glu Trp
[0830] 145 150 155 160
[0831] Tyr Gly Thr Trp Asp Gly Arg Leu Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala
[0832] 165 170 175
[0833] Ile Pro Arg Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Met Ile Asp
[0834] 180 185 190
[0835] Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Ser Ser Ile His Gln Tyr Gly Arg
[0836] 195 200 205
[0837] Glu Val Phe Asn Ala Asp Arg Leu Gly Asn Thr Met Phe Ser Ile His
[0838] 210 215 220
[0839] Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Asp Gln Met Val Arg Asp Asn Ile

[0840] 225 230 235 240
[0841] Asn Gly Val Ile Asn Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly
[0842] 245 250 255
[0843] His Tyr His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr
[0844] 260 265 270
[0845] Ala Glu Gln Thr Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn
[0846] 275 280 285
[0847] Gly Thr Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Gly Gly Asn
[0848] 290 295 300
[0849] Tyr Leu Thr Ser Trp Gly Asp Arg Ile Val Asn Gly Ala Asn Gly Leu
[0850] 305 310 315 320
[0851] Arg Glu Thr Ser Gln Ile Ala Ser Val Phe Ser Gly Asn Asn Gly Gly
[0852] 325 330 335
[0853] Thr Pro Gly Asn Gly Glu Glu Glu Thr Pro Gly Asp Val Ser His Phe
[0854] 340 345 350
[0855] Ala Asn Phe Glu Asn Gly Thr Glu Gly Trp Glu Ala Ser Asn Val Ser
[0856] 355 360 365
[0857] Gly Gly Pro Trp Ala Thr Asn Glu Trp Ser Ala Ser Gly Ser Tyr Ala
[0858] 370 375 380
[0859] Leu Lys Ala Asp Ala Gln Leu Ala Ser Gly Arg Glu His Tyr Leu Tyr
[0860] 385 390 395 400
[0861] Arg Ile Gly Pro Phe Asn Leu Ser Gly Ser Thr Leu Asn Ala Thr Val
[0862] 405 410 415
[0863] Arg Gly Ala Asn Trp Gly Asn Tyr Gly Ser Gly Ile Asp Val Lys Leu
[0864] 420 425 430
[0865] Tyr Val Lys Tyr Gly Asp Gly Trp Thr Trp Arg Asp Ser Gly Val Gln
[0866] 435 440 445
[0867] Thr Ile Arg Ala Gly Glu Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asp Leu Ser Asn
[0868] 450 455 460
[0869] Val Asp Arg Ser Asn Ile Arg Glu Val Gly Ile Gln Phe Ile Gly Gly
[0870] 465 470 475 480
[0871] Asn His Ser Ser Gly Lys Thr Ala Phe Tyr Val Asp His Val Tyr Ser
[0872] 485 490 495
[0873] His
[0874] <210> 31
[0875] <211> 1767
[0876] <212> DNA
[0877] <213> Paenibacillus polymyxa
[0878] <400> 31
[0879] atgaaaaaac tactgtcttg tctcatttcg ctgtcaatgc ttgtgtatat cttaccgaca 60
[0880] atgatagtgt ccgctaacaa tgatggcgta acgaaccttg ctcttgattc aacacctagt 120
[0881] gcgcaaagtg atattatttc tgatgctgtc tacaaaatca cagctcagca ttcaggaaaa 180

[0882] agccttgagg ttgaaggcgg ttctaaagat gacggcgcga atgttcaaca atggacagat 240
[0883] aacgggaaag aacagcagaa atggagagtt gtggacgtcg gtggcggata ttacaagctc 300
[0884] atcagtcaat ctagcggaaa agcactggat gtggcaggtg gtaatacaca tgatggtgcc 360
[0885] aatgtgcaac agtggacgga caacggaaat gctcagcaaa agtggaagat catcgatgta 420
[0886] ggaggaggct attataagtt gatctcacaa agctctggaa aggcactcga cgtcgttggt 480
[0887] ggttatacgc acgacggggc caatgtgcag caatgggcag acaatggatc tgctcaacag 540
[0888] cgctggcgtt tcacacaaat tgatacaacc acggatacga cgccgccaac agcaccaacg 600
[0889] aatttacaat catcatcgaa aacaagtacc tctgtaacat tgacttggac cacaagcatt 660
[0890] gataatgtag gtgtgacagg ctatgtcatt tataatggaa cagatttggt cgggacttct 720
[0891] acaactacat cttatattgt tacaggatta acagcgaaca cttcctataa cttcactgtc 780
[0892] aaagcgaagg atgccgctgg gaatatttca gaaccatcaa atgtcttgaa agtcacaacg 840
[0893] agttcagatt cttctcaaaa cacaggtttt tatgtgaagg gcacaacatt atatgatgga 900
[0894] aacggtaatc catttgtgat gagaggaatc aatcatgcat acacatggta taaagggcaa 960
[0895] gaatcagtag caattcctgc gattgcgaaa acgggtgcaa acaccatccg gattgtctta 1020
[0896] tctgacggac agcagtggac aaaagatgat ttaagcgcgc ttcaaaattt gattacactc 1080
[0897] agtgagcaaa acaaacttgt agtgatttta gaggtgcacg acggtactgg caatgacaat 1140
[0898] gccgcagttt taaataaaat tgctgattat tggattgaaa tgaagtcagc tttaattggg 1200
[0899] aaggaaaata cagttatttt aaacatcgca aatgaatggt ttggtacatg ggatggaaac 1260
[0900] ggctgggcgc agggctacaa atcagtcata ccaaagctgc gaaatgcggg catcaaaaac 1320
[0901] acgattatgg tggatgcggc tggatgggga caatatccaa aatcgatttt tgattacgga 1380
[0902] acgcaagtgt tcgatgcaga tccgctcaag aatacgatgt tttccattca tatgtatgaa 1440
[0903] tacgcaggcg gcaacgcaga aacagtgaaa agtaatatcg acaacgtcct gaataaaaat 1500
[0904] cttgcactca tcattggaga atttggaatt aaacatacaa acggagatgt tgatgaagca 1560
[0905] acgatcatgt catacgcaca gcaaaaaggt gttgggtatc ttggctggtc atggaaagga 1620
[0906] aatggttcag gtcttgaata tttagatatg agtaacgatt gggctggcag cagttataca 1680
[0907] gagcaaggac atgccattat cgaaggacca aatggcattc gtgcaacatc aaaattatca 1740
[0908] accatttaca gcaatgggaa acaataa 1767
[0909] <210> 32
[0910] <211> 588
[0911] <212> PRT
[0912] <213> Paenibacillus polymyxa
[0913] <400> 32
[0914] Met Lys Lys Leu Leu Ser Cys Leu Ile Ser Leu Ser Met Leu Val Tyr
[0915] 1 5 10 15
[0916] Ile Leu Pro Thr Met Ile Val Ser Ala Asn Asn Asp Gly Val Thr Asn
[0917] 20 25 30
[0918] Leu Ala Leu Asp Ser Thr Pro Ser Ala Gln Ser Asp Ile Ile Ser Asp
[0919] 35 40 45
[0920] Ala Val Tyr Lys Ile Thr Ala Gln His Ser Gly Lys Ser Leu Glu Val
[0921] 50 55 60
[0922] Glu Gly Gly Ser Lys Asp Asp Gly Ala Asn Val Gln Gln Trp Thr Asp
[0923] 65 70 75 80

[0924] Asn Gly Lys Glu Gln Gln Lys Trp Arg Val Val Asp Val Gly Gly Gly
[0925] 85 90 95
[0926] Tyr Tyr Lys Leu Ile Ser Gln Ser Ser Gly Lys Ala Leu Asp Val Ala
[0927] 100 105 110
[0928] Gly Gly Asn Thr His Asp Gly Ala Asn Val Gln Gln Trp Thr Asp Asn
[0929] 115 120 125
[0930] Gly Asn Ala Gln Gln Lys Trp Lys Ile Ile Asp Val Gly Gly Gly Tyr
[0931] 130 135 140
[0932] Tyr Lys Leu Ile Ser Gln Ser Ser Gly Lys Ala Leu Asp Val Val Gly
[0933] 145 150 155 160
[0934] Gly Tyr Thr His Asp Gly Ala Asn Val Gln Gln Trp Ala Asp Asn Gly
[0935] 165 170 175
[0936] Ser Ala Gln Gln Arg Trp Arg Phe Thr Gln Ile Asp Thr Thr Thr Asp
[0937] 180 185 190
[0938] Thr Thr Pro Pro Thr Ala Pro Thr Asn Leu Gln Ser Ser Ser Lys Thr
[0939] 195 200 205
[0940] Ser Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Thr Thr Ser Ile Asp Asn Val Gly
[0941] 210 215 220
[0942] Val Thr Gly Tyr Val Ile Tyr Asn Gly Thr Asp Leu Val Gly Thr Ser
[0943] 225 230 235 240
[0944] Thr Thr Thr Ser Tyr Ile Val Thr Gly Leu Thr Ala Asn Thr Ser Tyr
[0945] 245 250 255
[0946] Asn Phe Thr Val Lys Ala Lys Asp Ala Ala Gly Asn Ile Ser Glu Pro
[0947] 260 265 270
[0948] Ser Asn Val Leu Lys Val Thr Thr Ser Ser Asp Ser Ser Gln Asn Thr
[0949] 275 280 285
[0950] Gly Phe Tyr Val Lys Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Gly Asn Gly Asn Pro
[0951] 290 295 300
[0952] Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Ala Tyr Thr Trp Tyr Lys Gly Gln
[0953] 305 310 315 320
[0954] Glu Ser Val Ala Ile Pro Ala Ile Ala Lys Thr Gly Ala Asn Thr Ile
[0955] 325 330 335
[0956] Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gln Gln Trp Thr Lys Asp Asp Leu Ser
[0957] 340 345 350
[0958] Ala Leu Gln Asn Leu Ile Thr Leu Ser Glu Gln Asn Lys Leu Val Val
[0959] 355 360 365
[0960] Ile Leu Glu Val His Asp Gly Thr Gly Asn Asp Asn Ala Ala Val Leu
[0961] 370 375 380
[0962] Asn Lys Ile Ala Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Ser Ala Leu Ile Gly
[0963] 385 390 395 400
[0964] Lys Glu Asn Thr Val Ile Leu Asn Ile Ala Asn Glu Trp Phe Gly Thr
[0965] 405 410 415

[0966] Trp Asp Gly Asn Gly Trp Ala Gln Gly Tyr Lys Ser Val Ile Pro Lys
[0967] 420 425 430
[0968] Leu Arg Asn Ala Gly Ile Lys Asn Thr Ile Met Val Asp Ala Ala Gly
[0969] 435 440 445
[0970] Trp Gly Gln Tyr Pro Lys Ser Ile Phe Asp Tyr Gly Thr Gln Val Phe
[0971] 450 455 460
[0972] Asp Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu
[0973] 465 470 475 480
[0974] Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Glu Thr Val Lys Ser Asn Ile Asp Asn Val
[0975] 485 490 495
[0976] Leu Asn Lys Asn Leu Ala Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Ile Lys His
[0977] 500 505 510
[0978] Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr Ala Gln Gln
[0979] 515 520 525
[0980] Lys Gly Val Gly Tyr Leu Gly Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly Ser Gly
[0981] 530 535 540
[0982] Leu Glu Tyr Leu Asp Met Ser Asn Asp Trp Ala Gly Ser Ser Tyr Thr
[0983] 545 550 555 560
[0984] Glu Gln Gly His Ala Ile Ile Glu Gly Pro Asn Gly Ile Arg Ala Thr
[0985] 565 570 575
[0986] Ser Lys Leu Ser Thr Ile Tyr Ser Asn Gly Lys Gln
[0987] 580 585
[0988] <210> 33
[0989] <211> 1470
[0990] <212> DNA
[0991] <213> Bacillus hemicellulosilyticus
[0992] <400> 33
[0993] atggatatat taagaaagtg tgtacttgta ctattggcct tactattgtt gttacctacg 60
[0994] acatcaacgg cattttctga aagcgcttct actaatgaga gagtgctaaa tttatctgat 120
[0995] ccgaatgcga cacgctatac gaaggaattg tttgcgtttc ttcaagacgt gagtggtgag 180
[0996] caagtgttgt tcgggcaaca gcatgcaaca gatgaagggt tgactctgac aggtgaagga 240
[0997] aatcgaattg gttcaactga gtcggaggtg aagaatgcag taggtgatta tccagctgtt 300
[0998] tttgggtggg atacgaacag cttggatggt cgtgaaaagc caggtacaga tgtggaaagt 360
[0999] caagagcaac gaattttaaa tacagcagaa tcgatgaaag tggcacatga attaggaggg 420
[1000] atcatcacat taagtatgca tccggataac tttgttaccg gtcattacta tggcgatacg 480
[1001] gatggtaacg tcgttcaaga aatattgcca ggtggctcca agcacaatga atttaacgct 540
[1002] tggctagata atattgctgc cctagcacat gaattagttg atgataatgg agagcctatt 600
[1003] ccggttatct tccgtccatt ccatgagcaa acaggttcgt ggttttggtg gggtgcgagc 660
[1004] acaacaactc ctgagcaata caaagcgatt tttcgatata cagtcgaata cttaagagat 720
[1005] gcaaagggtg ttcataactt tttatatgga ttctcccctg gtgcgggtcc tgctggcgat 780
[1006] ctagatcgat atttagaaac gtacccaggt gataattatg tcgatatctt aggtattgat 840
[1007] aattatgata gtaagtcaaa tgcggggtca gacgcttggt tatctggaat ggtaaaagat 900

[1008] ttagcgatga tctcgaaatt agcagaggaa agagggaagg tatcagcctt tactgaattt 960
[1009] ggatacagcg ctgaagggat gagtcaaacg ggtgatgcgt tagattggta tacacgtgtg 1020
[1010] ttaaatgcga taaaagcaga tgaagatgcg cgaaacatat cctacatgct aacgtgggct 1080
[1011] aactttgggt ggcctaataa tatatttgtt ccgtatcgtg atgtgaatgg ggatttaggt 1140
[1012] ggagatcatg agttattacc tgactttgta cagttttatg aagatgaata ctcagcattt 1200
[1013] cgtgaagata taaatgaaag tgtttacaat cgtaatgaga gttatattgt tgcggatcat 1260
[1014] gagccattta tgtatgttgt ttcccctacg acaggtacat atataacagg ctcgtctgtt 1320
[1015] gtcttacgag cgaaagtagt taacgatgag gatccgtccg ttacgtatca agtggcgggt 1380
[1016] tctgaagaag tctatgagat gactttagat gaaaatgggt attactctgc tgattatatt 1440
[1017] cctactgctc ctaagaatgg agctctgtag 1470
[1018] <210> 34
[1019] <211> 489
[1020] <212> PRT
[1021] <213> Bacillus hemicellulosilyticus
[1022] <400> 34
[1023] Met Asp Ile Leu Arg Lys Cys Val Leu Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu
[1024] 1 5 10 15
[1025] Leu Leu Pro Thr Thr Ser Thr Ala Phe Ser Glu Ser Ala Ser Thr Asn
[1026] 20 25 30
[1027] Glu Arg Val Leu Asn Leu Ser Asp Pro Asn Ala Thr Arg Tyr Thr Lys
[1028] 35 40 45
[1029] Glu Leu Phe Ala Phe Leu Gln Asp Val Ser Gly Glu Gln Val Leu Phe
[1030] 50 55 60
[1031] Gly Gln Gln His Ala Thr Asp Glu Gly Leu Thr Leu Thr Gly Glu Gly
[1032] 65 70 75 80
[1033] Asn Arg Ile Gly Ser Thr Glu Ser Glu Val Lys Asn Ala Val Gly Asp
[1034] 85 90 95
[1035] Tyr Pro Ala Val Phe Gly Trp Asp Thr Asn Ser Leu Asp Gly Arg Glu
[1036] 100 105 110
[1037] Lys Pro Gly Thr Asp Val Glu Ser Gln Glu Gln Arg Ile Leu Asn Thr
[1038] 115 120 125
[1039] Ala Glu Ser Met Lys Val Ala His Glu Leu Gly Gly Ile Ile Thr Leu
[1040] 130 135 140
[1041] Ser Met His Pro Asp Asn Phe Val Thr Gly His Tyr Tyr Gly Asp Thr
[1042] 145 150 155 160
[1043] Asp Gly Asn Val Val Gln Glu Ile Leu Pro Gly Gly Ser Lys His Asn
[1044] 165 170 175
[1045] Glu Phe Asn Ala Trp Leu Asp Asn Ile Ala Ala Leu Ala His Glu Leu
[1046] 180 185 190
[1047] Val Asp Asp Asn Gly Glu Pro Ile Pro Val Ile Phe Arg Pro Phe His
[1048] 195 200 205
[1049] Glu Gln Thr Gly Ser Trp Phe Trp Trp Gly Ala Ser Thr Thr Thr Pro

[1050] 210 215 220

[1051] Glu Gln Tyr Lys Ala Ile Phe Arg Tyr Thr Val Glu Tyr Leu Arg Asp

[1052] 225 230 235 240

[1053] Ala Lys Gly Val His Asn Phe Leu Tyr Gly Phe Ser Pro Gly Ala Gly

[1054] 245 250 255

[1055] Pro Ala Gly Asp Leu Asp Arg Tyr Leu Glu Thr Tyr Pro Gly Asp Asn

[1056] 260 265 270

[1057] Tyr Val Asp Ile Leu Gly Ile Asp Asn Tyr Asp Ser Lys Ser Asn Ala

[1058] 275 280 285

[1059] Gly Ser Asp Ala Trp Leu Ser Gly Met Val Lys Asp Leu Ala Met Ile

[1060] 290 295 300

[1061] Ser Lys Leu Ala Glu Glu Arg Gly Lys Val Ser Ala Phe Thr Glu Phe

[1062] 305 310 315 320

[1063] Gly Tyr Ser Ala Glu Gly Met Ser Gln Thr Gly Asp Ala Leu Asp Trp

[1064] 325 330 335

[1065] Tyr Thr Arg Val Leu Asn Ala Ile Lys Ala Asp Glu Asp Ala Arg Asn

[1066] 340 345 350

[1067] Ile Ser Tyr Met Leu Thr Trp Ala Asn Phe Gly Trp Pro Asn Asn Ile

[1068] 355 360 365

[1069] Phe Val Pro Tyr Arg Asp Val Asn Gly Asp Leu Gly Gly Asp His Glu

[1070] 370 375 380

[1071] Leu Leu Pro Asp Phe Val Gln Phe Tyr Glu Asp Glu Tyr Ser Ala Phe

[1072] 385 390 395 400

[1073] Arg Glu Asp Ile Asn Glu Ser Val Tyr Asn Arg Asn Glu Ser Tyr Ile

[1074] 405 410 415

[1075] Val Ala Asp His Glu Pro Phe Met Tyr Val Val Ser Pro Thr Thr Gly

[1076] 420 425 430

[1077] Thr Tyr Ile Thr Gly Ser Ser Val Val Leu Arg Ala Lys Val Val Asn

[1078] 435 440 445

[1079] Asp Glu Asp Pro Ser Val Thr Tyr Gln Val Ala Gly Ser Glu Glu Val

[1080] 450 455 460

[1081] Tyr Glu Met Thr Leu Asp Glu Asn Gly Tyr Tyr Ser Ala Asp Tyr Ile

[1082] 465 470 475 480

[1083] Pro Thr Ala Pro Lys Asn Gly Ala Leu

[1084] 485

[1085] <210> 35

[1086] <211> 1110

[1087] <212> DNA

[1088] <213> Bacillus alcalophilus

[1089] <400> 35

[1090] atgagaagta tgaagctttt atttgctatg tttattttag ttttttcctc ttttactttt 60

[1091] aacttagtag ttgcgcaagc tagtggacat ggacaaatgc ataaagtacc ttgggcaccc 120

[1092] caagctgaag cacctggaaa aacggctgag aatggagtct gggataaagt tagaaataat 180
[1093] cctggaaaag ccaatcctcc agcaggaaaa gtcaatggtt tttatataga tggaacaacc 240
[1094] ttatatgatg caaatggtaa gccatttgtg atgcgcggaa ttaaccacgc tcattcctgg 300
[1095] tacaagcctc acatagaaac cgcgatggag gcaattgctg atactggagc aaactccatt 360
[1096] cgtgtagttc tctcagatgg acaacagtgg accaaagatg atgttgacga agtagcaaaa 420
[1097] attatatctt tagcagaaaa acattcttta gttgctgttc ttgaggtaca tgatgcactc 480
[1098] ggaacagatg atattgaacc attacttaaa acagtcgatt actggattga gatcaaagat 540
[1099] gctttaatcg gaaaagagga caaagtaatt attaacattt ctaatgaatg gtttggttct 600
[1100] tggagcagtg aaggttgggc agaaggatat aaaaaagcaa ttcctttact aagagaggcg 660
[1101] ggtctaaaac atacacttat ggttgacgca gctgggtggg gacaatttcc tagatctatt 720
[1102] catgaaaaag gattagacgt ttttaactca gacccattaa agaatacaat gttttccatt 780
[1103] catatgtatg aatgggcagc gggtaatcct caacaagtaa aagacaatat tgacggtgtt 840
[1104] cttgaaaaga atttagctgt agtaattggt gagttcggtc atcatcacta cggaagagat 900
[1105] gttgctgttg atacgatctt aagtcattca gagaagtatg atgtaggttg gcttgcctgg 960
[1106] tcttggcacg gaaatagtgg tggtgtagag tatcttgact tagcaacaga tttttcaggg 1020
[1107] acgcaactaa ctgaatgggg agaaagaatt gtgtacggtc cgaatggttt aaaagaaact 1080
[1108] tctgaaatcg ttagtgtata caaaaaataa 1110
[1109] <210> 36
[1110] <211> 369
[1111] <212> PRT
[1112] <213> Bacillus alcalophilus
[1113] <400> 36
[1114] Met Arg Ser Met Lys Leu Leu Phe Ala Met Phe Ile Leu Val Phe Ser
[1115] 1 5 10 15
[1116] Ser Phe Thr Phe Asn Leu Val Val Ala Gln Ala Ser Gly His Gly Gln
[1117] 20 25 30
[1118] Met His Lys Val Pro Trp Ala Pro Gln Ala Glu Ala Pro Gly Lys Thr
[1119] 35 40 45
[1120] Ala Glu Asn Gly Val Trp Asp Lys Val Arg Asn Asn Pro Gly Lys Ala
[1121] 50 55 60
[1122] Asn Pro Pro Ala Gly Lys Val Asn Gly Phe Tyr Ile Asp Gly Thr Thr
[1123] 65 70 75 80
[1124] Leu Tyr Asp Ala Asn Gly Lys Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His
[1125] 85 90 95
[1126] Ala His Ser Trp Tyr Lys Pro His Ile Glu Thr Ala Met Glu Ala Ile
[1127] 100 105 110
[1128] Ala Asp Thr Gly Ala Asn Ser Ile Arg Val Val Leu Ser Asp Gly Gln
[1129] 115 120 125
[1130] Gln Trp Thr Lys Asp Asp Val Asp Glu Val Ala Lys Ile Ile Ser Leu
[1131] 130 135 140
[1132] Ala Glu Lys His Ser Leu Val Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Leu
[1133] 145 150 155 160

[1134] Gly Thr Asp Asp Ile Glu Pro Leu Leu Lys Thr Val Asp Tyr Trp Ile
[1135] 165 170 175
[1136] Glu Ile Lys Asp Ala Leu Ile Gly Lys Glu Asp Lys Val Ile Ile Asn
[1137] 180 185 190
[1138] Ile Ser Asn Glu Trp Phe Gly Ser Trp Ser Ser Glu Gly Trp Ala Glu
[1139] 195 200 205
[1140] Gly Tyr Lys Lys Ala Ile Pro Leu Leu Arg Glu Ala Gly Leu Lys His
[1141] 210 215 220
[1142] Thr Leu Met Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Arg Ser Ile
[1143] 225 230 235 240
[1144] His Glu Lys Gly Leu Asp Val Phe Asn Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr
[1145] 245 250 255
[1146] Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Trp Ala Ala Gly Asn Pro Gln Gln
[1147] 260 265 270
[1148] Val Lys Asp Asn Ile Asp Gly Val Leu Glu Lys Asn Leu Ala Val Val
[1149] 275 280 285
[1150] Ile Gly Glu Phe Gly His His His Tyr Gly Arg Asp Val Ala Val Asp
[1151] 290 295 300
[1152] Thr Ile Leu Ser His Ser Glu Lys Tyr Asp Val Gly Trp Leu Ala Trp
[1153] 305 310 315 320
[1154] Ser Trp His Gly Asn Ser Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Thr
[1155] 325 330 335
[1156] Asp Phe Ser Gly Thr Gln Leu Thr Glu Trp Gly Glu Arg Ile Val Tyr
[1157] 340 345 350
[1158] Gly Pro Asn Gly Leu Lys Glu Thr Ser Glu Ile Val Ser Val Tyr Lys
[1159] 355 360 365
[1160] Lys
[1161] <210> 37
[1162] <211> 1482
[1163] <212> DNA
[1164] <213> Bacillus sp.
[1165] <400> 37
[1166] atgaaaaaaa agttatcaca gatttatcat ttaattattt gcacacttat aataagtgtg 60
[1167] ggaataatgg ggattacaac gtccccatca gaagcaagtt caggctttta tgttgatggc 120
[1168] aatacgttat atgacgcaaa cgggcaacca tttgtcatga aaggcattaa ccatggacat 180
[1169] gcttggtata aagacaccgc ttcaacagct attcctgcca ttgcagagca aggcgcgaac 240
[1170] acgatacgta ttgttttatc agatggcggt caatgggaaa aagacgacat tgacaccgtt 300
[1171] cgtgaagtta ttgagcttgc ggagcaaaat aaaatggtgg ctgtcgttga agttcatgat 360
[1172] gccacgggcc gtgattcacg cagtgattta gatcgggcag tcgattattg gatagagatg 420
[1173] aaagatgcac ttatcggcaa agaggatact gtcattatta acattgcaaa cgaatggtat 480
[1174] ggcagttggg atggcgccgc ttgggctgat ggctacattg atgtcattcc gaagcttcgc 540
[1175] gatgccggct taacacacac cttaatggtt gatgcagcag gatgggggca atatccgcaa 600

[1176] tctattcatg attacggaca agatgtgttt aatgcagatc cgttaaaaaa tacgatattc 660
[1177] tccatccata tgtatgagta tgctggtggt gatgctaaca ctgttagatc aaatattgat 720
[1178] agagtcatag atcaagacct tgctctcgta ataggtgagt tcggtcatag acacactgat 780
[1179] ggcgatgttg atgaagatac aatccttagt tattctgaag aaactggcac aggatggctc 840
[1180] gcttggtctt ggaaaggcaa cagtgccgaa tgggattatt tagacctttc agaagattgg 900
[1181] gctggtaacc atttaactga ttggggaaat aggattgtcc acggggcaaa tggcttgcag 960
[1182] gaaacctcca aaccatccac cgtatttaca gatgataacg gtggtgcccc tgaaccgcca 1020
[1183] actactacta ccttgtatga ctttgaagga agcacacaag ggtggcatgg aagcaacgtg 1080
[1184] atgggtggcc cttggtccgt aacagaatgg ggtgcgtcag gcaactactc tttaaagggc 1140
[1185] gatgtcaatt taagctcaaa ttcttcacat gaactgtata gtgaacaaag tcgtaatcta 1200
[1186] cacggatact ctcagctaaa tgcaaccgtt cgccatgcca attggggaaa tcccggtaat 1260
[1187] ggcatgaatg caagacttta cgtgaaaacg ggctctgatt atacatggta tagcggtcct 1320
[1188] tttacacgta tcaatagctc caactcaggt acaacgttat cttttgattt aaacaacatc 1380
[1189] gaaaatagtc atcatgttag ggaaataggt gtgcaatttt cagctgcaga taatagcagc 1440
[1190] ggtcaaactg ctctatacgt tgataatgtt actttaagat aa 1482
[1191] <210> 38
[1192] <211> 493
[1193] <212> PRT
[1194] <213> Bacillus sp.
[1195] <400> 38
[1196] Met Lys Lys Lys Leu Ser Gln Ile Tyr His Leu Ile Ile Cys Thr Leu
[1197] 1 5 10 15
[1198] Ile Ile Ser Val Gly Ile Met Gly Ile Thr Thr Ser Pro Ser Glu Ala
[1199] 20 25 30
[1200] Ser Ser Gly Phe Tyr Val Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly
[1201] 35 40 45
[1202] Gln Pro Phe Val Met Lys Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr Lys
[1203] 50 55 60
[1204] Asp Thr Ala Ser Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Gln Gly Ala Asn
[1205] 65 70 75 80
[1206] Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Glu Lys Asp Asp
[1207] 85 90 95
[1208] Ile Asp Thr Val Arg Glu Val Ile Glu Leu Ala Glu Gln Asn Lys Met
[1209] 100 105 110
[1210] Val Ala Val Val Glu Val His Asp Ala Thr Gly Arg Asp Ser Arg Ser
[1211] 115 120 125
[1212] Asp Leu Asp Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Ala Leu
[1213] 130 135 140
[1214] Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr
[1215] 145 150 155 160
[1216] Gly Ser Trp Asp Gly Ala Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Val Ile
[1217] 165 170 175

[1218] Pro Lys Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala
[1219] 180 185 190
[1220] Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Asp
[1221] 195 200 205
[1222] Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ile His Met
[1223] 210 215 220
[1224] Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Ser Asn Ile Asp
[1225] 225 230 235 240
[1226] Arg Val Ile Asp Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His
[1227] 245 250 255
[1228] Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr Ser
[1229] 260 265 270
[1230] Glu Glu Thr Gly Thr Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser
[1231] 275 280 285
[1232] Ala Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Glu Asp Trp Ala Gly Asn His
[1233] 290 295 300
[1234] Leu Thr Asp Trp Gly Asn Arg Ile Val His Gly Ala Asn Gly Leu Gln
[1235] 305 310 315 320
[1236] Glu Thr Ser Lys Pro Ser Thr Val Phe Thr Asp Asp Asn Gly Gly Ala
[1237] 325 330 335
[1238] Pro Glu Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Thr
[1239] 340 345 350
[1240] Gln Gly Trp His Gly Ser Asn Val Met Gly Gly Pro Trp Ser Val Thr
[1241] 355 360 365
[1242] Glu Trp Gly Ala Ser Gly Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Asp Val Asn Leu
[1243] 370 375 380
[1244] Ser Ser Asn Ser Ser His Glu Leu Tyr Ser Glu Gln Ser Arg Asn Leu
[1245] 385 390 395 400
[1246] His Gly Tyr Ser Gln Leu Asn Ala Thr Val Arg His Ala Asn Trp Gly
[1247] 405 410 415
[1248] Asn Pro Gly Asn Gly Met Asn Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser
[1249] 420 425 430
[1250] Asp Tyr Thr Trp Tyr Ser Gly Pro Phe Thr Arg Ile Asn Ser Ser Asn
[1251] 435 440 445
[1252] Ser Gly Thr Thr Leu Ser Phe Asp Leu Asn Asn Ile Glu Asn Ser His
[1253] 450 455 460
[1254] His Val Arg Glu Ile Gly Val Gln Phe Ser Ala Ala Asp Asn Ser Ser
[1255] 465 470 475 480
[1256] Gly Gln Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr Leu Arg
[1257] 485 490
[1258] <210> 39
[1259] <211> 1551

[1260] <212> DNA

[1261] <213> Bacillus circulans

[1262] <400> 39

[1263] atggggtggt ttttagtgat tttacgcaag tggttgattg cttttgtcgc atttttactg 60

[1264] atgttctcgt ggactggaca acttacgaac aaagcacatg ctgcaagcgg attttatgta 120

[1265] agcggtacca aattattgga tgctacagga caaccatttg tgatgcgagg agtcaatcat 180

[1266] gcgcacacat ggtataaaga tcaactatcc accgcaatac cagccattgc taaaacaggt 240

[1267] gccaacacga tacgtattgt actggcgaat ggacacaaat ggacgcttga tgatgtaaac 300

[1268] accgtcaaca atattctcac cctctgtgaa caaaacaaac taattgccgt tttggaagta 360

[1269] catgacgcta caggaagcga tagtctttcc gatttagaca acgccgttaa ttactggatt 420

[1270] ggtattaaaa gcgcgttgat cggcaaggaa gaccgtgtaa tcattaatat agctaacgag 480

[1271] tggtacggaa catgggatgg agtcgcctgg gctaatggtt ataagcaagc catacccaaa 540

[1272] ctgcgtaatg ctggtctaac tcatacgctg attgttgact ccgctggatg gggacaatat 600

[1273] ccagattcgg tcaaaaatta tgggacagaa gtactgaatg cagacccgtt aaaaaacaca 660

[1274] gtattctcta tccatatgta tgaatatgct gggggcaatg caagtaccgt caaatccaat 720

[1275] attgacggtg tgctgaacaa gaatcttgca ctgattatcg gcgaatttgg tggacaacat 780

[1276] acaaacggtg atgtggatga agccaccatt atgagttatt cccaagagaa gggagtcggc 840

[1277] tggttggctt ggtcctggaa gggaaatagc agtgatttgg cttatctcga tatgacaaat 900

[1278] gattgggctg gtaactccct cacctcgttc ggtaataccg tagtgaatgg cagtaacggc 960

[1279] attaaagcaa cttctgtgtt atccggcatt tttggaggtg ttacgccaac ctcaagccct 1020

[1280] acttctacac ctacatctac gccaacctca actcctactc ctacgccaag tccgaccccg 1080

[1281] agtccaggta ataacgggac gatcttatat gatttcgaaa caggaactca aggctggtcg 1140

[1282] ggaaacaata tttcgggagg cccatgggtc accaatgaat ggaaagcaac gggagcgcaa 1200

[1283] actctcaaag ccgatgtctc cttacaatcc aattccacgc atagtctata tataacctct 1260

[1284] aatcaaaatc tgtctggaaa aagcagtctg aaagcaacgg ttaagcatgc gaactggggc 1320

[1285] aatatcggca acgggattta tgcaaaacta tacgtaaaga ccgggtccgg gtggacatgg 1380

[1286] tacgattccg gagagaatct gattcagtca aacgacggta ccattttgac actatccctc 1440

[1287] agcggcattt cgaatttgtc ctcagtcaaa gaaattgggg tagaattccg cgcctcctca 1500

[1288] aacagtagtg gccaatcagc tatttatgta gatagtgtta gtctgcaata a 1551

[1289] <210> 40

[1290] <211> 516

[1291] <212> PRT

[1292] <213> Bacillus circulans

[1293] <400> 40

[1294] Met Gly Trp Phe Leu Val Ile Leu Arg Lys Trp Leu Ile Ala Phe Val

[1295] 1 5 10 15

[1296] Ala Phe Leu Leu Met Phe Ser Trp Thr Gly Gln Leu Thr Asn Lys Ala

[1297] 20 25 30

[1298] His Ala Ala Ser Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Lys Leu Leu Asp Ala

[1299] 35 40 45

[1300] Thr Gly Gln Pro Phe Val Met Arg Gly Val Asn His Ala His Thr Trp

[1301] 50 55 60

[1302] Tyr Lys Asp Gln Leu Ser Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Lys Thr Gly
[1303] 65 70 75 80
[1304] Ala Asn Thr Ile Arg Ile Val Leu Ala Asn Gly His Lys Trp Thr Leu
[1305] 85 90 95
[1306] Asp Asp Val Asn Thr Val Asn Asn Ile Leu Thr Leu Cys Glu Gln Asn
[1307] 100 105 110
[1308] Lys Leu Ile Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp Ser
[1309] 115 120 125
[1310] Leu Ser Asp Leu Asp Asn Ala Val Asn Tyr Trp Ile Gly Ile Lys Ser
[1311] 130 135 140
[1312] Ala Leu Ile Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu
[1313] 145 150 155 160
[1314] Trp Tyr Gly Thr Trp Asp Gly Val Ala Trp Ala Asn Gly Tyr Lys Gln
[1315] 165 170 175
[1316] Ala Ile Pro Lys Leu Arg Asn Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Ile Val
[1317] 180 185 190
[1318] Asp Ser Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Asp Ser Val Lys Asn Tyr Gly
[1319] 195 200 205
[1320] Thr Glu Val Leu Asn Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Val Phe Ser Ile
[1321] 210 215 220
[1322] His Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Thr Val Lys Ser Asn
[1323] 225 230 235 240
[1324] Ile Asp Gly Val Leu Asn Lys Asn Leu Ala Leu Ile Ile Gly Glu Phe
[1325] 245 250 255
[1326] Gly Gly Gln His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser
[1327] 260 265 270
[1328] Tyr Ser Gln Glu Lys Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly
[1329] 275 280 285
[1330] Asn Ser Ser Asp Leu Ala Tyr Leu Asp Met Thr Asn Asp Trp Ala Gly
[1331] 290 295 300
[1332] Asn Ser Leu Thr Ser Phe Gly Asn Thr Val Val Asn Gly Ser Asn Gly
[1333] 305 310 315 320
[1334] Ile Lys Ala Thr Ser Val Leu Ser Gly Ile Phe Gly Gly Val Thr Pro
[1335] 325 330 335
[1336] Thr Ser Ser Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ser Thr Pro
[1337] 340 345 350
[1338] Thr Pro Thr Pro Ser Pro Thr Pro Ser Pro Gly Asn Asn Gly Thr Ile
[1339] 355 360 365
[1340] Leu Tyr Asp Phe Glu Thr Gly Thr Gln Gly Trp Ser Gly Asn Asn Ile
[1341] 370 375 380
[1342] Ser Gly Gly Pro Trp Val Thr Asn Glu Trp Lys Ala Thr Gly Ala Gln
[1343] 385 390 395 400

[1344] Thr Leu Lys Ala Asp Val Ser Leu Gln Ser Asn Ser Thr His Ser Leu
[1345] 405 410 415
[1346] Tyr Ile Thr Ser Asn Gln Asn Leu Ser Gly Lys Ser Ser Leu Lys Ala
[1347] 420 425 430
[1348] Thr Val Lys His Ala Asn Trp Gly Asn Ile Gly Asn Gly Ile Tyr Ala
[1349] 435 440 445
[1350] Lys Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser Gly Trp Thr Trp Tyr Asp Ser Gly
[1351] 450 455 460
[1352] Glu Asn Leu Ile Gln Ser Asn Asp Gly Thr Ile Leu Thr Leu Ser Leu
[1353] 465 470 475 480
[1354] Ser Gly Ile Ser Asn Leu Ser Ser Val Lys Glu Ile Gly Val Glu Phe
[1355] 485 490 495
[1356] Arg Ala Ser Ser Asn Ser Ser Gly Gln Ser Ala Ile Tyr Val Asp Ser
[1357] 500 505 510
[1358] Val Ser Leu Gln
[1359] 515
[1360] <210> 41
[1361] <211> 984
[1362] <212> DNA
[1363] <213> Paenibacillus sp.
[1364] <400> 41
[1365] atgagacaac ttttagcaaa aggtatttta gctgcactgg tcatgatgtt agcgatgtat 60
[1366] ggattgggga atctctcttc taaagcttcg gctgcaacag gtttttatgt aagcggtacc 120
[1367] actctatatg attctactgg taaacctttt gtaatgcgcg gtgtcaatca ttcgcatacc 180
[1368] tggttcaaaa atgatctaaa tgcagccatc cctgctattg ccaaaacagg tgcaaataca 240
[1369] gtacgtatcg ttttatctaa tggtgttcag tatactagag atgatgtaaa ctcagtcaaa 300
[1370] aatattattt ccctggttaa ccaaaacaaa atgattgctg ttcttgaggt gcatgatgct 360
[1371] accggtaaag acgattacgc ttctcttgat gccgctgtaa actactggat cagcatcaaa 420
[1372] gatgccttga ttggcaagga agatcgagtc attgttaata ttgccaatga atggtacggt 480
[1373] acatggaatg gcagtgcttg ggcagatggt tataagcagg ctattcccaa actaagaaat 540
[1374] gcaggcatca aaaacacttt aatcgttgat gccgccggct ggggacaatg tcctcaatcg 600
[1375] atcgttgatt acgggcaaag tgtatttgca gcagattcgc ttaaaaatac aattttctct 660
[1376] attcacatgt atgaatatgc aggcggtaca gatgcgatcg tcaaaagcaa tatggaaaat 720
[1377] gtactgaaca aaggacttcc tttgatcatc ggtgaatttg gcgggcagca tacaaacggc 780
[1378] gatgtagatg aacatgcaat tatgcgttat ggtcagcaaa aaggtgtagg ttggctggca 840
[1379] tggtcgtggt atggcaacaa tagtgaactc agttatctgg atttggctac aggtcccgcc 900
[1380] ggtagtctga caagtatcgg caatacgatt gtaaatgatc catatggtat caaagctacc 960
[1381] tcgaaaaaag cgggtatctt ctaa 984
[1382] <210> 42
[1383] <211> 327
[1384] <212> PRT
[1385] <213> Paenibacillus sp.

[1386] <400> 42

[1387] Met Arg Gln Leu Leu Ala Lys Gly Ile Leu Ala Ala Leu Val Met Met
[1388] 1 5 10 15
[1389] Leu Ala Met Tyr Gly Leu Gly Asn Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ala Ala
[1390] 20 25 30
[1391] Thr Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ser Thr Gly Lys
[1392] 35 40 45
[1393] Pro Phe Val Met Arg Gly Val Asn His Ser His Thr Trp Phe Lys Asn
[1394] 50 55 60
[1395] Asp Leu Asn Ala Ala Ile Pro Ala Ile Ala Lys Thr Gly Ala Asn Thr
[1396] 65 70 75 80
[1397] Val Arg Ile Val Leu Ser Asn Gly Val Gln Tyr Thr Arg Asp Asp Val
[1398] 85 90 95
[1399] Asn Ser Val Lys Asn Ile Ile Ser Leu Val Asn Gln Asn Lys Met Ile
[1400] 100 105 110
[1401] Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Lys Asp Asp Tyr Ala Ser
[1402] 115 120 125
[1403] Leu Asp Ala Ala Val Asn Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Asp Ala Leu Ile
[1404] 130 135 140
[1405] Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Val Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly
[1406] 145 150 155 160
[1407] Thr Trp Asn Gly Ser Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala Ile Pro
[1408] 165 170 175
[1409] Lys Leu Arg Asn Ala Gly Ile Lys Asn Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala
[1410] 180 185 190
[1411] Gly Trp Gly Gln Cys Pro Gln Ser Ile Val Asp Tyr Gly Gln Ser Val
[1412] 195 200 205
[1413] Phe Ala Ala Asp Ser Leu Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ile His Met Tyr
[1414] 210 215 220
[1415] Glu Tyr Ala Gly Gly Thr Asp Ala Ile Val Lys Ser Asn Met Glu Asn
[1416] 225 230 235 240
[1417] Val Leu Asn Lys Gly Leu Pro Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gly Gln
[1418] 245 250 255
[1419] His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu His Ala Ile Met Arg Tyr Gly Gln
[1420] 260 265 270
[1421] Gln Lys Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Asn Ser
[1422] 275 280 285
[1423] Glu Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Ala Thr Gly Pro Ala Gly Ser Leu Thr
[1424] 290 295 300
[1425] Ser Ile Gly Asn Thr Ile Val Asn Asp Pro Tyr Gly Ile Lys Ala Thr
[1426] 305 310 315 320
[1427] Ser Lys Lys Ala Gly Ile Phe

[1428] 325

[1429] <210> 43

[1430] <211> 981

[1431] <212> DNA

[1432] <213> Bacillus circulans

[1433] <400> 43

[1434] atggccaagt tgcaaaaggg tacaatctta acagtcattg cagcactgat gtttgtcatt 60

[1435] ttggggagcg cggcgcccaa agccgcagca gctacaggtt tttacgtgaa tggaggcaaa 120

[1436] ttgtacgatt ctacgggtaa accattttac atgaggggta tcaatcatgg gcactcctgg 180

[1437] tttaaaaatg atttgaacac ggctatccct gcgatcgcaa aaacgggtgc caatacggta 240

[1438] cgaattgttt tatcaaacgg tacacaatac accaaggatg atctgaattc cgtaaaaaac 300

[1439] atcattaatg tcgtaaatgc aaacaagatg attgctgtgc ttgaagtaca cgatgccact 360

[1440] gggaaagatg acttcaactc gttggatgca gcggtcaact actggataag catcaaagaa 420

[1441] gcactgatcg ggaaggaaga tcgggttatt gtaaacattg caaacgagtg gtacggaaca 480

[1442] tggaacggaa gcgcgtgggc tgacgggtac aaaaaagcta ttccgaaatt aagagatgcg 540

[1443] ggtattaaaa ataccttgat tgtagatgca gcaggctggg gtcagtaccc tcaatcgatc 600

[1444] gtcgattacg gacaaagcgt attcgccgcg gattcacaga aaaatacggc gttttccatt 660

[1445] cacatgtatg agtatgcagg caaggatgcg gccaccgtca aatccaatat ggaaaatgtg 720

[1446] ctgaataagg ggctggcctt aatcattggt gagttcggag gatatcacac caatggagat 780

[1447] gtcgatgaat atgcaatcat gaaatatggt ctggaaaaag gggtaggatg gcttgcatgg 840

[1448] tcttggtacg gtaatagctc tggattaaac tatcttgatt tggcaacagg acctaacggc 900

[1449] agtttgacga gctatggtaa tacggttgtc aatgatactt acggaattaa aaatacgtcc 960

[1450] caaaaagcgg gaatctttta a 981

[1451] <210> 44

[1452] <211> 326

[1453] <212> PRT

[1454] <213> Bacillus circulans

[1455] <400> 44

[1456] Met Ala Lys Leu Gln Lys Gly Thr Ile Leu Thr Val Ile Ala Ala Leu

[1457] 1 5 10 15

[1458] Met Phe Val Ile Leu Gly Ser Ala Ala Pro Lys Ala Ala Ala Ala Thr

[1459] 20 25 30

[1460] Gly Phe Tyr Val Asn Gly Gly Lys Leu Tyr Asp Ser Thr Gly Lys Pro

[1461] 35 40 45

[1462] Phe Tyr Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ser Trp Phe Lys Asn Asp

[1463] 50 55 60

[1464] Leu Asn Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Lys Thr Gly Ala Asn Thr Val

[1465] 65 70 75 80

[1466] Arg Ile Val Leu Ser Asn Gly Thr Gln Tyr Thr Lys Asp Asp Leu Asn

[1467] 85 90 95

[1468] Ser Val Lys Asn Ile Ile Asn Val Val Asn Ala Asn Lys Met Ile Ala

[1469] 100 105 110

[1470] Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Lys Asp Asp Phe Asn Ser Leu
[1471] 115 120 125
[1472] Asp Ala Ala Val Asn Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Glu Ala Leu Ile Gly
[1473] 130 135 140
[1474] Lys Glu Asp Arg Val Ile Val Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Thr
[1475] 145 150 155 160
[1476] Trp Asn Gly Ser Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Lys Ala Ile Pro Lys
[1477] 165 170 175
[1478] Leu Arg Asp Ala Gly Ile Lys Asn Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala Gly
[1479] 180 185 190
[1480] Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile Val Asp Tyr Gly Gln Ser Val Phe
[1481] 195 200 205
[1482] Ala Ala Asp Ser Gln Lys Asn Thr Ala Phe Ser Ile His Met Tyr Glu
[1483] 210 215 220
[1484] Tyr Ala Gly Lys Asp Ala Ala Thr Val Lys Ser Asn Met Glu Asn Val
[1485] 225 230 235 240
[1486] Leu Asn Lys Gly Leu Ala Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gly Tyr His
[1487] 245 250 255
[1488] Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Tyr Ala Ile Met Lys Tyr Gly Leu Glu
[1489] 260 265 270
[1490] Lys Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Ser Ser Gly
[1491] 275 280 285
[1492] Leu Asn Tyr Leu Asp Leu Ala Thr Gly Pro Asn Gly Ser Leu Thr Ser
[1493] 290 295 300
[1494] Tyr Gly Asn Thr Val Val Asn Asp Thr Tyr Gly Ile Lys Asn Thr Ser
[1495] 305 310 315 320
[1496] Gln Lys Ala Gly Ile Phe
[1497] 325
[1498] <210> 45
[1499] <211> 1110
[1500] <212> DNA
[1501] <213> Bacillus nealsonii
[1502] <400> 45
[1503] atggttgtga aaaaattatc aagttttatt ctaattttac tgttagttac ttctgctttg 60
[1504] tttattactg attcaaaagc aagtgctgct tcgggatttt atgtaagcgg taccacttta 120
[1505] tatgatgcaa cgggtaaacc gtttactatg agaggtgtaa atcatgctca ttcttggttt 180
[1506] aaagaagatt cagcagctgc tattccagca atagcagcaa ctggagcaaa cacagtaaga 240
[1507] attgttttat ctgatggtgg acaatacacc aaagatgata ttaatactgt taaaagcctt 300
[1508] ttgtcattgg cagaaaaaat aaacttgcat tctggagtca tgacgcacag aaaagacgat 360
[1509] gtggaatctt taaatcgtgc agtcgattat tggatcagct taaaagacac attgataggc 420
[1510] aaagaagata aagtgataat aaacattgcg aatgaatggt atggtacttg ggatggtgcg 480
[1511] gcatgggcag ctggttataa acaagctatt ccaaagttac ggaatgcagg cttaaatcat 540

[1512] actctaataa ttgattctgc tggatgggga caatacccag cttccattca taattatgga 600
[1513] aaagaggtat ttaatgcgga tccattgaaa aatacaatgt tctccataca tatgtatgag 660
[1514] tacgctggtg gggatgcagc aactgttaag tcaaatattg atggtgtctt aaaccaagga 720
[1515] ttagctttaa taataggaga gtttggacaa aaacatacaa atggagatgt agatgaagca 780
[1516] accatcatga gttattcaca gcaaaaaaat atcggttggc ttgcatggtc ttggaaagga 840
[1517] aatagcacag attggagcta tctggattta agcaacgatt ggtctggtaa cagtttaact 900
[1518] gattggggta atacggttgt taatggggca aatgggttaa aagccacttc aaaactaagc 960
[1519] ggagtattcg gtagctcagc aggaacaaat aatatattgt atgattttga aagcggtaat 1020
[1520] caaaactgga ctggatcaaa tatcgcgggt ggaccttgga acgaattcaa gcttgatatc 1080
[1521] attcaggacg agcctcagac tccagcgtaa 1110
[1522] <210> 46
[1523] <211> 369
[1524] <212> PRT
[1525] <213> Bacillus nealsonii
[1526] <400> 46
[1527] Met Val Val Lys Lys Leu Ser Ser Phe Ile Leu Ile Leu Leu Leu Val
[1528] 1 5 10 15
[1529] Thr Ser Ala Leu Phe Ile Thr Asp Ser Lys Ala Ser Ala Ala Ser Gly
[1530] 20 25 30
[1531] Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Thr Gly Lys Pro Phe
[1532] 35 40 45
[1533] Thr Met Arg Gly Val Asn His Ala His Ser Trp Phe Lys Glu Asp Ser
[1534] 50 55 60
[1535] Ala Ala Ala Ile Pro Ala Ile Ala Ala Thr Gly Ala Asn Thr Val Arg
[1536] 65 70 75 80
[1537] Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Tyr Thr Lys Asp Asp Ile Asn Thr
[1538] 85 90 95
[1539] Val Lys Ser Leu Leu Ser Leu Ala Glu Lys Ile Asn Leu His Ser Gly
[1540] 100 105 110
[1541] Val Met Thr His Arg Lys Asp Asp Val Glu Ser Leu Asn Arg Ala Val
[1542] 115 120 125
[1543] Asp Tyr Trp Ile Ser Leu Lys Asp Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Lys
[1544] 130 135 140
[1545] Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Thr Trp Asp Gly Ala
[1546] 145 150 155 160
[1547] Ala Trp Ala Ala Gly Tyr Lys Gln Ala Ile Pro Lys Leu Arg Asn Ala
[1548] 165 170 175
[1549] Gly Leu Asn His Thr Leu Ile Ile Asp Ser Ala Gly Trp Gly Gln Tyr
[1550] 180 185 190
[1551] Pro Ala Ser Ile His Asn Tyr Gly Lys Glu Val Phe Asn Ala Asp Pro
[1552] 195 200 205
[1553] Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly

[1554] 210 215 220

[1555] Asp Ala Ala Thr Val Lys Ser Asn Ile Asp Gly Val Leu Asn Gln Gly

[1556] 225 230 235 240

[1557] Leu Ala Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gln Lys His Thr Asn Gly Asp

[1558] 245 250 255

[1559] Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr Ser Gln Gln Lys Asn Ile Gly

[1560] 260 265 270

[1561] Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser Thr Asp Trp Ser Tyr Leu

[1562] 275 280 285

[1563] Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ser Gly Asn Ser Leu Thr Asp Trp Gly Asn

[1564] 290 295 300

[1565] Thr Val Val Asn Gly Ala Asn Gly Leu Lys Ala Thr Ser Lys Leu Ser

[1566] 305 310 315 320

[1567] Gly Val Phe Gly Ser Ser Ala Gly Thr Asn Asn Ile Leu Tyr Asp Phe

[1568] 325 330 335

[1569] Glu Ser Gly Asn Gln Asn Trp Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Gly Pro

[1570] 340 345 350

[1571] Trp Asn Glu Phe Lys Leu Asp Ile Ile Gln Asp Glu Pro Gln Thr Pro

[1572] 355 360 365

[1573] Ala

[1574] <210> 47

[1575] <211> 984

[1576] <212> DNA

[1577] <213> Bacillus circulans

[1578] <400> 47

[1579] atgatgttga tatggatgca gggatggaag tctattctag tcgcgatctt ggcgtgtgtg 60

[1580] tcagtaggcg gtgggcttcc tagtccagaa gcagccacag gattttatgt aaacggtacc 120

[1581] aagctgtatg attcaacggg caaggccttt gtgatgaggg gtgtaaatca tccccacacc 180

[1582] tggtacaaga atgatctgaa cgcggctatt ccggctatcg cgcaaacggg agccaatacc 240

[1583] gtacgagtcg tcttgtcgaa cgggtcgcaa tggaccaagg atgacctgaa ctccgtcaac 300

[1584] agtatcatct cgctggtgtc gcagcatcaa atgatagccg ttctggaggt gcatgatgcg 360

[1585] acaggcaaag atgagtatgc ttcccttgaa gcggccgtcg actattggat cagcatcaaa 420

[1586] ggggcattga tcggaaaaga agaccgcgtc atcgtcaata ttgctaatga atggtatgga 480

[1587] aattggaaca gcagcggatg ggccgatggt tataagcagg ccattcccaa attaagaaac 540

[1588] gcgggcatta agaatacgtt gatcgttgat gcagcgggat gggggcaata cccgcaatcc 600

[1589] atcgtggatg agggggccgc ggtatttgct tccgatcaac tgaagaatac ggtattctcc 660

[1590] atccatatgt atgagtatgc cggtaaggat gccgctacgg tgaaaacgaa tatggacgat 720

[1591] gttttaaaca aaggattgcc tttaatcatt ggggagttcg gcggctatca tcaaggtgcc 780

[1592] gatgtcgatg agattgctat tatgaagtac ggacagcaga aggaagtggg ctggctggct 840

[1593] tggtcctggt acggaaacag cccggagctg aacgatttgg atctggctgc agggccaagc 900

[1594] ggaaacctga ccggctgggg aaacacggtg gttcatggaa ccgacgggat tcagcaaacc 960

[1595] tccaagaaag cgggcattta ttaa 984

[1596] <210> 48

[1597] <211> 327

[1598] <212> PRT

[1599] <213> Bacillus circulans

[1600] <400> 48

[1601] Met Met Leu Ile Trp Met Gln Gly Trp Lys Ser Ile Leu Val Ala Ile

[1602] 1 5 10 15

[1603] Leu Ala Cys Val Ser Val Gly Gly Gly Leu Pro Ser Pro Glu Ala Ala

[1604] 20 25 30

[1605] Thr Gly Phe Tyr Val Asn Gly Thr Lys Leu Tyr Asp Ser Thr Gly Lys

[1606] 35 40 45

[1607] Ala Phe Val Met Arg Gly Val Asn His Pro His Thr Trp Tyr Lys Asn

[1608] 50 55 60

[1609] Asp Leu Asn Ala Ala Ile Pro Ala Ile Ala Gln Thr Gly Ala Asn Thr

[1610] 65 70 75 80

[1611] Val Arg Val Val Leu Ser Asn Gly Ser Gln Trp Thr Lys Asp Asp Leu

[1612] 85 90 95

[1613] Asn Ser Val Asn Ser Ile Ile Ser Leu Val Ser Gln His Gln Met Ile

[1614] 100 105 110

[1615] Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Lys Asp Glu Tyr Ala Ser

[1616] 115 120 125

[1617] Leu Glu Ala Ala Val Asp Tyr Trp Ile Ser Ile Lys Gly Ala Leu Ile

[1618] 130 135 140

[1619] Gly Lys Glu Asp Arg Val Ile Val Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly

[1620] 145 150 155 160

[1621] Asn Trp Asn Ser Ser Gly Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala Ile Pro

[1622] 165 170 175

[1623] Lys Leu Arg Asn Ala Gly Ile Lys Asn Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala

[1624] 180 185 190

[1625] Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile Val Asp Glu Gly Ala Ala Val

[1626] 195 200 205

[1627] Phe Ala Ser Asp Gln Leu Lys Asn Thr Val Phe Ser Ile His Met Tyr

[1628] 210 215 220

[1629] Glu Tyr Ala Gly Lys Asp Ala Ala Thr Val Lys Thr Asn Met Asp Asp

[1630] 225 230 235 240

[1631] Val Leu Asn Lys Gly Leu Pro Leu Ile Ile Gly Glu Phe Gly Gly Tyr

[1632] 245 250 255

[1633] His Gln Gly Ala Asp Val Asp Glu Ile Ala Ile Met Lys Tyr Gly Gln

[1634] 260 265 270

[1635] Gln Lys Glu Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Ser Pro

[1636] 275 280 285

[1637] Glu Leu Asn Asp Leu Asp Leu Ala Ala Gly Pro Ser Gly Asn Leu Thr

[1638] 290 295 300

[1639] Gly Trp Gly Asn Thr Val Val His Gly Thr Asp Gly Ile Gln Gln Thr

[1640] 305 310 315 320

[1641] Ser Lys Lys Ala Gly Ile Tyr

[1642] 325

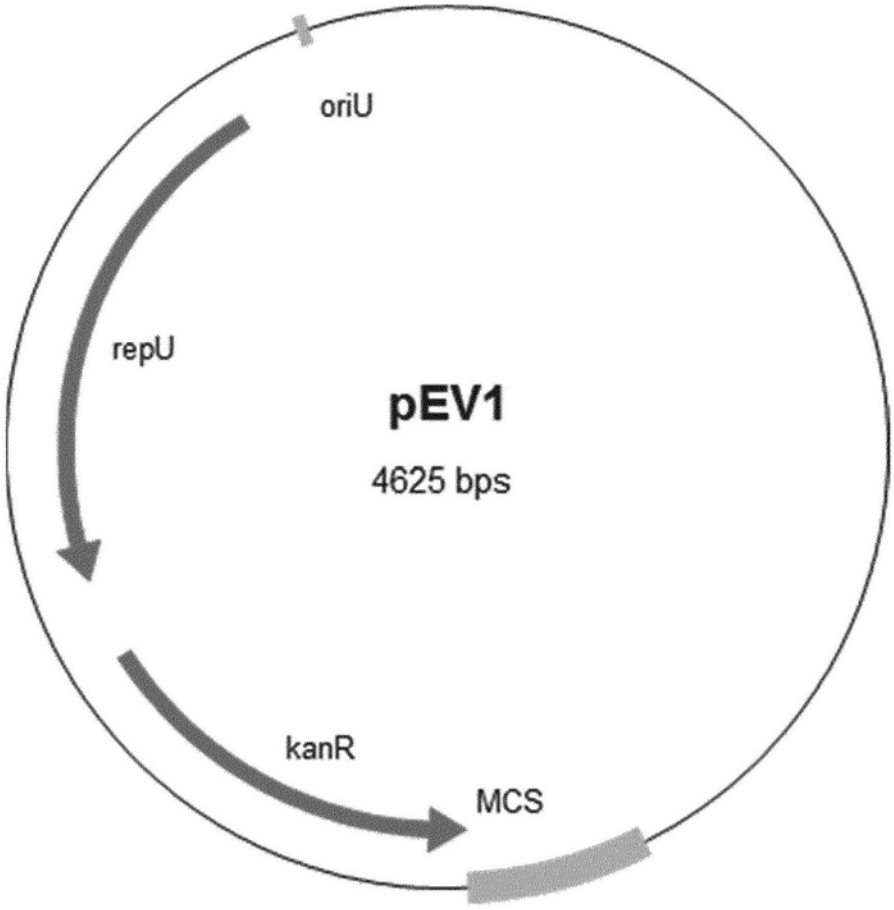

oriU
repU
pEV1
4625 bps
kanR
MCS

图1

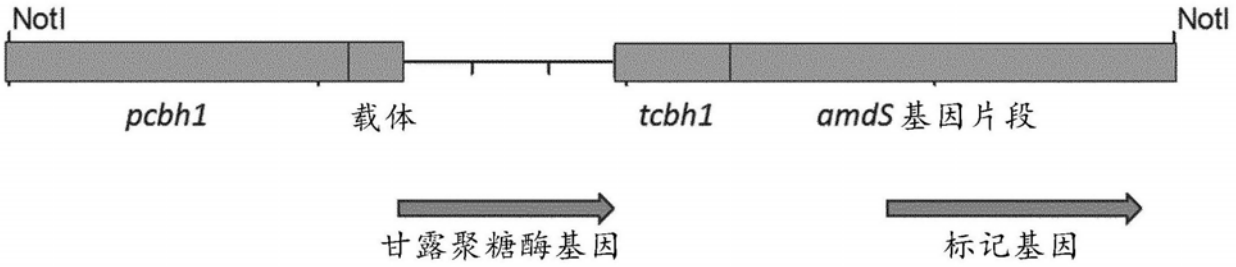

NotI
NotI
pcbh1
载体
tcbh1
amdS 基因片段
甘露聚糖酶基因
标记基因

图2

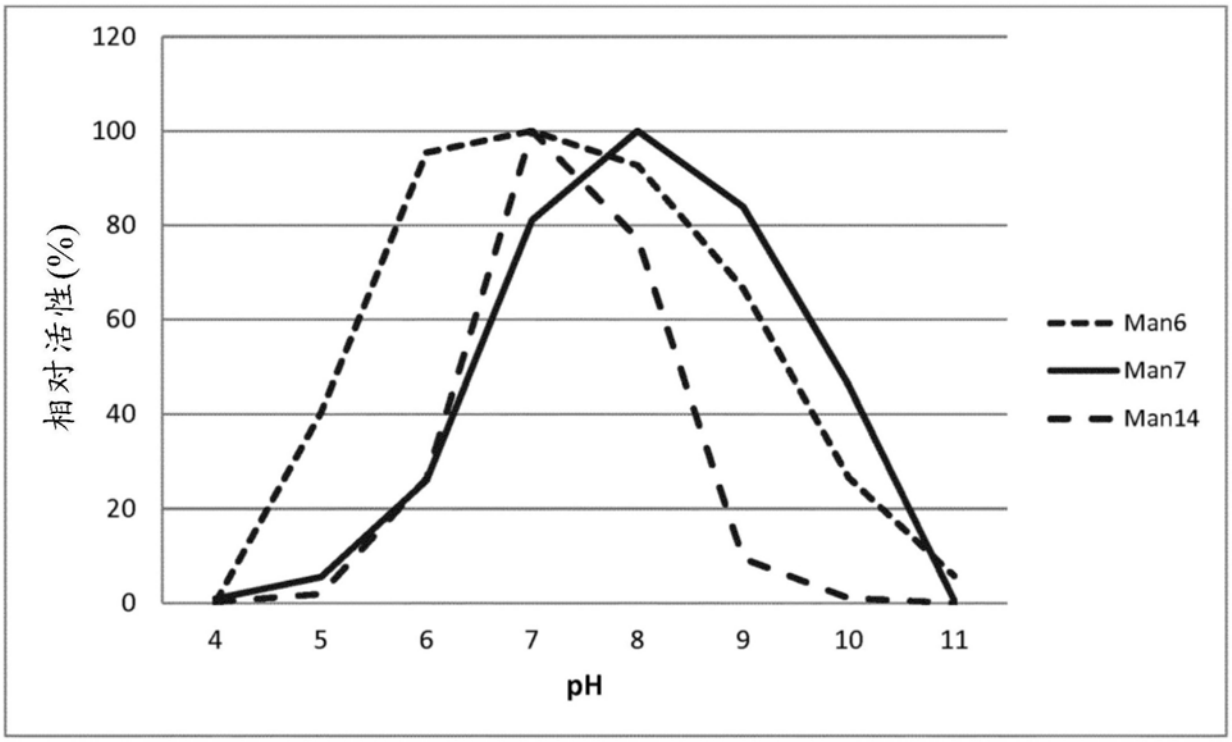

120
100
80
60
40
20
0
相对活性(%)
4
5
6
7
8
9
10
11
pH
Man6
Man7
Man14

图3

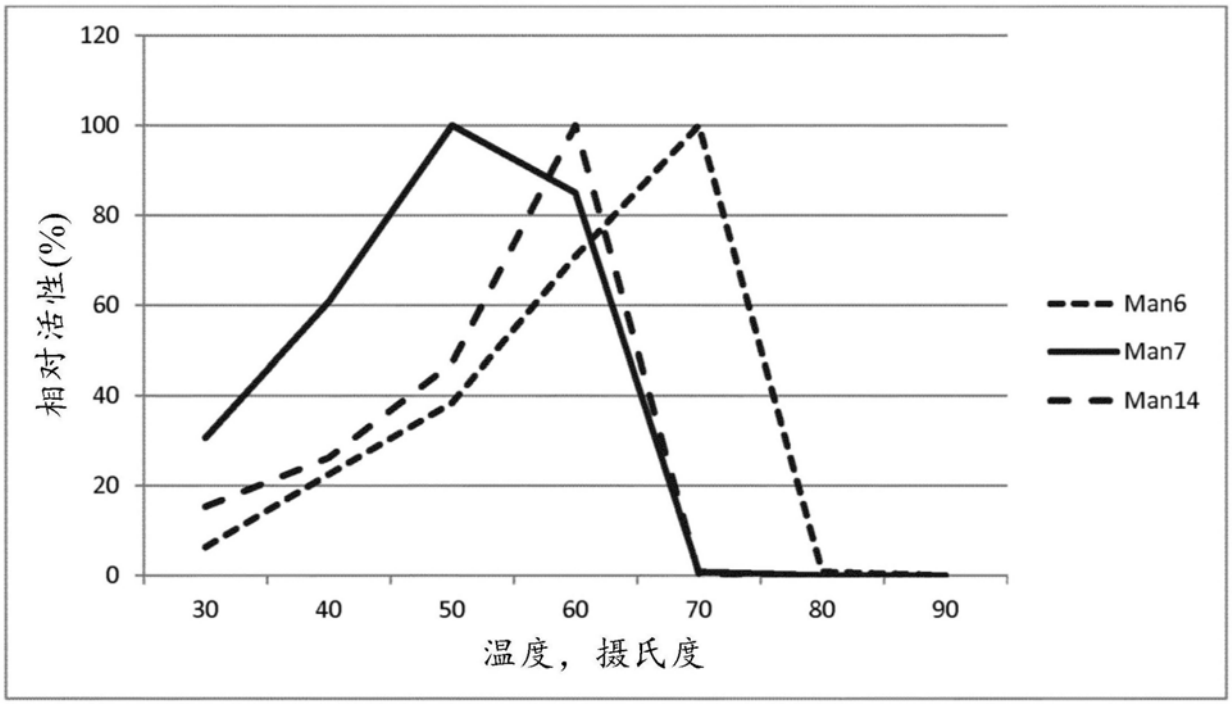

120
100
80
60
40
20
0
相对活性(%)
30
40
50
60
70
80
90
温度，摄氏度
Man6
Man7
Man14

图4

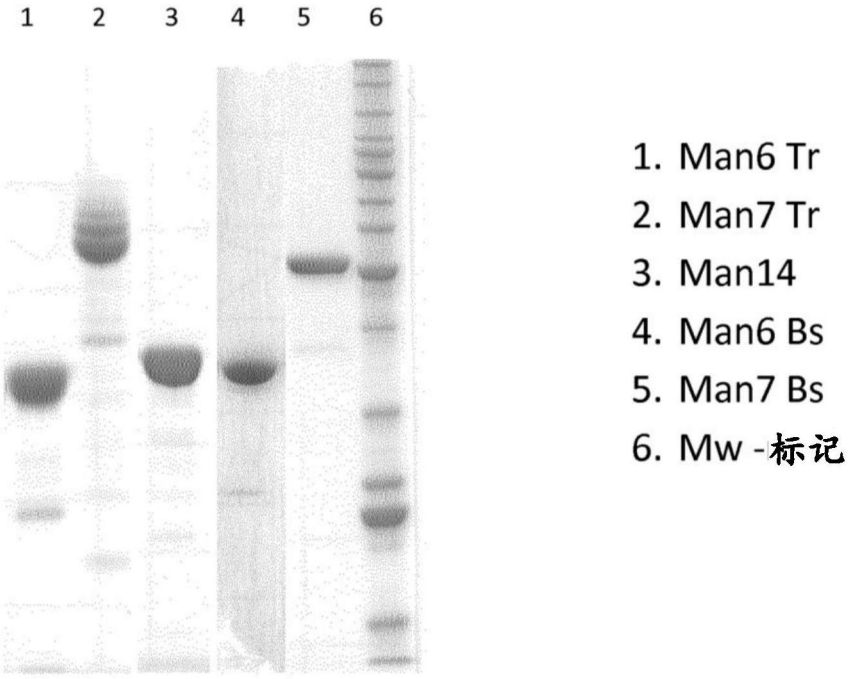

1 2 3 4 5 6
1. Man6 Tr
2. Man7 Tr
3. Man14
4. Man6 Bs
5. Man7 Bs
6. Mw -标记

图5

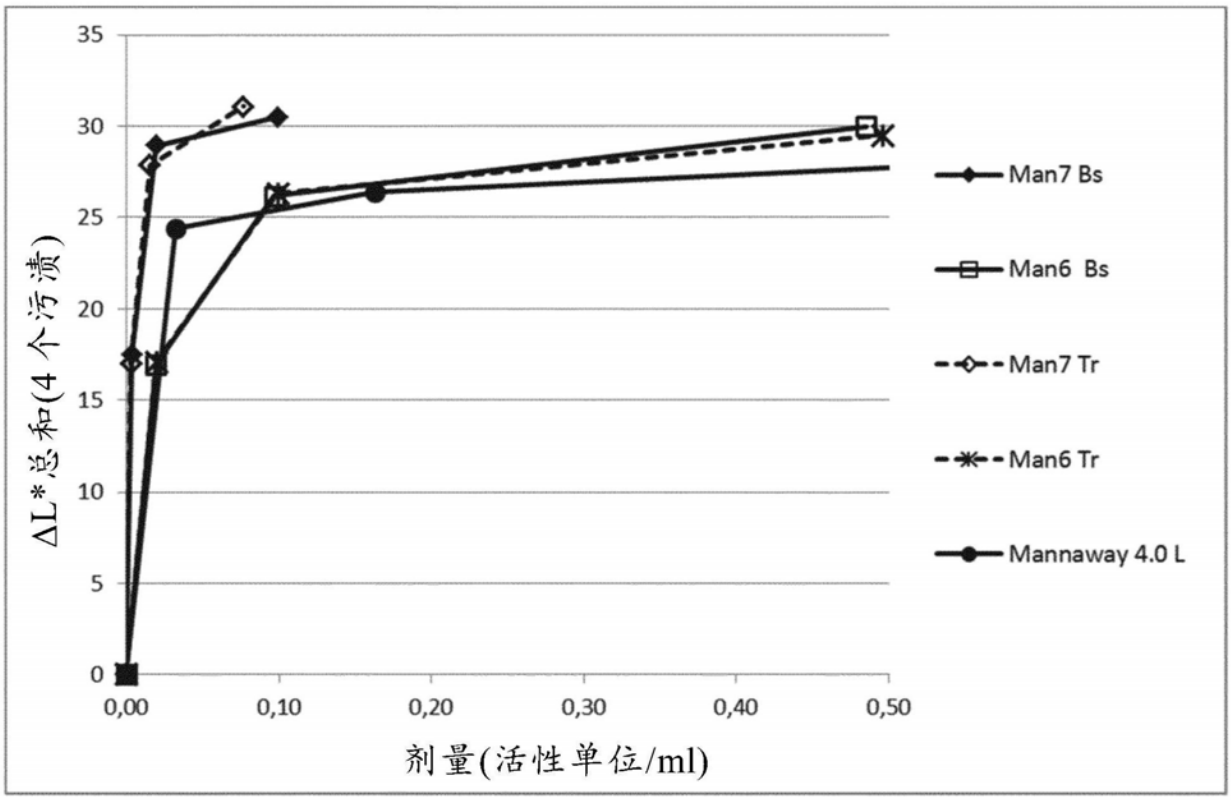

35
30
25
20
15
10
5
0
0,00
0,10
0,20
0,30
0,40
0,50
ΔL*总和(4 个污渍)
剂量(活性单位/ml)
Man7 Bs
Man6 Bs
Man7 Tr
Man6 Tr
Mannaway 4.0 L

图6

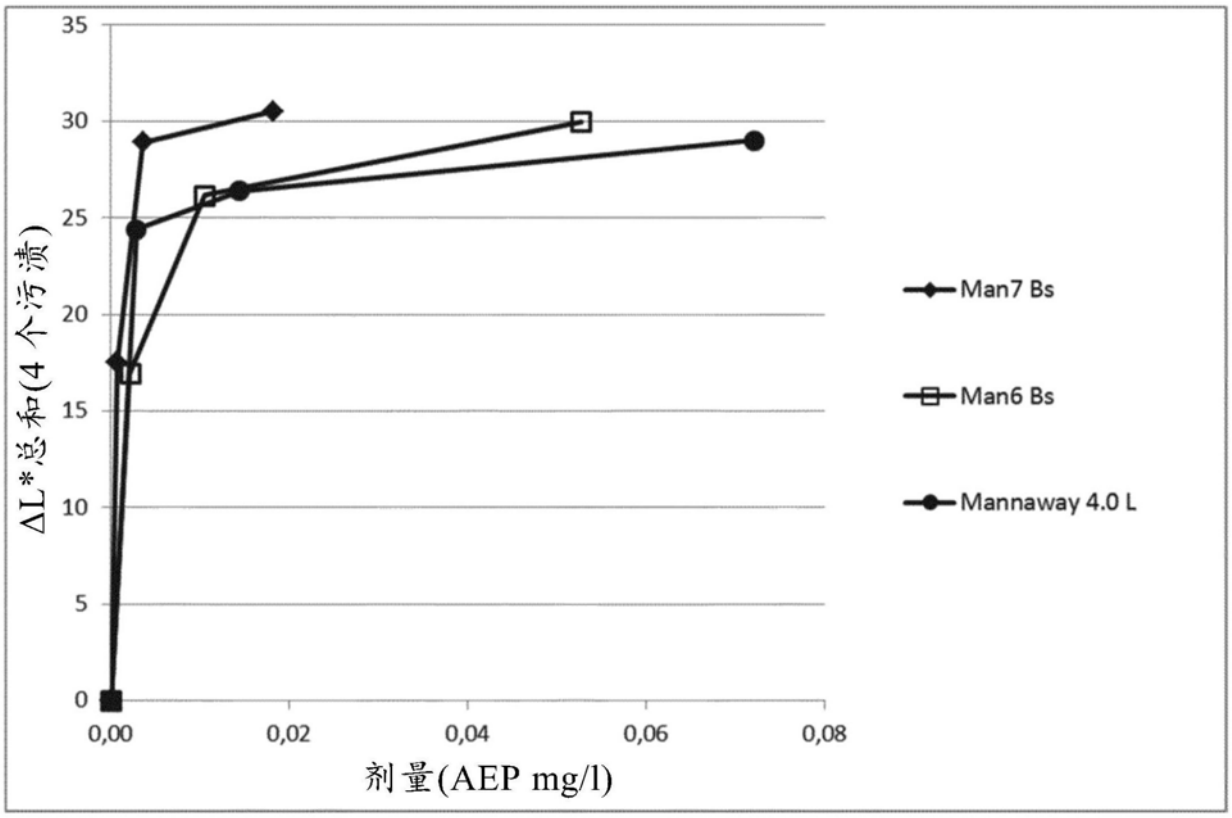

35
30
25
20
15
10
5
0
ΔL*总和(4 个污渍)
0,00
0,02
0,04
0,06
0,08
剂量(AEP mg/l)
Man7 Bs
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L

图7

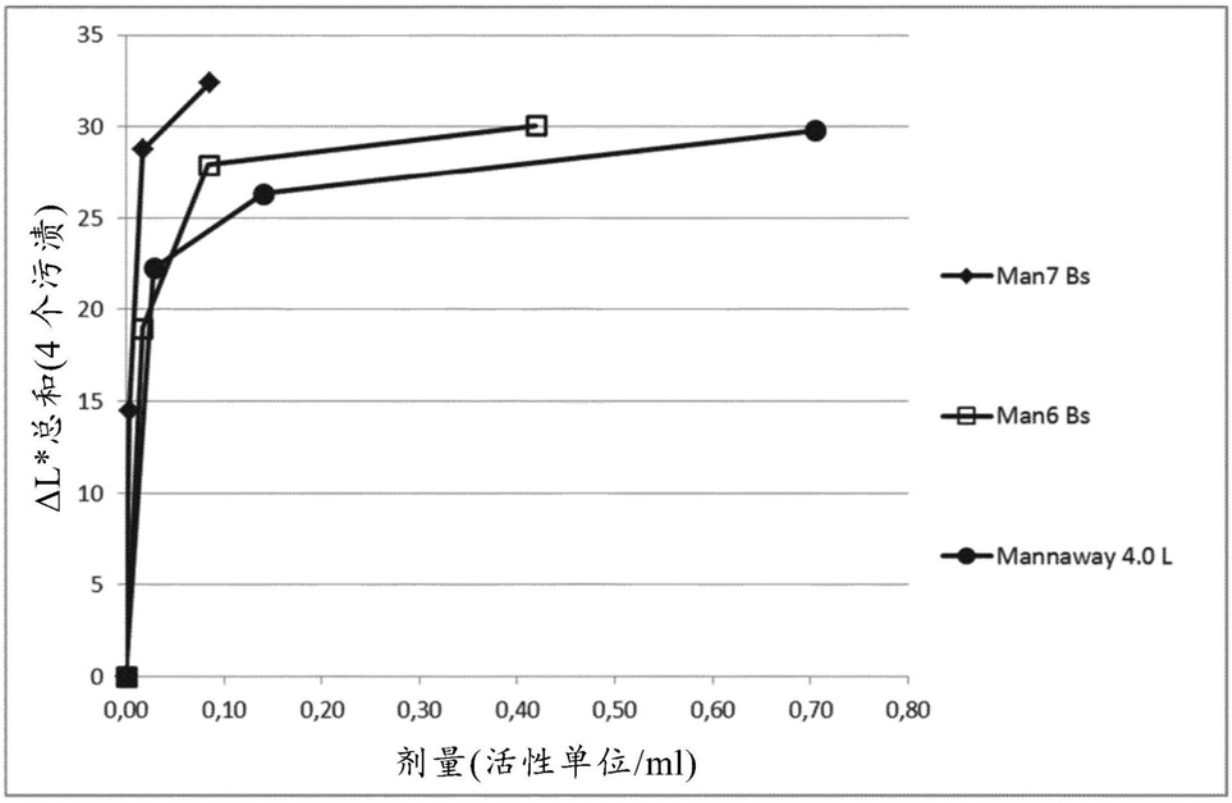

35
30
25
20
15
10
5
0
ΔL*总和(4 个污渍)
0,00
0,10
0,20
0,30
0,40
0,50
0,60
0,70
0,80
剂量(活性单位/ml)
Man7 Bs
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L

图8

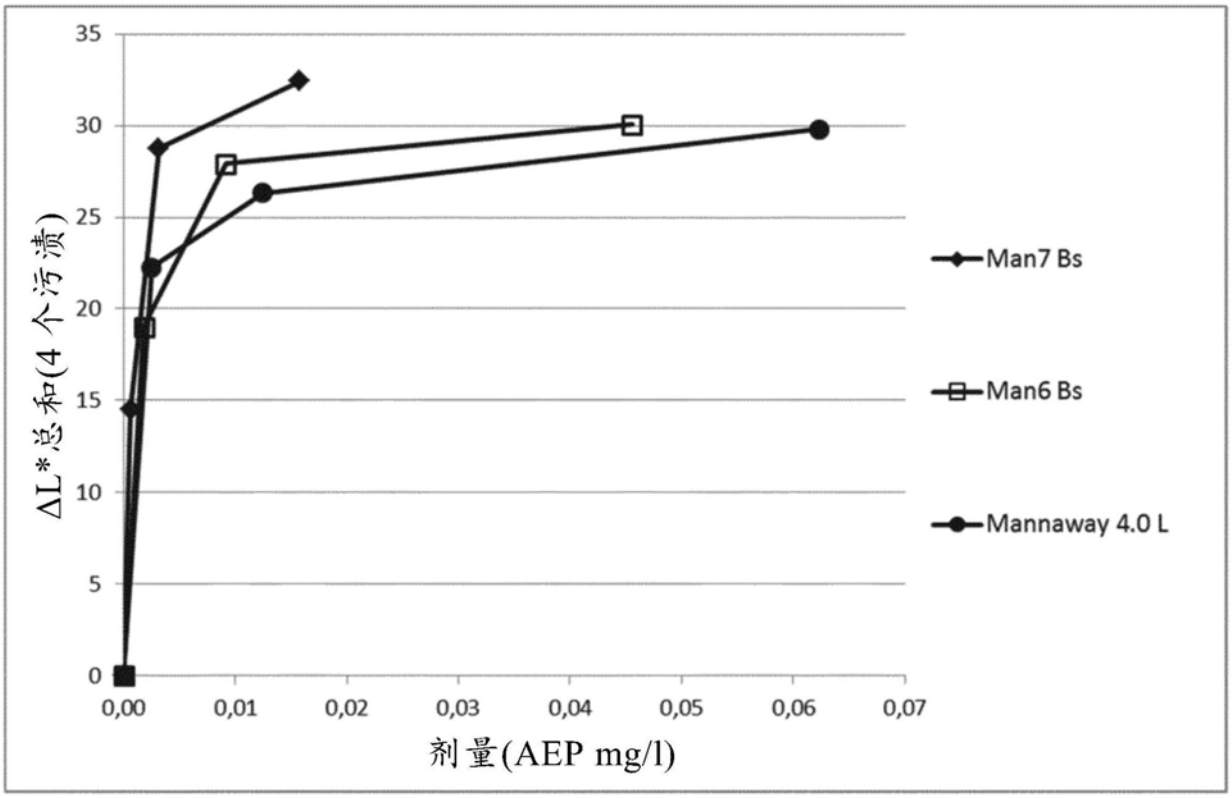

35
30
25
20
15
10
5
0
ΔL*总和(4 个污渍)
0,00
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
0,07
剂量(AEP mg/l)
Man7 Bs
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L

图9

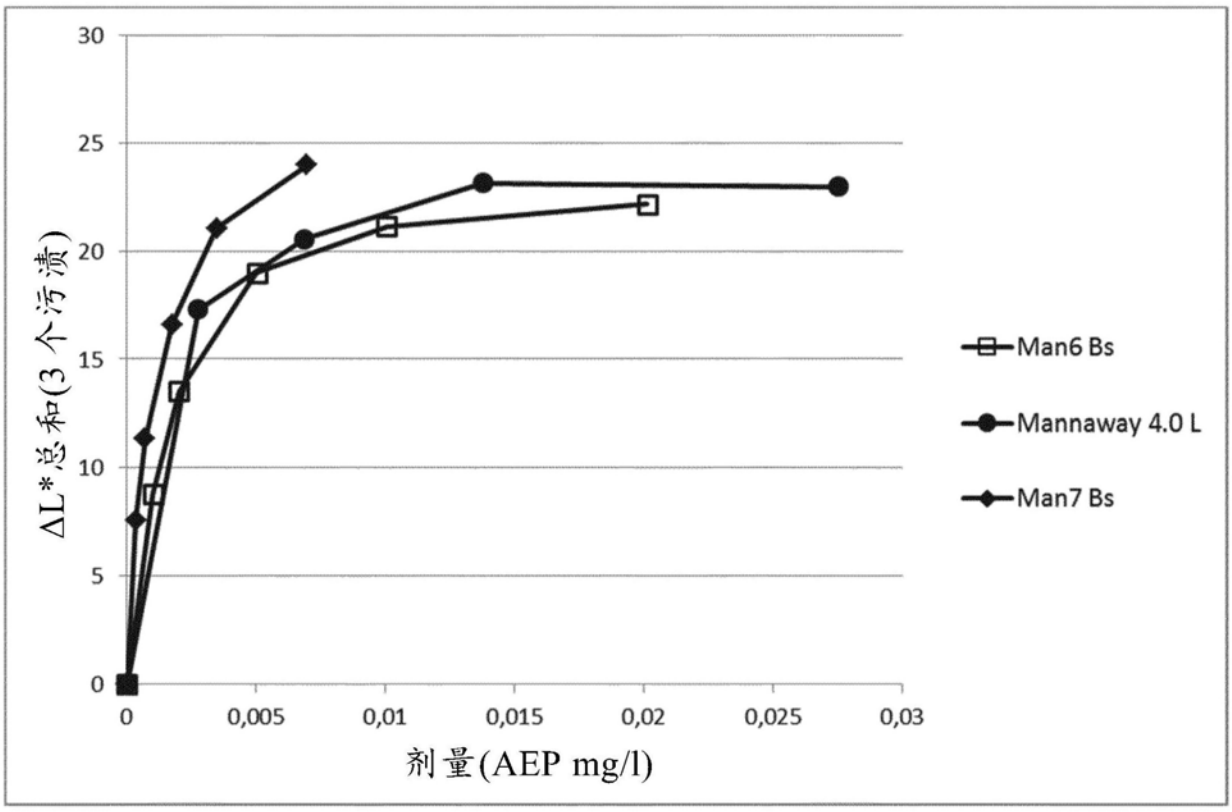

30
25
20
15
10
5
0
ΔL*总和(3 个污渍)
0
0,005
0,01
0,015
0,02
0,025
0,03
剂量(AEP mg/l)
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L
Man7 Bs

图10

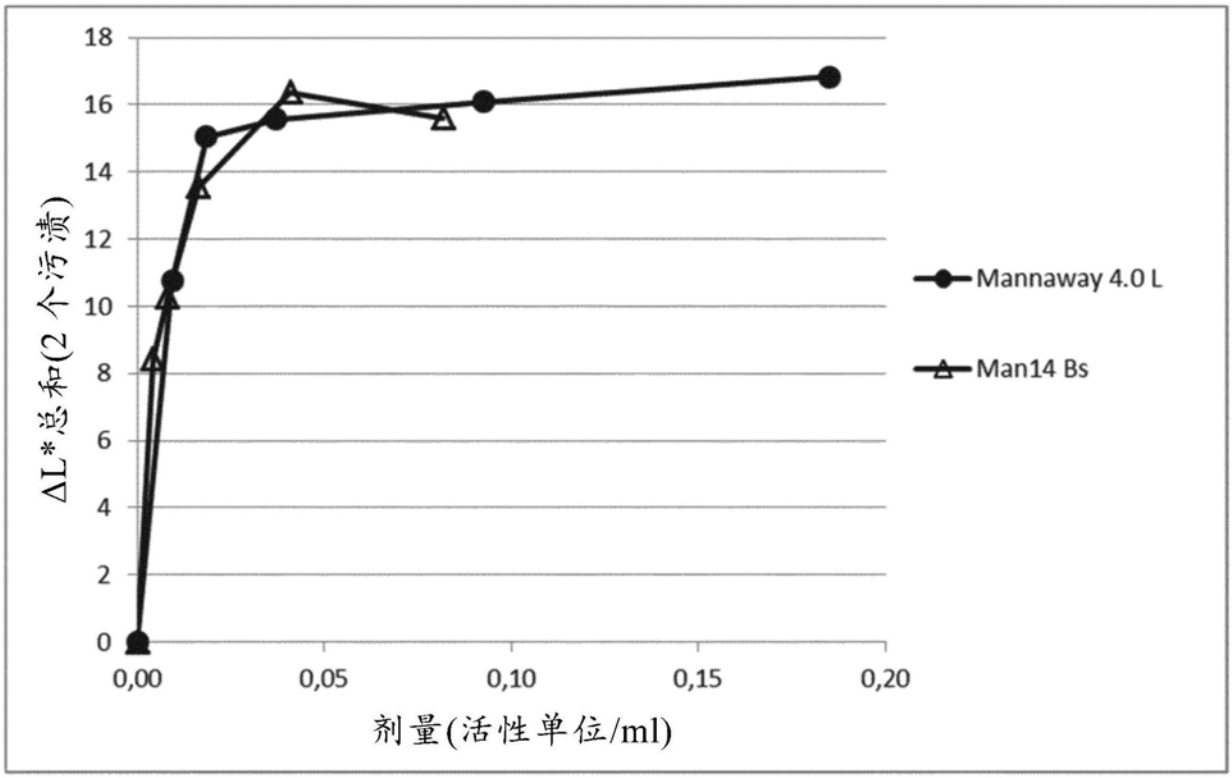

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ΔL*总和(2 个污渍)
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
剂量(活性单位/ml)
Mannaway 4.0 L
Man14 Bs

图11

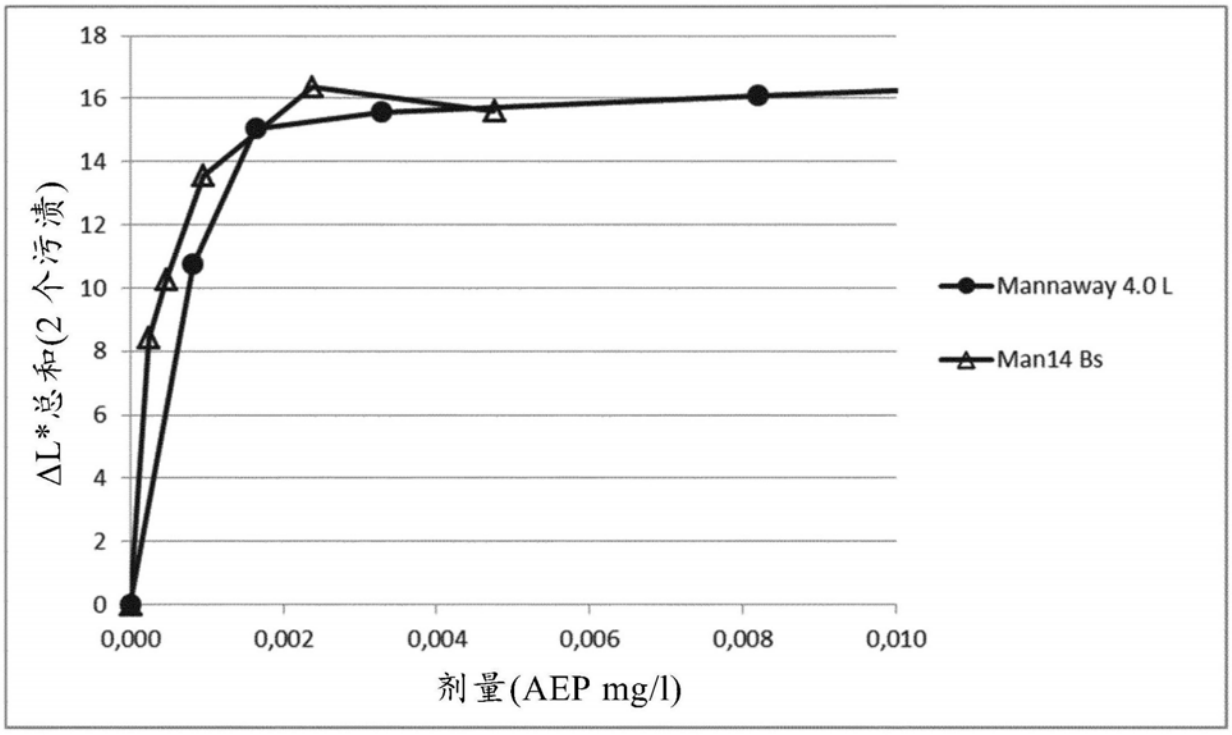

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ΔL*总和(2 个污渍)
0,000
0,002
0,004
0,006
0,008
0,010
剂量(AEP mg/l)
Mannaway 4.0 L
Man14 Bs

图12

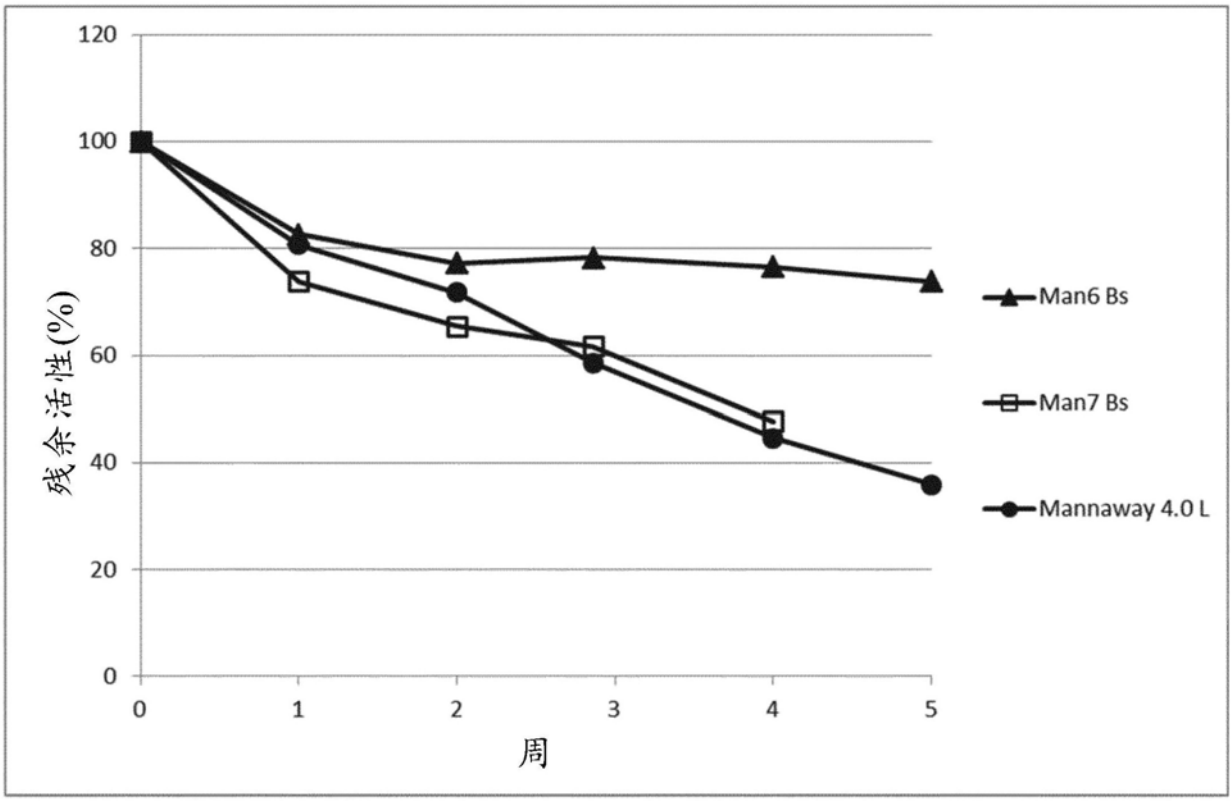


图13

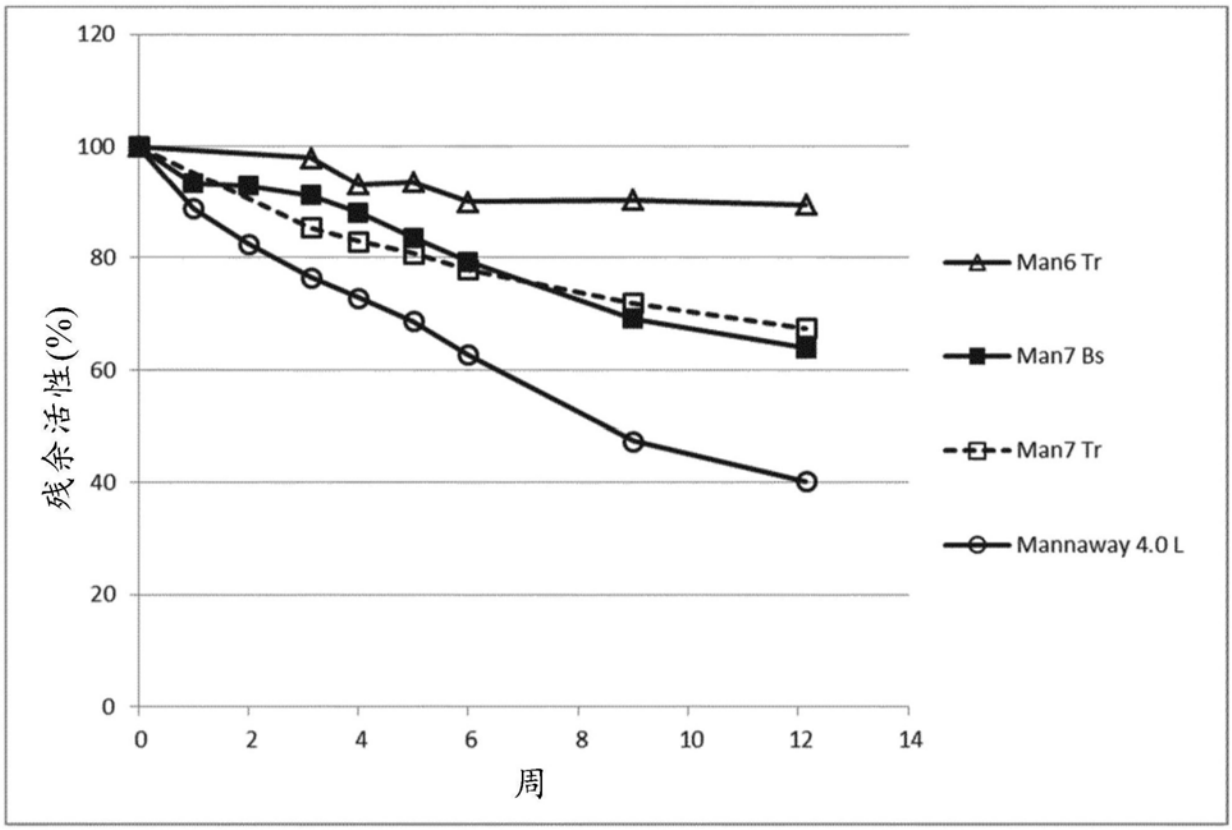

120
100
80
60
40
20
0
残余活性(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
周
Man6 Tr
Man7 Bs
Man7 Tr
Mannaway 4.0 L

图14