



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9911086-5 B1

(22) Data do Depósito: 10/06/1999

(45) Data de Concessão: 02/08/2016



(54) Título: COMPOSIÇÃO DE LIMPEZA, PROCESSO PARA TRATAR TECIDOS A MÁQUINA, E USO DE UMA MANANASE

(51) Int.Cl.: C12N 9/42

(30) Prioridade Unionista: 05/03/1999 DK PA 1999 00307, 05/03/1999 DK PA 1999 00309, 05/03/1999 DK PA 1999 00308, 05/03/1999 DK PA 1999 00306, 10/06/1998 US 09/111256, 20/10/1998 DK PA 1998 01340, 20/10/1998 DK PA 1998 01341, 23/12/1998 DK PA 1998 01725

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S

(72) Inventor(es): MARKUS SAKARI KAUPPINEN, MARTIN SCHÜLEIN, KIRK SCHNORR, LENE NONBOE ANDERSEN, MAD S ESKELUND BJØRNVAD

"COMPOSIÇÃO DE LIMPEZA, PROCESSO PARA TRATAR TECIDOS A MÁQUINA, E USO DE UMA MANANASE ".

A presente invenção diz respeito a mananases microbianas, mais especificamente a enzimas microbianas que exibem atividade de mananase como a sua principal atividade enzimática nas faixas de pH neutra e alcalina; a um método de produzir tais enzimas e a métodos par usar tais enzimas nas indústrias de processamento de papel e polpa, têxtil, perfuração de óleo, limpeza, lavanderia, detergente e fibra de celulose.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os polissacarídeos que contenham manana são um componente principal da fração de hemicelulose em madeiras e endospermas em muitas sementes de leguminosas e em algumas sementes maduras de vegetais não leguminosos. Essencialmente, a beta-1,4-manana linear, não substituída é encontrada em alguns vegetais não leguminosos. A beta-1,4-manana não substituída que está presente, por exemplo, nas jarinas parece-se com a celulose na conformação das cadeias individuais de polissacarídeo e é insolúvel em água. Nas sementes de leguminosas, a galactomanana solúvel em água é a principal armazenagem de carboidrato que compreende até 20 % do peso seco total. As galactomananas têm uma cadeia principal de beta-1,4-manana substituída por uma única alfa-1,6-galactose, opcionalmente substituída com grupos acetila. As mananas também são encontradas em

vários vegetais monocotiledôneos e são os polissacarídeos mais abundantes no material da parede celular na farinha da semente da palmeira. As glicomananas são polissacarídeos lineares com uma cadeia principal de manose e de glicose ligados a beta-1,4 que se alternam de uma maneira mais ou menos regular, a cadeia principal sendo opcionalmente substituída por grupos galactose e/ou acetila. As mananas, galactomananas, glicomananas e galactoglicomananas (isto é, as cadeias principais de glicomanana com galactose ramificada) contribuem para mais do que 50 % da hemicelulose da madeira mole. Além, disso, a celulose de muitas das algas vermelhas contém uma quantidade significativa de manose.

As mananases foram identificadas em diversos organismos de *Bacillus*. Por exemplo, Talbot *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, Nº 11, pp. 3505 a 3510 (1990) descreve uma beta-mananase derivada do *Bacillus stearothermophilus* na forma de dímero tendo peso molecular de 162 kDa e um pH ótimo de 5,5 a 7,5. Mendoza *et al.*, World J. Microbiol. Biotech, Vol. 10, Nº 5, pp. 551 a 555 (1994) descreve uma beta-mananase derivada do *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de 38 kDa, uma atividade ótima no pH 5,0 e a 55° C e um pI de 4,8. A JP-A-03047076 divulga uma beta-mananase derivada do *Bacillus sp.*, tendo um peso molecular de 37 ± 3 kDa medido pela filtração em gel, um pH ótimo de 8 a 10 e um pI de 5,3 a 5,4. A JP-A-63056289 descreve a produção de uma beta-mananase alcalina, termoestável que hidrolisa as ligações de beta-1,4-D-manopiranosídeo de, por exemplo, mananas e produz mano-oligossacarídeos. A JP-A-63036775 diz respeito ao microorganismo de *Bacillus* FERM P-8856 que produz beta-mananase e beta-manosidase em um pH alcalino. A JP-A-08051975 divulga beta-mananases alcalinas do *Bacillus sp.* alcalofílico AM-001 tendo pesos moleculares de 43 ± 3 kDa e $57 \pm$ kDa e pH ótimo de 8 a 10. Uma mananase purificada do *Bacillus amyloliquefaciens* utilizável no branqueamento de polpa e de papel e um método de sua preparação é

divulgado na WO 97/11164. A WO 91/18974 descreve uma hemicelulase tal como uma glicanase, xilanase ou mananase ativa em pH e temperatura extremos. A WO 94/25576 divulga uma enzima do *Aspergillus aculeatus*, CBS 101.43, que exhibe a atividade de mananase que pode ser utilizável para a degradação ou modificação de material de parede celular vegetal ou de algas. A WO 93/24622 divulga uma mananase isolada do *Trichoderma reesei* utilizável para o branqueamento de polpas lignocelulósicas.

A WO 95/35362 divulga composições de limpeza que contenham enzimas que degradam a parede celular vegetal tendo atividade de pectinase e/ou hemicelulase e opcionalmente de celulase para a remoção de manchas de origem vegetal e divulga ainda uma mananase alcalina da cepa C11SB.G17.

É um outro objetivo da presente invenção fornecer uma enzima nova e eficiente que apresente atividade de mananase também na faixa de pH alcalino, por exemplo, quando aplicado em composições de limpeza ou em processos industriais diferentes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os inventores descobriram agora novas enzimas tendo atividade substancial de mananase, isto é enzimas que apresentem atividade de mananase que podem ser obtidas de uma cepa bacteriana do gênero *Bacillus* e foram bem sucedidos na identificação das sequências de DNA que codificam tais enzimas. As sequências de DNA estão listadas na listagem de sequência como SEQ ID Nos: 1, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31 e as sequências de aminoácido deduzidas estão listadas na listagem de sequência como SEQ ID Nos: 2, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32, respectivamente. Acredita-se que as novas enzimas serão classificadas de acordo com a Nomenclatura de Enzima na Classe de Enzima EC 3.2.1.78.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma mananase que é i) um polipeptídeo produzido pelo *Bacillus sp.* I633, ii)

um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido como
mostrado nas posições de 31 a 330 da SEQ ID NO: 2 ou iii) um análogo do
polipeptídeo definido em i) ou ii) que seja pelo menos 65 % homólogo ao
dito polipeptídeo é derivado do dito polipeptídeo pela substituição, supressão
5 ou adição de um ou de vários aminoácidos ou que seja imunologicamente
reativo com um anticorpo policlonal incitado contra o dito polipeptídeo na
forma purificada.

Dentro de um aspecto, a presente invenção fornece uma
molécula isolada de polinucleotídeo selecionada do grupo que consiste de (a)
10 moléculas de polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo tendo atividade
de manase e que compreenda uma sequência de nucleotídeos como
apresentado na SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 91 ao nucleotídeo 990; (b)
espécies homólogas de (a); (c) moléculas de polinucleotídeo que codificam
um polipeptídeo tendo atividade de mananase que seja pelo menos 65 %
15 idêntico à sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do resíduo de
aminoácido 31 até o resíduo aminoácido 330; (d) moléculas complementares
a (a), (b) ou (c) e (e) sequências de nucleotídeo degenerado de (a); (b), (c) ou
(d).

O plasmídeo pBXM3 que compreende a molécula de
20 polinucleotídeo (a sequência de DNA) que codifica uma mananase da
presente invenção foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi
depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest sobre o
Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para os
Propósitos de Procedimento de Patente no Deutsche Sammlung von
25 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124
Braunschweig, Republica Federal da Alemanha, em 29 de maio de 1998 sob
o número de depósito DSM 12197.

Dentro de um outro aspecto da invenção forneceu-se um vetor
de expressão que compreende os seguintes elementos operavelmente ligados:

um promotor de transcrição; um segmento de DNA selecionado do grupo consistindo de (a) moléculas de polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo tendo atividade de mananase e que compreenda uma sequência de nucleotídeos como apresentado na SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 91 até o nucleotídeo 990; (b) espécies homólogas de (a); (c) moléculas de polinucleotídeo que codifiquem um polipeptídeo tendo atividade de mananase que seja pelo menos 65 % idêntico à sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do resíduo de aminoácido 31 até o resíduo aminoácido 330; e (d) sequências de nucleotídeo degenerado de (a), (b) ou (c); e um terminador de transcrição.

Dentro de um outro aspecto da presente invenção forneceu-se uma célula cultivada na qual foi introduzido um vetor de expressão como divulgado acima, em que a dita célula expressa o polipeptídeo codificado pelo segmento de DNA.

Outros aspectos da presente invenção fornecem um polipeptídeo isolado tendo atividade de mananase selecionado do grupo que consiste de (a) moléculas de polipeptídeo que compreendam uma sequência de resíduos de aminoácido como apresentado na SEQ ID NO: 2 do resíduo de aminoácido 31 até o resíduo de aminoácido 330; (b) espécies homólogas de (a); e uma proteína de fusão tendo atividade de mananase que compreende uma primeira parte de polipeptídeo que apresenta atividade de mananase e uma segunda parte de polipeptídeo que apresenta a função de ligação de celulose, o segundo polipeptídeo sendo preferivelmente um domínio de ligação de celulose (CBD), tal como uma proteína de fusão representada pela SEQ ID NO: 4.

Dentro de um outro aspecto da presente invenção forneceu-se uma composição que compreende um polipeptídeo purificado de acordo com a invenção em combinação com outros polipeptídeos.

Dentro de um outro aspecto da presente invenção forneceu-se

métodos para produzir um polipeptídeo de acordo com a invenção que compreende cultivar uma célula na qual foi introduzido um vetor de expressão como divulgado acima, por meio do qual a dita célula expressa um polipeptídeo codificado pelo segmento de DNA e de recuperar o polipeptídeo.

A nova enzima da presente invenção é utilizável para o tratamento de material celulósico, especialmente fibras que contenham celulose, fios, tecidos ou não tecidos, tratamento de polpas de fabricar papel mecânico, polpas de papel kraft ou papel de sobras recicladas e para a maceração de fibras. O tratamento pode ser realizado durante o processamento do material celulósico em um material pronto para a fabricação de papel ou de peças de roupa ou de tecido, o último, por exemplo, na etapa de desengomadura ou de lavagem; ou durante a lavagem industrial ou doméstica de tal tecido ou peça de roupa.

Consequentemente, em outros aspectos a invenção diz respeito a uma composição de limpeza ou de detergente que compreende a enzima da invenção e a uso da enzima da invenção para o tratamento, por exemplo, limpeza, de fibras, fios, tecido ou não tecido, que contenham celulose, bem como tecidos sintéticos ou parcialmente sintéticos.

É considerado que a enzima da invenção é utilizável em um processo de lavagem e/ou desengomadura (remoção da goma manana) na preparação de material celulósico, por exemplo, para uma resposta apropriada nas operações subsequentes de tingimento. A enzima também é útil para a remoção de pasta de impressão que contenha manana. Além disso, as composições detergentes que compreendem a nova enzima são capazes de remover ou branquear certas sujeiras ou manchas presentes na lavagem de roupa, especialmente sujeiras e manchas que resultam de alimentos, vegetais e outros que contenham manana. Além disso, o tratamento com as composições de limpeza ou de detergente que compreendam a nova enzima

pode melhorar a brancura bem como impedir a ligação de certas sujeiras ao material celulósico.

Consequentemente, a presente invenção também diz respeito a composições de limpeza, incluindo composições de lavar roupas, de lavagem
5 de louça, limpadoras de superfície dura, de limpeza pessoal e orais/dentais, que compreendam a mananase da invenção. Além disso, a invenção diz respeito a tais composições de limpeza que compreendam uma mananase e uma enzima selecionada de celulasas, proteases, lipases, amilases, enzimas que degradam a pectina e xiloglicanases, tais composições fornecendo
10 desempenho superior de limpeza, isto é remoção superior de manchas, remoção de encardidos ou manutenção da brancura.

DEFINIÇÕES

Antes de debater esta invenção em mais detalhes, os seguintes termos serão primeiro definidos.

15 O termo “ortólogo” (ou “espécie homóloga”) denota um polipeptídeo ou proteína obtidos de uma espécie que tenha homologia a um polipeptídeo ou proteína análogos de uma espécie diferente.

O termo “parálogo” denota um polipeptídeo ou proteína obtidos de uma espécie dada que tenha homologia a um polipeptídeo ou
20 proteína diferentes desta mesma espécie.

O termo “vetor de expressão” denota uma molécula de DNA, linear ou circular que compreenda um segmento que codifica um polipeptídeo de interesse operacionalmente ligado a segmentos adicionais que fornecem a sua transcrição. Tais segmentos adicionais podem incluir
25 sequências promotoras e terminadoras e podem opcionalmente incluir uma ou mais origens de replicação, um ou mais marcadores selecionáveis, um acentuador, um sinal de poliadenilação e outros. Os vetores de expressão são, no geral, derivados de DNA plasmídico ou viral ou podem conter elementos de ambos. O vetor de expressão da invenção pode ser qualquer vetor de

expressão que esteja convenientemente submetido a procedimentos de DNA recombinante e a escolha do vetor dependerá frequentemente da célula hospedeira na qual o vetor deve ser introduzido. Desta maneira, o vetor pode ser um vetor de replicação autônoma, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, a replicação do qual é independente da replicação do cromossoma, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido em uma célula hospedeira é integrado no genoma da célula hospedeira e replicado junto com o(s) cromossoma(s) no(s) qual(is) foi integrado.

10 O termo “recombinante expressado” ou “recombinantemente expressado” usado aqui em conexão com a expressão de um polipeptídeo ou proteína é definido de acordo com a definição padrão na técnica. A expressão recombinante de uma proteína é realizada, no geral, usando-se um vetor de expressão como descrito imediatamente acima.

15 O termo “isolado”, quando aplicado a uma molécula de polinucleotídeo, denota que o polinucleotídeo foi removido do seu ambiente genético natural e está, desta maneira, livre de outras sequências codificadoras estranhas ou não desejadas e está em uma forma adequada para o uso dentro de sistemas de produção de proteína geneticamente engendradas. Tais moléculas isoladas são aquelas que são separadas do seu ambiente natural e incluem cDNA e clones genômicos. As moléculas de DNA isoladas da presente invenção são livres de outros genes com os quais são habitualmente associados, porém podem incluir regiões não traduzidas 5’ e 3’ que ocorram naturalmente tais como promotores e terminadores. A identificação de regiões associadas estará evidente a uma pessoa de habilidade comum na técnica (ver por exemplo, Dynan e Tijan, Nature 316: 774 a 778, 1985). O termo “um polinucleotídeo isolado” pode ser
25 alternativamente denominado “um polinucleotídeo clonado”.

Quando aplicado a uma proteína/polipeptídeo, o termo

“isolado” indica que a proteína é encontrada em uma condição outra que não no seu ambiente natural. Em uma forma preferida, a proteína isolada é substancialmente livre de outras proteínas, particularmente de outras proteínas homólogas (isto é, “impurezas homólogas” (ver abaixo)). É preferido fornecer a proteína em uma forma mais do que 40 % pura, mais preferivelmente em uma forma mais do que 60 % pura.

Ainda mais preferivelmente é preferível fornecer a proteína em uma forma altamente purificada, isto é, mais do que 80 % pura, mais preferivelmente mais do que 95 % pura e ainda mais preferivelmente mais do que 99 % pura, como determinado pelo SDS-PAGE.

O termo “proteína/polipeptídeo isolados” pode ser alternativamente denominado “proteína/polipeptídeo purificados”.

O termo “impurezas homólogas” significa qualquer impureza (por exemplo, um outro polipeptídeo que não o polipeptídeo da invenção) que origina da célula homóloga quando o polipeptídeo da invenção é originalmente dela obtido.

O termo “obtido de” como aqui usado em conexão com uma fonte microbiana específica, significa que o polinucleotídeo e/ou o polipeptídeo é produzido pela fonte específica (expressão homóloga) ou por uma célula em que um gene da fonte foi inserido (expressão heteróloga).

O termo “operacionalmente ligado”, quando se refere a segmentos de DNA, denota que os segmentos são dispostos de modo que a sua função de comum acordo com o seu propósito pretendido, por exemplo, iniciar a transcrição no promotor e prosseguir através do segmento codificador par ao terminador.

O termo “polinucleotídeo” denota um polímero de filamento único ou duplo de bases de desoxirribonucleotídeo ou de ribonucleotídeo lidas da extremidade 5' para a extremidade 3'. Os polinucleotídeos incluem RNA e DNA e podem ser isolados de fontes naturais, sintetizados *in vitro* ou

preparados a partir de uma combinação de moléculas naturais e sintéticas

O termo “complementos de moléculas de polinucleotídeo” denota moléculas de polinucleotídeo que tenham uma sequência de base complementar e de orientação reversa quando comparada a uma sequência de referência. Por exemplo, a sequência 5’ ATGCACGGG 3’ é complementar à 5’ CCCGTGCAT 3’.

O termo “sequência degenerada de nucleotídeo” denota uma sequência de nucleotídeos que inclui um ou mais códons degenerados (quando comparados a uma molécula de polinucleotídeo de referência que codifica um polipeptídeo). Os códons degenerados contêm tripletos diferentes de nucleotídeos, porém codificam o mesmo resíduo de aminoácido (isto é, os tripletos GAU e GAC codificam cada um o Asp).

O termo “promotor” denota uma porção de um gene contendo sequências de DNA que fornecem a ligação da RNA polimerase e o início da transcrição. As sequências promotoras são habitualmente, porém não sempre, encontradas nas regiões não codificadoras 5’ dos genes.

O termo “sequência secretora de sinal” denota uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo (um “peptídeo secretor”) que, como um componente de um polipeptídeo maior direciona o polipeptídeo maior através de um caminho secretor de uma célula em que é sintetizado. O peptídeo maior é habitualmente privado para se remover o peptídeo secretor durante o trânsito através do caminho secretor.

O termo “núcleo de enzima” denota uma enzima de domínio único que pode ou não ter sido modificada ou alterada, porém que reteve a sua atividade original; o domínio catalítico como conhecido na técnica permaneceu intacto e funcional.

Pelo termo “ligador” ou “espaçador” pretende-se um polipeptídeo que compreenda pelo menos dois aminoácidos que podem estar presentes entre os domínios de uma proteína de domínio múltiplo, por

exemplo, uma enzima que compreenda um núcleo de enzima e um domínio de ligação tal como um domínio de ligação de celulose (CBD) ou qualquer outro híbrido de enzima ou entre duas proteínas ou polipeptídeos expressados como um polipeptídeo de fusão, por exemplo, uma proteína de fusão que
 5 compreenda duas enzimas de núcleo. Por exemplo, a proteína de fusão de um núcleo de enzima com um CBD é fornecida pela fusão de uma sequência de DNA que codifica o núcleo de enzima, uma sequência de DNA que codifica o ligador e uma sequência de DNA que codifica o CBD, sequencialmente em uma matriz de leitura aberta e que expressa esta construção.

10 O termo “mananase” ou “galactomananase” denota uma enzima de mananase definida de acordo com a técnica como sendo oficialmente chamada de endo-1,4-beta-manosidase de manana e tendo os nomes alternativos de beta-mananase e de endo-1,4-mananase e que catalisa as hidrólises das ligações 1,4-beta-D-manosídicas nas mananas,
 15 galactomananas, glicomananas e galactoglicomananas cuja enzima é classificada de acordo com a Nomenclatura de Enzima como EC 3.2.1.78 (<http://www.expasy.ch/enzyme>).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como usar a sequência da invenção para se obter outras
 20 sequências relacionadas: A informação de sequência divulgada aqui em relação a uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma mananase da invenção pode ser usada como uma ferramenta para se identificar outras mananases homólogas. Por exemplo, a reação de polimerase de cadeia (PCR) pode ser usada para amplificar sequências que codificam outras mananases
 25 homólogas a partir de uma variedade de fontes microbianas, em particular de diferentes espécies de *Bacillus*.

ENSAIO PARA TESTE DE ATIVIDADE

Um polipeptídeo da invenção que tenha atividade de mananase pode ser testado quanto a atividade de mananase de acordo com

procedimentos padrão de teste conhecidos na técnica, tais como pela aplicação de uma solução a ser testada a furos de 4 mm de diâmetro escavados em placas de agar contendo 0,2 % de AZCL galactomanana (alfarroba), isto é o substrato para o ensaio de endo-1,4-beta-D-mananase disponível como CatN^o I-AZGMA da companhia Megazyme (endereço da Megazyme na Internet: <http://www.megazyme.com/Purchase/index.html>).

POLINUCLEOTÍDEOS

Dentro das modalidades preferidas da invenção, um polinucleotídeo isolado da invenção hibridizará com regiões similarmente dimensionadas da SEQ ID NO: 1 ou com uma sequência complementar a esta, sob condições de pelo menos média severidade.

Em particular os polinucleotídeos da invenção hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 1 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 91 a 990 da SEQ ID NO: 1 seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 91 a 990 da SEQ ID NO: 1, cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes abaixo. As condições experimentais adequadas para se determinar a hibridização em severidade média ou alta entre uma sonda de nucleotídeo e uma sequência homóloga de DNA ou RNA envolve pré embeber o filtro contendo os fragmentos de DNA ou o RNA a hibridizar em 5 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio, Sambrook *et al.*, 1989) durante 10 minutos e a pré hibridização do filtro em uma solução de 5 x SSC, 5 x solução de Denhardt (Sambrook *et al.*, 1989), 0,5 % de SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturizado, sonificado (Sambrook *et al.*, 1989), seguido pela

hibridização na mesma solução contendo uma concentração de 10 ng/ml de uma sonda imprimada aleatoriamente (Feinberg, A. P. e Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132: 6 a 13), rotulada com 32P-dCTP (atividade específica maior do que 1×10^9 cpm/ μ g) por 12 horas em cerca de 45° C. O
5 filtro é depois lavado duas vezes durante 30 minutos em 2 x SSC, 0,5 % de SDS a pelo menos 60° C (severidade média), ainda mais preferivelmente a pelo menos 65° C (severidade média/alta), ainda mais preferivelmente a pelo menos 70° C (severidade alta) e ainda mais preferivelmente a pelo menos 75° C (severidade muito alta).

10 As moléculas com as quais a sonda de oligonucleotídeo hibridiza sob estas condições são detectadas usando-se uma película de raios X.

Outros polinucleotídeos isolados úteis são aqueles que hibridizarão com regiões similarmente dimensionadas das SEQ ID NO: 5,
15 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 ou SEQ ID NO: 31, respectivamente ou com uma sequência complementar a estas, sob condições de pelo menos média severidade.

20 Particularmente utilizáveis são os polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 5 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 94 a 1032 da SEQ ID NO: 5, seguimento este que codifica o domínio
25 cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 94 a 1032 da SEQ ID NO: 5, cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como

descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 9 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 94 a 1086 da SEQ ID NO: 9, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 94 a 1086 da SEQ ID NO: 9, cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 11 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 97 a 993 da SEQ ID NO: 11, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 97 a 993 da SEQ ID NO: 11 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 13 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 498 a 1464 da SEQ ID NO: 13, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 498 a 1464 da SEQ ID NO: 13 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém

preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 15 ou uma sequência parcial que

5 compreenda o segmento apresentado nas posições de 204 a 1107 da SEQ ID NO: 15, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 204 a 1107 da

10 SEQ ID NO: 15 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência

15 apresentada na SEQ ID NO: 17 ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência da SEQ ID NO: 17 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com

20 uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência apresentada na SEQ ID NO: 19 ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência da SEQ ID NO: 19 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que

25 hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 21 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 88 a 960 da SEQ ID NO: 21, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou

qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 88 a 960 da SEQ ID NO: 21 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 23 ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência da SEQ ID NO: 23 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 25 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 904 a 1874 da SEQ ID NO: 25, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 904 a 1874 da SEQ ID NO: 25 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 27 ou uma sequência parcial que compreenda o segmento apresentado nas posições de 498 a 1488 da SEQ ID NO: 27, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 498 a 1488 da SEQ ID NO: 27 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém

preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 29 ou uma sequência parcial que
5 compreenda o segmento apresentado nas posições de 79 a 1083 da SEQ ID NO: 29, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 79 a 1083 da SEQ ID NO: 29 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca
10 de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima; bem como polinucleotídeos que hibridizarão com uma sonda desnaturizada de DNA de filamento duplo que compreenda a sequência completa apresentada na SEQ ID NO: 31 ou uma sequência parcial que
15 compreenda o segmento apresentado nas posições de 1779 a 2709 da SEQ ID NO: 31, seguimento este que codifica o domínio cataliticamente ativo ou o núcleo de enzima da mananase da invenção ou qualquer sonda que compreenda uma subsequência apresentada nas posições de 1779 a 2709 da SEQ ID NO: 31 cuja subsequência tem um comprimento de pelo menos cerca
20 de 100 pares de base sob condições de pelo menos média severidade, porém preferivelmente em condições de alta severidade como descrito em detalhes acima.

Como anteriormente observado, os polinucleotídeos isolados da presente invenção incluem DNA e RNA. Os métodos para isolar o DNA e
25 o RNA são bem conhecidos na técnica. O DNA e o RNA que codificam genes de interesse podem ser clonados em Bancos de Gene ou em bibliotecas de DNA por meio de métodos conhecidos na técnica.

Os polinucleotídeos que codificam polipeptídeos que tenham a atividade de mananase da invenção são depois identificados e isolados, por

exemplo, por hibridização ou PCR.

A presente invenção ainda fornece polipeptídeos e polinucleotídeos de contraparte de diferentes cepas bacterianas (ortólogos ou parálogos). São de interesse particular os polipeptídeos de mananase das
5 cepas alcalofílicas gram-positivas, incluindo as espécies de *Bacillus* tais como *Bacillus sp.*, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus clausii* e *Bacillus licheniformis*; e polipeptídeos de mananase do grupo *Thermoanaerobacter*, que inclui as espécies do *Caldicellulosiruptor*. Da mesma maneira, os polipeptídeos de mananase do fungo *Humicola* ou
10 *Scytalidium*, em particular da espécie *Humicola insolens* ou *Scytalidium thermophilum* são de interesse.

As espécies homólogas de um polipeptídeo com atividade de mananase da invenção podem ser clonadas usando-se a informação e as composições fornecidas pela presente invenção em combinação com técnicas
15 convencionais de clonagem. Por exemplo, uma sequência de DNA da presente invenção pode ser clonada usando-se o DNA cromossômico obtido de um tipo de célula que expresse a proteína. As fontes adequadas de DNA podem ser identificadas investigando-se os Northern e Southern blots com sondas planejadas a partir das sequências aqui divulgadas. Uma biblioteca é
20 então preparada a partir do DNA cromossômico de uma linha celular positiva. Uma sequência de DNA da invenção que codifica um polipeptídeo tendo atividade de mananase pode ser depois isolada por uma variedade de métodos, tais como investigando-se com sondas planejadas a partir das sequências divulgadas no presente relatório descritivo e reivindicações ou
25 com um ou mais dos conjuntos de sondas degeneradas com base nas sequências divulgadas. Uma sequência de DNA da invenção também pode ser clonada usando-se a reação de polimerase de cadeia ou PCR (Mullis, Patente U.S. 4.683.202), usando-se iniciadores planejados a partir das sequências aqui divulgadas. Dentro de um método adicional, a biblioteca de

DNA pode ser usada para transformar ou transfectar células hospedeiras e a expressão do DNA de interesse pode ser detectada com um anticorpo (monoclonal ou policlonal) incitado contra a mananase clonada do *B.sp*, expressada e purificada como descrito no capítulo Materiais e Métodos e no Exemplo 1 ou por um teste de atividade relacionado a um polipeptídeo que tenha atividade de mananase.

A parte que codifica a mananase da sequência de DNA (SEQ ID NO: 1) clonada no plasmídeo pBXM3 presente no *Escherichia coli* DSM 12197 e/ou uma sequência de DNA análoga da invenção pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* I633, ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 5) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 18 de maio de 1998 sob o número de depósito DSM 12180; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 5) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus agaradhaerens*, por exemplo, a partir da cepa do tipo DSM 8721, ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 9) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 7 de outubro de 1998 sob o número de depósito DSM 12433; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 9) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* AAI12 ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 11) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 9 de outubro de 1998 sob o número de depósito DSM 12441; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 11) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus halodurans* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 13) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 11 de maio de 1995 sob o número de depósito DSM 9984; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 13) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode

ser clonada a partir de uma cepa da espécie fúngica *Humicola insolens*, ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

5 A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 15) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da
10 Alemanha em 5 de outubro de 1998 sob o número de depósito DSM 12432; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 15) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* AA349 ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

15 A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 17) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the
20 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12847; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 17) e/ou uma sequência de DNA análoga
25 desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 19) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de

acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12848
5 esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 19) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

10 A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 21) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the
15 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12849; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 21) e/ou uma sequência de DNA análoga
20 desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus clausii* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 23) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de
25 acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12850;

esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 23) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

5 A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 25) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the
10 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12846; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 25) e/ou uma sequência de DNA análoga
15 desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

 A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 27) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the
20 Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12851; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a
25 sequência de DNA da SEQ ID NO: 27) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus sp.* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

 A parte que codifica a mananase da molécula de

polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 29) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 4 de junho de 1999 sob o número de depósito DSM 12852; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 29) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus licheniformis* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

A parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 31) foi transformada em uma cepa do *Escherichia coli* que foi depositada pelos inventores de acordo com o Tratado de Budapest no International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Republica Federal da Alemanha em 5 de outubro de 1998 sob o número de depósito DSM 12436; esta parte que codifica a mananase da molécula de polinucleotídeo (a sequência de DNA da SEQ ID NO: 31) e/ou uma sequência de DNA análoga desta pode ser clonada a partir de uma cepa da espécie bacteriana *Caldicellulosiruptor sp.* ou um outro organismo relacionado como aqui descrito.

Alternativamente, a sequência análoga pode ser construída com base na sequência de DNA obténível do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12197 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 1), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12180 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 5), do plasmídeo presente

no *Escherichia coli* DSM 12433 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 9), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12441 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 11), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 9984 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 13), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12432 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 15), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12847 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 17), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12848 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 19), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12849 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 21), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12850 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 23), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12846 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 25), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12851 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 27), do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12852 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 29) ou do plasmídeo presente no *Escherichia coli* DSM 12436 (que acredita-se seja idêntico ao ligado na SEQ ID NO: 31), por exemplo, seja uma subsequência deste e/ou pela introdução de substituições de nucleotídeo que não dê origem a uma outra sequência de aminoácido da mananase codificada pela sequência de DNA, mas que corresponda ao uso do códon do organismo hospedeiro pretendido para a produção da enzima ou pela introdução de substituições de nucleotídeo que possam dar origem a uma sequência de aminoácido diferente (isto é, uma variante da enzima que degrada a manana da invenção).

POLIPEPTÍDEOS

A sequência de aminoácidos nas posições de 31 a 490 da SEQ ID NO: 2 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 30 da SEQ ID NO: 2 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a

subsequência de aminoácidos nas posições de 31 a 330 da SEQ ID NO: 2 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende um ligador nas posições 331 a 342 e pelo menos um domínio de terminal C de função desconhecida nas posições de 343 a 490. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 31 a 330 da SEQ ID NO: 2, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente. O domínio tendo a subsequência de aminoácidos n^{os} de 343 a 490 da SEQ ID NO: 2 é um domínio da enzima de mananase de função desconhecida, este domínio sendo altamente homólogo com domínios similares em mananases conhecidas, conforme o exemplo 1.

15 A sequência de aminoácidos nas posições de 32 a 494 da SEQ ID NO: 6 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 31 da SEQ ID NO: 6 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 32 a 344 da SEQ ID NO: 6 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos um domínio de terminal C de função desconhecida nas posições de 345 a 494. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 32 a 344 da SEQ ID NO: 6, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos nas posições de 32 a 586 da SEQ ID NO: 10 é uma sequência de mananase madura. A sequência de

aminoácidos n^{os} de 1 a 31 da SEQ ID NO: 10 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 32 a 362 da SEQ ID NO: 10 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos um domínio de terminal C de função desconhecida nas posições de 363 a 586. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 32 a 362 da SEQ ID NO: 10, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos nas posições de 33 a 331 da SEQ ID NO: 12 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 32 da SEQ ID NO: 12 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 33 a 331 da SEQ ID NO: 12 seja o domínio catalítico da enzima mananase. Este núcleo de enzima de mananase compreende a sequência de aminoácidos n^{os} de 33 a 331 da SEQ ID NO: 12, isto é um domínio catalítico, podendo ou não ser ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente, isto é sendo parte de uma proteína de fusão.

A sequência de aminoácidos nas posições de 22 a 488 da SEQ ID NO: 14 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 21 da SEQ ID NO: 14 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 166 a 488 da SEQ ID NO: 14 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos um domínio de terminal N de função desconhecida nas posições de 22 a 164. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a

presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 166 a 488 da SEQ ID NO 14 isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros
5 domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos nas posições de 26 a 369 da SEQ ID NO: 16 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 25 da SEQ ID NO: 16 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 68 a 369 da SEQ ID
10 NO: 16 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos um domínio de terminal N de função desconhecida nas posições de 26 a 67. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que
15 compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 68 a 369 da SEQ ID NO: 16, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18 é uma
20 sequência parcial que forma parte de uma sequência de mananase madura. A presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 305 da SEQ ID NO: 18.

A sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20 é uma sequência parcial que forma parte de uma sequência de mananase madura. A
25 presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 132 da SEQ ID NO: 20.

A sequência de aminoácidos nas posições de 29 a 320 da SEQ ID NO: 22 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 28 da SEQ ID NO: 22 é o peptídeo de sinal. Acredita-

se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 23 a 320 da SEQ ID NO: 22 seja o domínio catalítico da enzima mananase. Este núcleo de enzima mananase compreende a sequência de aminoácido n^{os} de 29 a 320 da SEQ ID NO: 22 isto é um domínio catalítico, podendo ou não ser ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente, isto é sendo parte de uma proteína de fusão.

A sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24 é uma sequência parcial que forma parte de uma sequência de mananase madura. A presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 29 a 188 da SEQ ID NO: 24.

A sequência de aminoácidos nas posições de 30 a 815 da SEQ ID NO: 26 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 29 da SEQ ID NO: 26 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 301 a 625 da SEQ ID NO: 26 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos dois domínio de terminal N de função desconhecida nas posições de 44 a 166 e de 195 a 300, respectivamente, e um domínio de terminal C de função desconhecida nas posições de 626 a 815. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 301 a 625 da SEQ ID NO: 26, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos nas posições de 38 a 496 da SEQ ID NO: 28 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 37 da SEQ ID NO: 28 é o peptídeo de sinal. Acredita-

se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 166 a 496 da SEQ ID NO: 28 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos um domínio de terminal N de função desconhecida nas posições de 38 a 165. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de aminoácidos n^{os} de 166 a 496 da SEQ ID NO: 28, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos nas posições de 26 a 361 da SEQ ID NO: 30 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 25 da SEQ ID NO: 30 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 26 a 361 da SEQ ID NO: 30 seja o domínio catalítico da enzima mananase. Este núcleo de enzima mananase compreende a sequência de aminoácido n^{os} de 26 a 361 da SEQ ID NO: 30 isto é um domínio catalítico, podendo ou não ser opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

A sequência de aminoácidos nas posições de 23 a 903 da SEQ ID NO: 32 é uma sequência de mananase madura. A sequência de aminoácidos n^{os} de 1 a 22 da SEQ ID NO: 32 é o peptídeo de sinal. Acredita-se que a subsequência de aminoácidos nas posições de 593 a 903 da SEQ ID NO: 32 seja o domínio catalítico da enzima mananase e que a enzima madura adicionalmente compreende pelo menos três domínio de terminal N de função desconhecida nas posições de 23 a 214, de 224 a 424 e de 434 a 592, respectivamente. Visto que o objetivo da presente invenção é obter um polipeptídeo que exiba atividade de mananase, a presente invenção diz respeito a qualquer enzima de mananase que compreenda a sequência de

aminoácidos n^{os} de 593 a 903 da SEQ ID NO: 32, isto é um domínio catalítico, opcionalmente ligado de modo operável, no terminal N ou no terminal C, a um ou dois ou a mais do que dois outros domínios de uma funcionalidade diferente.

5 A presente invenção também fornece polipeptídeos de mananase que são substancialmente homólogos aos polipeptídeos da SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32, respectivamente e espécies homólogas (parálogos ou ortólogos) destas. O termo “substancialmente homólogo” é aqui usado para denotar polipeptídeos que tenham 65 %, preferivelmente pelo menos 70 %, mais preferivelmente pelo menos 75 %, mais preferivelmente pelo menos 80 %, mais preferivelmente pelo menos 85 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 90 % de identidade de sequência à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 33 a 340 ou n^{os} 33 a 490 da SEQ ID NO: 2 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 32 a 344 ou n^{os} 32 a 494 da SEQ ID NO: 6 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 32 a 362 ou n^{os} 32 a 586 da SEQ ID NO: 10 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 33 a 331 da SEQ ID NO: 12 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 166 a 488 ou n^{os} 22 a 488 da SEQ ID NO: 14 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 68 a 369 ou n^{os} 32 a 369 da SEQ ID NO: 16 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 1 a 305 da SEQ ID NO: 18 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 1 a 132 da SEQ ID NO: 20 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 29 a 320 da SEQ ID NO: 22 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência

apresentada nos aminoácidos n^{os} 29 a 188 da SEQ ID NO: 24 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 301 a 625 ou n^{os} 30 a 625 da SEQ ID NO: 26 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 166 a 496 ou n^{os} 38 a 496 da SEQ ID NO: 28 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 26 a 361 da SEQ ID NO: 30 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 593 a 903 ou n^{os} 23 a 903 da SEQ ID NO: 32 ou seus ortólogos ou parálogos.

Tais polipeptídeos mais preferivelmente serão pelo menos 95 % idênticos e mais preferivelmente 98 % ou mais idênticos à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 31 a 330 ou n^{os} 31 a 490 da SEQ ID NO: 2 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 32 a 344 ou n^{os} 32 a 494 da SEQ ID NO: 6 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 32 a 362 ou n^{os} 32 a 586 da SEQ ID NO: 10 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 33 a 331 da SEQ ID NO: 12 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 166 a 488 ou n^{os} 22 a 488 da SEQ ID NO: 14 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 68 a 369 ou n^{os} 32 a 369 da SEQ ID NO: 16 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 1 a 305 da SEQ ID NO: 18 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 1 a 132 da SEQ ID NO: 20 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 29 a 320 da SEQ ID NO: 22 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 29 a 188 da SEQ ID NO: 24 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 301 a 625 ou n^{os} 30 a 625 da SEQ ID NO: 26 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 166 a 496 ou n^{os} 38 a 496 da SEQ ID NO: 28 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada

nos aminoácidos n^{os} 26 a 361 da SEQ ID NO: 30 ou seus ortólogos ou parálogos; ou à sequência apresentada nos aminoácidos n^{os} 593 a 903 ou n^{os} 23 a 903 da SEQ ID NO: 32 ou seus ortólogos ou parálogos.

O percentual de identidade de sequência é determinado por métodos convencionais, por meio de programas de computador conhecidos na técnica tais como o GAP fornecido no pacote de programa GCG (Manual de Programa para o Wisconsin Package, Versão 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) como divulgado em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443 a 453, que é por intermédio desta incorporada por referência em sua totalidade. O GAP é usado com os seguintes ajustes para a comparação de sequência de polipeptídeo: penalidade de criação GAP de 3,0 e penalidade de extensão GAP de 0,1.

A identidade de sequência de moléculas de polinucleotídeo é determinada por métodos similares usando-se o GAP com os seguintes ajustes para comparação de sequência de DNA: penalidade de criação GAP de 5,0 e penalidade de extensão GAP de 0,3.

A preparação de enzima da invenção é preferivelmente derivada de um microorganismo, preferivelmente de uma bactéria, de uma *archaea* ou um fungo, especialmente de uma bactéria tal como uma bactéria pertencente ao *Bacillus*, preferivelmente a uma cepa de *Bacillus* que pode ser selecionado do grupo que consiste da espécie *Bacillus sp.* e espécies de *Bacillus* altamente relacionadas em que todas as espécies são preferivelmente pelo menos 95 %, ainda mais preferivelmente pelo menos 98 % homólogas ao *Bacillus sp.* I633, *Bacillus halodurans* ou *Bacillus sp.* AAI12, com base no alinhamento das sequências de rDNA 16S.

Estas espécies são reivindicadas com base nos relacionamentos filogenéticos identificados a partir das sequências de rDNA 16S alinhadas do RDP (Ribosomal Database Project) (Bonne L. Maidak,

Neils Larson, Michael J. McCaughey, Ross Overbeek, Gary J. Olsen, Karl Fogel, James Blandy e Carl R. Woese, Nucleic Acids Research, 1994, Vol 22, Nº 17, p. 3485 a 3487, The Ribosomal Database Project). O alinhamento foi fundamentado na estrutura secundária. O cálculo das similaridades de sequência foram estabelecidas usando-se o “Cálculo de matriz completa” com ajustes por falta do método de união adjacente, integrado no pacote de programa ARB (Oliver Strunk e Wolfgang Ludwig, Technical University of Munich, Alemanha).

As informações derivadas da tabela II são as bases para a reivindicação de toda a família de 5 mananases das espécies de *Bacillus* altamente relacionadas em que todas as espécies acima de 93 % de homologia em relação ao *Bacillus* sp. I633 são reivindicadas. Estas incluem: *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus pseudoalcalophilus* e *Bacillus clausii*. Ver a Figura 1: Árvore filogenética gerada do programa ARP que relaciona as espécies mais próximas ao *Bacillus* sp. I633. O RNA 16S é mostrado na SEQ ID NO: 33.

TABELA II

Índice de homologia do rna ribossômico 16S para espécies selecionadas de *Bacillus*

	BaiSpor2	BaiAlcal	BaiSpec3	BaiSpec5	B.sp.I633
BaiSpor2		92.75%	92.98%	92.41%	93.43%
BaiAlcal			98.11%	94.69%	97.03%
BaiSpec3				94.49%	96.39%
BaiSpec5					93.67%

BaiSpor2 = *B. sporothermodurans*, u49079

BaiAlcal = *B. B. alcalophilus*, x76436

BaiSpec3 = *B. pseudoalcalophilus*, x76449

BaiSpec5 = *B. clausii*, x76440

Outras 5 famílias úteis de mananases são aquelas derivadas

das espécies *Bacillus* altamente relacionadas em que todas as espécies apresentam mais do que 93 % de homologia ao *Bacillus halodurans* com base nas sequências 16S alinhadas. Estas espécies de *Bacillus* incluem: *Sporolactobacillus laevis*, *Bacillus agaradhaerens* e *Marinococcus halophilus*. Ver a Figura 2: árvore filogenética gerada do programa ARP que relaciona espécies mais próximas ao *Bacillus halodurans*.

TABELA III

Índice de homologia do RNA ribossômico 16s para espécies de *Bacillus* selecionadas

	SplLaev3	BaiSpec6	BaiSpe11	MaoHalo2	NN
SplLaev3		90.98%	87.96%	85.94%	91.32%
BaiSpec6			91.63%	87.96%	99.46%
BaiSpe11				89.04%	92.04%
MaoHalo2					88.17%

NN

SplLaev3 = *Sporolactobacillus laevis*, D16287

BaiSpec6 = *B. halodurans*, X76442

BaiSpe11 = *B. agaradhaerens*, X76445

MaoHalo2 = *Marinococcus halophilus*, X62171

10 NN = organismo doador da invenção (*B. halodurans*)

Outras 5 famílias de mananases utilizáveis são aquelas derivadas de uma cepa selecionada do grupo que consiste das espécies *Bacillus agaradhaerens* e espécies de *Bacillus* altamente relacionadas em que todas as espécies têm preferivelmente pelo menos 95 %, ainda mais preferivelmente pelo menos 98 %, homólogas ao *Bacillus agaradhaerens*, DSM 8721, com base nas sequências de rDNA 16S alinhadas.

26 famílias utilizáveis de mananases são por exemplo aquelas derivadas da espécie de *Bacillus* altamente relacionadas em que todas as espécies acima de 93 % de homologia em relação ao *Bacillus sp.* AAI12 são

reivindicadas. Estas incluem: *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus acalophilus*, *Bacillus pseudoalcalophilus* e *Bacillus clausii*. Ver a Figura 3 Árvore filogenética gerada do programa ARP que relaciona as espécies mais próximas ao *Bacillus sp.* AAI12. O RNA 16S é mostrado na SEQ ID NO: 34.

5

TABELA IV

Índice de homologia do RNA ribossômico 16s para espécies selecionadas de *Bacillus*

	BaiSpor2	BaiAlcal	BaiSpec3	BaiSpec5	<i>B. sp.</i> AAI1
BaiSpor2		92.75%	92.98%	92.41%	92.24%
BaiAlcal			98.11%	94.69%	97.28%
BaiSpec3				94.49%	96.10%
BaiSpec5					93.83%
BaiSpor2	= <i>B. sporothermodurans</i> , u49079				
BaiAlcal	= <i>B. B. alcalophilus</i> , x76436				
BaiSpec3	= <i>B. pseudoalcalophilus</i> , x76449				
BaiSpec5	= <i>B. clausii</i> , x76440				

Outras 26 famílias utilizáveis de mananases são aquelas derivadas de uma cepa selecionada do grupo que consiste da espécie de *Bacillus licheniformis* e de espécies de *Bacillus* altamente relacionadas em que todas as espécies são preferivelmente de pelo menos 95 %, ainda mais preferivelmente de pelo menos 98 %, homólogas em relação ao *Bacillus licheniformis* com base nas sequências de rDNA 16S alinhadas.

As proteínas e polipeptídeos substancialmente homólogos são caracterizados como tendo uma ou mais substituições, supressões ou adições de aminoácido. Estas mudanças são preferivelmente de uma natureza menor, isto é substituições de aminoácido conservativas (ver Tabela 2) e outras substituições que não afetem significativamente a duplicação ou a atividade da proteína ou do polipeptídeo; pequenas supressões, tipicamente de um a cerca de 30 aminoácidos e pequenas extensões do terminal amino ou

carboxila, tal como um resíduo de metionina no terminal amino, um pequeno peptídeo ligador de até cerca de 20 a 25 resíduos ou uma pequena extensão que facilite a purificação (uma afinidade *tag*), tal como um trato de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson *et al.*, Methods Enzymol. 198: 3, 1991. Ver, no geral, Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95 a 107, 1991, que é incorporada aqui por referência. Os DNAs que codificam os *tags* de afinidade estão disponíveis dos fornecedores comerciais (por exemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

Entretanto, ainda que as mudanças descritas acima sejam preferivelmente de uma natureza menor, tais mudanças também podem ser de uma natureza maior tais como a fusão de polipeptídeos maiores de até 300 aminoácidos ou mais tanto como extensões do terminal amino quanto do terminal carbóxi para um polipeptídeo de mananase da invenção.

TABELA 1

Substituições conservativas de aminoácido

Básicas: arginina

lisina

histidina

Ácidas: ácido glutâmico

ácido aspártico

Polares: glutamina

asparagina

Hidrofóbicas: leucina

isoleucina

valina

Aromáticas: fenilalanina

triptofano

tirosina

Pequenas: glicina
 alanina
 serina
 treonina
 5 metionina

Além dos 20 aminoácidos padrão, aminoácidos não padrão (tais como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina e α-metil serina) podem ser substituídos no lugar dos resíduos de aminoácido de um polipeptídeo de acordo com a invenção. Um número
 10 limitado de aminoácidos não conservativos, aminoácidos que não são codificados pelo código genético e aminoácidos não naturais podem ser substituídos no lugar dos resíduos de aminoácido. “Aminoácidos não naturais” foram modificados depois da síntese de proteína e/ou têm uma estrutura química em sua(s) cadeia(s) lateral(is) diferente daquela dos
 15 aminoácidos padrão. Os aminoácidos não naturais podem ser quimicamente sintetizados ou preferivelmente estão comercialmente disponíveis e incluem ácido pipecólico, ácido tiazolidino carboxílico, desidroprolina, 3- e 4-metilprolina e 3,3-dimetilprolina.

Os aminoácidos essenciais nos polipeptídeos de mananase da
 20 presente invenção podem ser identificados de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, tais como mutagênese direcionada por sítio ou mutagênese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, Science 244: 1081 a 1085, 1989). Na última técnica mutações únicas de alanina são introduzidas em cada resíduo na molécula e as moléculas mutantes
 25 resultantes são testadas quanto a atividade biológica (isto é, a atividade de mananase) para identificar resíduos de aminoácido que sejam críticos para a atividade da molécula. Ver também, Hilton *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 4699 a 4708, 1996. O sítio ativo da enzima ou outras interações biológicas também podem ser determinadas pela análise física da estrutura, como determinado

por técnicas tais como ressonância magnética nuclear, cristalografia, difração de elétron ou rotulação por fotoafinidade, em conjunção com mutações de aminoácidos de sítio de contato putativo. Ver, por exemplo, de Vos *et al.*, Science 255: 306 a 312, 1992; Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224: 899 a 904, 5 1992; Wlodaver *et al.*, FEBS Lett. 309: 59 a 64, 1992.

As identidades de aminoácidos essenciais também podem ser deduzidas a partir da análise de homologias com polipeptídeos que são relacionados a um polipeptídeo de acordo com a invenção.

As substituições múltiplas de aminoácidos podem ser feitas e 10 testadas usando-se métodos conhecidos de mutagênese, recombinação e/ou embaralhamento seguido por um procedimento de avaliação relevante, tal como aquele divulgado por Reidhaar-Olson e Sauer (Science 241: 53 a 57, 1988), Bowie e Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152 a 2156, 1989), WO 95/17413 ou WO 95/22625. Em resumo, estes autores divulgam 15 métodos para randomizar simultaneamente duas ou mais posições em um polipeptídeo ou recombinação/embaralhamento de mutações diferentes (Wo 95/17413, WO 95/22625, seguido pela seleção quanto ao polipeptídeo funcional e depois sequenciar os polipeptídeos mutagenizados para determinar o espectro de substituições permissíveis em cada posição. Outros 20 métodos que podem ser usados incluem demonstração de fago (por exemplo, Lowman *et al.*, Biochem. 30: 10832 a 10837, 1991; Ladner *et al.*, Patente U.S. Nº 5.223.409; Huse, Publicação WIPO WO 92/06204) e mutagênese direcionada à região (Derbyshire *et al.*, Gene 46: 145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7: 127, 1988).

25 Os métodos de mutagênese/embaralhamento como divulgados acima podem ser combinados com métodos de avaliação automatizada de auto rendimento para detectar a atividade de polipeptídeos clonados, mutagenizados em células hospedeiras. As moléculas de DNA mutagenizadas que codificam polipeptídeos ativos podem ser recuperadas das células

hospedeiras e rapidamente sequenciadas usando-se equipamento moderno. Estes métodos permitem a rápida determinação da importância de resíduos de aminoácido individuais em um polipeptídeo de interesse e podem ser aplicados a polipeptídeos de estrutura desconhecida.

5 Usando-se os métodos debatidos acima, uma pessoa de habilidade comum na técnica pode identificar e/ou preparar uma variedade de polipeptídeos que sejam substancialmente homólogos aos resíduos de 33 a 340 ou de 33 a 490 da SEQ ID NO: 2; ou a resíduos de 32 a 344 ou de 32 a 494 da SEQ ID NO: 6; ou a resíduos de 32 a 362 ou de 32 a 586 da SEQ ID
10 NO: 10; ou a resíduos de 33 a 331 da SEQ ID NO: 12; ou a resíduos de 166 a 488 ou de 22 a 488 da SEQ ID NO: 14; ou a resíduos de 68 a 369 ou de 32 a 369 da SEQ ID NO: 16; ou a resíduos de 1 a 305 da SEQ ID NO: 18; ou a resíduos de 1 a 132 da SEQ ID NO: 20; ou a resíduos de 29 a 320 da SEQ ID NO: 22; ou a resíduos de 29 a 188 da SEQ ID NO: 24; ou a resíduos de 301 a
15 625 ou de 30 a 625 da SEQ ID NO: 26; ou a resíduos de 166 a 496 ou de 38 a 496 da SEQ ID NO: 28; ou a resíduos de 26 a 361 da SEQ ID NO: 30; ou a resíduos de 593 a 903 ou de 23 a 903 da SEQ ID NO: 32 e reter a atividade de mananase da proteína do tipo selvagem.

A enzima de mananase da invenção pode, além do núcleo da
20 enzima compreender o domínio catalítico, d mesma maneira compreende um domínio de ligação de celulose (CBD), o domínio de ligação de celulose e o núcleo de enzima (o domínio cataliticamente ativo) da enzima que é operavelmente ligada. O domínio de ligação de celulose (CBD) pode existir como uma parte inteira da enzima codificada ou um CBD de uma outra
25 origem pode ser introduzido na enzima que degrada a manana criando deste modo uma enzima híbrida. Neste contexto, o termo “domínio de ligação de celulose” é intencionado a ser entendido como definido por Peter Tomme *et al.*, “Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties” em “Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates”, John N. Saddler e

Michael H. Penner (Eds.), ACS Symposium Series Nº 618, 1996. Esta definição classifica mais do que 120 domínios de ligação de celulose em 10 famílias (I-X) e demonstra que os CBDs são encontrados em várias enzimas tais como celulasas, xilanases, mananases, arabinofuranosidases, acetilesterases e quitinases. Os CBDs também foram encontrados em algas, por exemplo, a alga vermelha *Porphiria purpurea* como uma proteína de ligação a polissacarídeo não hidrolítica, ver Tomme *et al.*, *op. cit.* Entretanto, a maioria dos CBDs são de celulasas e xilanases, os CBDs são encontrados nos terminos N e C das proteínas ou são internos. Os híbridos de enzima são conhecidos na técnica, ver por exemplo, WO 90/00609 e WO 95/16782 e podem ser preparados transformando-se em uma célula hospedeira uma construção de DNA que compreenda pelo menos um fragmento de DNA que codifica o domínio de ligação de DNA ligado com ou sem um ligador a uma sequência de DNA que codifica a enzima que degrada a manana e cultivando-se a célula hospedeira para expressar o gene fundido. Os híbridos de enzima podem ser descritos pela seguinte fórmula:

CBD-MR-X

em que o CBD é a região de terminal N ou e terminal C de uma sequência de aminoácido que corresponde pelo menos ao domínio de ligação da celulose; MR é a região central (o ligador) e pode ser uma ligação, ou um grupo de ligação curto preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 100 átomos de carbono, mais preferivelmente de 2 a 40 átomos de carbono; ou é preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 100 aminoácidos, mais preferivelmente de 2 a 40 aminoácidos e X é uma região de terminal N ou de terminal C da mananase da invenção. A SEQ ID NO: 4 divulga a sequência de aminoácido de um híbrido de enzima de um núcleo de enzima de mananase e um CBD.

Preferivelmente, a enzima de mananase da presente invenção tem a sua atividade catalítica máxima em um pH de pelo menos 7, mais

preferivelmente de pelo menos 8, mais preferivelmente de pelo menos 8,5 mais preferivelmente de pelo menos 9, mais preferivelmente de pelo menos 9,5, mais preferivelmente de pelo menos 10, ainda mais preferivelmente de pelo menos 10,5, especialmente de pelo menos 11 e preferivelmente a
 5 atividade máxima da enzima é obtida em uma temperatura de pelo menos 40° C, mais preferivelmente de pelo menos 50° C, ainda mais preferivelmente de pelo menos 55° C.

Preferivelmente, a composição de limpeza da presente invenção fornece, por exemplo, quando usada para tratar tecidos durante um
 10 ciclo de lavagem de uma processo de lavagem a máquina, uma solução de lavagem tendo um pH tipicamente entre cerca de 8 e cerca de 10,5. Tipicamente, tal solução de lavagem é usada em temperaturas entre cerca de 20° C e cerca de 95° C, preferivelmente entre cerca de 20° C e cerca de 60° C, preferivelmente entre cerca de 20° C e cerca de 50° C.

15 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA

As proteínas e polipeptídeos da presente invenção, incluindo as proteínas de comprimento completo, seus fragmentos e proteínas de fusão podem ser produzidos em células hospedeiras geneticamente engendradas de acordo com técnicas convencionais. As células hospedeiras adequadas são
 20 aqueles tipos de célula que podem ser transformados ou transfectados com DNA exógeno e desenvolvimento em cultura e incluem bactéria, células fúngicas e células eucarióticas superiores cultivadas. As células bacterianas, particularmente as células cultivadas de organismos gram-positivos são preferidas. As células gram-positivas do gênero *Bacillus* são especialmente
 25 preferidas, tais como do grupo que consiste de *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus sp.*, em particular *Bacillus sp.*

I633, *Bacillus* sp. AAI12, *Bacillus clausii*, *Bacillus agaradhaerens* e *Bacillus licheniformis*.

Em uma outra modalidade preferida, a célula hospedeira é uma célula fúngica. “Fungos” como aqui usado inclui o *phyla Ascomycota*,
 5 *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota* (como definido por Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth and Bisby’s Dictionary of The Fungi, 8ª edição, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) bem como o *Oomycota* (como citado em Hawksworth *et al.*, 1985, acima). Os grupos representativos do *Ascomycota* inclui, por exemplo, *Neurospora*,
 10 *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) e as leveduras verdadeiras listadas acima. Os exemplos de *Basidiomycota* incluem cogumelos, mofos e ferrugem. Os grupos representativos de *Chytridiomycota* incluem, por exemplo, *hallomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* e fungos aquáticos. Os grupos
 15 representativos de *Oomycota* incluem, por exemplo, fungos aquáticos *Saprolegniomycetous* (bolors da água) tais como *Achlya*. Os exemplos de fungos mitospóricos incluem *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* e *Alternaria*. Os grupos representativos de *Zygomycota* incluem, por exemplo, *Rhizopus* e *Mucor*.

20 Já em outras modalidades preferidas, a célula hospedeira fúngica é uma célula fúngica filamentosa. Os “fungos filamentosos” incluem todas as formas filamentosas da subdivisão *Eumycota* e *Oomycota* (como definido por Hawksworth *et al.*, 1995, acima). Em uma modalidade mais preferida, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de uma
 25 espécie dos, porém não limitados a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* e *Trichoderma* ou um teleomorfo ou sinônimo destes.

Em particular, a célula pode pertencer a uma espécie de *Trichoderma*, preferivelmente *Trichoderma harzianum* ou *Trichoderma*

reesei ou uma espécie de *Aspergillus*, mais preferivelmente *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger* ou uma espécie de *Fusarium*, mais preferivelmente um *Fusarium sp.* que tenha a identificação característica do *Fusarium* ATCC 20334, como ainda descrito na PCT/US/95/07743.

- 5 As células fúngicas podem ser transformadas por um processo que envolva a formação de protoplasto, a transformação dos protoplastos e a regeneração da parede celular de uma maneira conhecida *per se*. Os procedimentos adequados para a transformação de células hospedeiras de *Aspergillus* são descritos na EP 238 023 e em Yelton *et al.*, 1984, 10 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470 a 1474. Um método adequado de transformar espécies de *Fusarium* está descrito por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147 a 156 ou na co-pendente US Série Nº 08/269.449. A levedura pode ser transformada usando-se os procedimentos descritos por Becker e Guarente, em Abelson, J. N. e Simon, M. I., editores, 15 Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp. 182 a 187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983 Journal of Bacteriology 153: 163 e Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920. As células mamíferas podem ser transformadas por absorção direta usando-se o método de precipitação 20 com fosfato de cálcio de Graham e Van der Eb (1978, Virology 52: 546).

- As técnicas para manipular moléculas de DNA clonadas e introduzir DNA exógeno em uma variedade de células hospedeiras são divulgadas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 25 1989; Ausubel *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc, NY, 1987; e "Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria", Sonensheim *et al.*, 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C., que são aqui incorporadas por referência.

 No geral, uma sequência de DNA que codifica uma mananase

da presente invenção está operativamente ligada a outros elementos genéticos requeridos para a sua expressão, no geral incluindo um promotor e um terminador de transcrição dentro de um vetor de expressão. O vetor habitualmente conterá também um ou mais marcadores selecionáveis e uma
5 ou mais origens de replicação, embora aqueles habilitados na técnica reconhecerão que dentro de certos sistemas os marcadores selecionáveis possam ser fornecidos em vetores separados e a replicação do DNA exógeno pode ser fornecida pela integração no genoma da célula hospedeira. A seleção de promotores, terminadores, marcadores selecionáveis, vetores e de
10 outros elementos é um assunto de planejamento de rotina dentro do nível de habilidade comum na técnica. Muitos de tais elementos são descritos na literatura e estão disponíveis por intermédio de fornecedores comerciais.

Para direcionar um polipeptídeo pelo caminho secretor de uma célula hospedeira, uma sequência de sinal secretor (também conhecida como
15 uma sequência líder, sequência prepro ou sequência pre) é fornecida no vetor de expressão. A sequência de sinal secretor pode ser aquela do polipeptídeo ou pode ser derivada de uma outra proteína secretada ou sintetizada *de novo*. Numerosa sequências de sinal secretor adequadas são conhecidas na técnica e referência é feita a “Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria”,
20 Sonensheim *et al.*, 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C., e Cutting, S. M. (eds.) “Molecular Biological Methods for Bacillus”, John Wiley and Sons, 1990, para descrição adicional das sequências de sinal secretor adequadas, especialmente para a secreção em uma célula hospedeira de Bacillus. A sequência de sinal secretor é unida à sequência de DNA na
25 matriz de leitura correta. As sequências de sinal secretor são habitualmente posicionadas em 5’ em relação à sequência de DNA que codifica o polipeptídeo de interesse, embora certas sequências de sinal possam ser posicionadas em qualquer lugar na sequência de DNA de interesse (ver, por exemplo, Welch *et al.*, Patente U.S. Nº 5.037.743; Holland *et al.*, Patente

U.S. Nº 5.143.830).

O vetor de expressão da invenção pode ser qualquer vetor de expressão que seja convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinante e a escolha do vetor dependerá frequentemente da célula hospedeira na qual o vetor deverá ser introduzido. Desta maneira, o vetor
5 pode ser um vetor que replique de modo autônomo, isto é, um vetor que exista como uma entidade extracromossômica, cuja replicação seja independente da replicação do cromossoma, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido em uma
10 célula hospedeira, é integrado no genoma da célula hospedeira e replicado junto com o(s) cromossoma(s) no(s) qual(is) foi integrado.

Os exemplos de promotores adequados para o uso em células hospedeiras de fungo filamentoso são, por exemplo, o promotor ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4 (1985), 2093 a 2099) ou o promotor *tpiA*.
15 Os exemplos de outros promotores utilizáveis são aqueles derivados do gene que codifica a *Aspergillus oryzae* TAKA amilase, a *Rhizomucor miehei* aspártico proteinase, a *Aspergillus niger* α -amilase neutra, a *Aspergillus niger* α -amilase estável em ácido, a *Aspergillus niger* ou a *Aspergillus awamori* glicoamilase (*gluA*), a *Rhizomucor miehei* lipase, a *Aspergillus oryzae* alcalino protease, a *Aspergillus oryzae* triose fosfato isomerase ou a
20 *Aspergillus nidulans* acetamidase.

As células hospedeiras transformadas ou transfectadas são cultivadas de acordo com procedimentos convencionais em um meio de cultura contendo nutrientes e outros componentes requeridos para o
25 desenvolvimento das células hospedeiras escolhidas. Uma variedade de meios adequados, incluindo meio definido e meio complexo são conhecidos na técnica e no geral incluem uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. O meio também pode conter componentes tais como fatores de desenvolvimento ou soro, como requerido.

O meio de desenvolvimento, no geral, selecionará as células que contenham o DNA exogenamente adicionado, por exemplo por seleção medicamentosa ou pela deficiência em um nutriente essencial que seja complementado pelo marcador selecionável carregado no vetor de expressão ou co-transfectado na
5 célula hospedeira.

ISOLAÇÃO DA PROTEÍNA

Quando o polipeptídeo recombinante expressado é secretado, o polipeptídeo pode ser purificado a partir do meio de desenvolvimento. Preferivelmente as células hospedeiras de expressão são removidas do meio
10 antes da purificação do polipeptídeo (por exemplo, por centrifugação).

Quando o polipeptídeo recombinante expressado não é secretado da célula hospedeira, as células hospedeiras são preferivelmente rompidas e o polipeptídeo liberado em um “extrato” aquoso que é o primeiro estágio de tais técnicas de purificação. Preferivelmente as células hospedeiras
15 de expressão são coletadas do meio antes do rompimento celular (por exemplo, por centrifugação).

O rompimento celular pode ser realizado por técnicas convencionais tais como pela digestão de lisozima ou forçando-se as células através de alta pressão. Ver (Robert K. Scobes, Protein Purification, Segunda
20 edição, Springer-Verlag) para descrição adicional de tais técnicas de rompimento celular.

Quer sejam secretados ou não, os polipeptídeos recombinantes expressados (ou polipeptídeos quiméricos) podem ser purificados usando-se métodos e meios de fracionamento e/ou purificação convencionais.

25 A precipitação com sulfato de amônio e ácido ou a extração caotrópica pode ser usada para o fracionamento de amostras. As etapas exemplares de purificação podem incluir hidroxapatita, exclusão por tamanho, FPLC e cromatografia líquida de alto desempenho, de fase reversa. Meios de troca de ânion adequado inclui dextranas derivatizadas, agarose,

celulose, poliacrilamida, sílicas especiais e outros. Os derivados de PEI, DEAE, QAE e Q são preferidos com a Sefarose de DEAE de fluxo rápido (Pharmacia, Piscataway, NJ) sendo particularmente preferido. Os meios cromatográficos exemplares incluem aqueles meios derivatizados com grupos fenila, butila ou octila tais como o Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) e outros ou resinas poliacrílicas, tais como a Amberchrom CG 71 (Toso Haas) e outras. Os suportes sólidos adequados incluem pérolas de vidro, resinas com base em sílica, resinas celulósicas, pérolas de agarose, pérolas de agarose reticuladas, pérolas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticuladas e outros que sejam insolúveis sob as condições na qual deverão ser usados. Estes suportes podem ser modificados com grupos reativos que permitam a ligação de proteínas por grupos amino, grupos carboxila, grupos sulfidril, grupos hidroxila e/ou porções de carboidrato. Os exemplos das químicas de ligação incluem a ativação do brometo de cianogênio, a ativação da N-hidroxisuccinimida, a ativação do epóxido, a ativação da sulfidril, a ativação da hidrazida e de derivados de carboxila e de amino para as químicas de ligação da carbodiimida. Estes e outros meios sólidos são bem conhecidos e amplamente usados na técnica e são disponíveis de fornecedores comerciais.

A seleção de um método particular é um assunto de planejamento de rotina e é determinada em parte pelas propriedades do suporte escolhido. Ver, por exemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia, 1988.

Os polipeptídeos da invenção ou seus fragmentos também podem ser preparados pela síntese química. Os polipeptídeos da invenção podem ser monômeros ou multímeros; glicosilados ou não glicosilados, cavilhados ou não cavilhados e podem ou não incluir um resíduo inicial do aminoácido metionina.

Com base na informação de sequência aqui divulgada uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 1, pelo menos a sequência de DNA da posição 94 até a posição 990 ou, 5 alternativamente, a sequência de DNA da posição 94 até a posição 1470, pode ser clonada. Da mesma maneira pode ser clonada uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 5, pelo menos a sequência de DNA da posição 94 até a posição 1032 ou, 10 alternativamente, a sequência de DNA da posição 94 até a posição 1482; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 9, pelo menos a sequência de DNA da posição 94 até a posição 1086 ou, alternativamente, a sequência de DNA da posição 94 até a posição 15 1761; ; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 11, pelo menos a sequência de DNA da posição 97 até a posição 993; ; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na 20 SEQ ID NO: 13, pelo menos a sequência de DNA da posição 498 até a posição 1464 ou, alternativamente, a sequência de DNA da posição 64 até a posição 1464; ; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 15, pelo menos a sequência de DNA da posição 25 204 até a posição 1107 ou, alternativamente, a sequência de DNA da posição 76 até a posição 1107; e uma sequência de DNA que codifica parcialmente uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 17; e uma sequência de DNA que codifica parcialmente uma mananase da invenção e que compreende a sequência de

DNA apresentada na SEQ ID NO: 19; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 21, pelo menos a sequência de DNA da posição 88 até a posição 960; e uma sequência de DNA que codifica parcialmente uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 23; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 25, pelo menos a sequência de DNA da posição 904 até a posição 1875 ou, alternativamente, a sequência de DNA da posição 88 até a posição 2443; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 27, pelo menos a sequência de DNA da posição 498 até a posição 1488 ou, alternativamente, a sequência de DNA da posição 112 até a posição 1488; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 29, pelo menos a sequência de DNA da posição 79 até a posição 1083; e uma sequência de DNA de comprimento completo que codifica uma mananase da invenção e que compreende a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 31, pelo menos a sequência de DNA da posição 1779 até a posição 2709 ou, alternativamente, a sequência de DNA da posição 67 até a posição 2709.

A clonagem é realizada por procedimentos padrão conhecidos na técnica tais como pela:

■ preparação de uma biblioteca genômica de uma cepa de *Bacillus*, especialmente uma cepa selecionada do *B. sp.* I633, *B. sp.* AAI12, *B. sp.* AA349, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus clausii* e *Bacillus licheniformis* ou de uma cepa fúngica, especialmente a cepa *Humicola insolens*;

■ semeadura em placa tal biblioteca em placas de substrato adequado;

■ identificação de um clone que compreenda uma sequência de polipeptídeo da invenção pelas técnicas de hibridização padrão usando-se uma sonda com base em qualquer uma das sequências das SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 ou 31; ou pela

■ identificação de um clone da dita biblioteca genômica por uma estratégia de PCR inversa usando-se iniciadores com base na informação de sequência das SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 ou 31. Referência é feita a M. J. MCPerson *et al.*, ("PCR A practical approach" Information Press Ltd, Oxford England) para detalhes adicionais com respeito à PCR Inversa.

Com base na informação de sequência aqui divulgada (SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32) é trabalho de rotina para uma pessoa habilitada na técnica isolar sequências homólogas de polipeptídeo que codifica a mananase homóloga da invenção por uma estratégia similar usando bibliotecas genômicas de organismos microbianos relacionados, em particular de bibliotecas genômicas de outras cepas do gênero *Bacillus*, tais como as espécies alcalofílicas do *Bacillus sp.* ou de cepas fúngicas tais como as espécies do *Humicola*.

Alternativamente, o DNA que codifica a manana ou a enzima que degrada a galactomanana da invenção podem ser, de acordo com procedimentos bem conhecidos, convenientemente clonados a partir de uma fonte adequada, tal como qualquer um dos organismos mencionados acima, pelo uso de sondas sintéticas de oligonucleotídeos preparadas com base na sequência obtível do plasmídeo presente em qualquer uma das cepas do *Escherichia coli* DSM 12197, DSM 12180, DSM 12433, DSM 12441, DSM 9984, DSM 12432, DSM 12436, DSM 12846, DSM 12847, DSM 12848,

DSM 12849, DSM 12850, DSM 12851 e DSM 12852.

Consequentemente, a molécula de polinucleotídeo da invenção pode ser isolada a partir de qualquer um dos *Escherichia coli* DSM 12197, DSM 12180, DSM 12433, DSM 12441, DSM 9984, DSM 12432, 5 DSM 12436, DSM 12846, DSM 12847, DSM 12848, DSM 12849, DSM 12850, DSM 12851 e DSM 12852, em que o plasmídeo obtido pela clonagem tal como descrita acima é depositado. Da mesma maneira a presente invenção diz respeito a uma cultura biológica isolada, substancialmente pura de qualquer uma das cepas do *Escherichia coli* DSM 12197, DSM 12180, DSM 10 12433, DSM 12441, DSM 9984, DSM 12432, DSM 12436, DSM 12846, DSM 12847, DSM 12848, DSM 12849, DSM 12850, DSM 12851 e DSM 12852.

No presente contexto, o termo “preparação de enzima” é intencionado significar um produto de fermentação enzimática convencional, 15 possivelmente isolado e purificado a partir de uma espécie única de um microorganismo, tal preparação habitualmente compreendendo várias atividades enzimáticas diferentes; ou uma mistura de enzimas de monocomponente, preferivelmente enzimas derivadas de espécies bacterianas ou fúngicas pelo uso de técnicas recombinantes convencionais, cujas enzimas 20 foram fermentadas e possivelmente isoladas e purificadas separadamente e que podem originar de espécies diferentes, preferivelmente espécies fúngicas ou bacterianas; ou o produto da fermentação de um microorganismo que atue como uma célula hospedeira para a expressão de uma mananase recombinante, todavia cujo microorganismo produza simultaneamente outras 25 enzimas, por exemplo, enzimas que degradem a pectina, proteases ou celulasas, que sejam produtos de fermentação, que ocorra naturalmente, dos microorganismos, isto é, o complexo de enzima convencionalmente produzido pelo microorganismo correspondente, que ocorra naturalmente.

A preparação da mananase da invenção pode ainda

compreender uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de proteases, celulasas (endo- β -1,4-glicanases), β -glicanases (endo- β -1,3(4) glicanases), lipases, cutinases, peroxidases, lacases, amilases, glicoamilases, pectinases, reductases, oxidases, fenoloxidasas, ligninases, pululanases, hemicelulasas, pectato liases, xiloglicanases, xilanases, pectin acetil esterases, ramnogalacturonan acetil esterases, poligalacturonases, ramnogalacturonases, pectina liases, pectina metilesterases, celobioidrolases, transglutaminases ou misturas destas. Em uma modalidade preferida, uma ou mais ou todas as enzimas na preparação são produzidas usando-se técnicas recombinantes, isto é, a(s) enzima(s) é/são enzima(s) de mono-componente que é/são misturada(s) com outra(s) enzima(s) para formar uma preparação de enzima com a combinação de enzima desejada.

Em um outro aspecto, a presente invenção também diz respeito a um método de produzir a preparação de enzima da invenção, o método compreendendo cultivar um microorganismo, por exemplo, uma cepa do tipo selvagem, capaz de produzir a mananase sob condições que permitam a produção da enzima e recuperar a enzima da cultura. A cultura pode ser realizada usando-se técnicas convencionais de fermentação, por exemplo, cultivar em frascos de agitação ou em fermentadores com agitação para garantir a aeração suficiente em um meio de cultura que induza a produção da enzima de mananase. O meio de cultura pode conter uma fonte convencional de Ntal como peptona, extrato de levedura ou ácidos de casamino, uma quantidade reduzida de uma fonte convencional de C tal como dextrose ou sacarose e um indutor tal como goma guar ou goma de alfarroba. A recuperação pode ser realizada usando-se técnicas convencionais, por exemplo, pela separação da bio-massa e do sobrenadante por centrifugação ou filtração, pela recuperação do sobrenadante ou rompimento das células se a enzima de interesse for intracelular, talvez seguido por outra purificação como descrito na EP 0 406 314 ou por cristalização como descrito na WO

97/15660.

Os exemplos de bactéria utilizável que produza a enzima ou a preparação de enzima da invenção são bactérias Gram positivas, preferivelmente da subdivisão *Bacillus/Lactobacillus*, preferivelmente uma
 5 cepa do gênero *Bacillus*, mais preferivelmente uma cepa do *Bacillus sp.*

Já em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma mananase isolada tendo as propriedades descritas acima e que seja livre de impurezas homólogas e seja produzida usando-se técnicas recombinantes convencionais.

10 REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA

Anticorpos policlonais para serem usados na determinação da reatividade imunológica cruzada podem ser preparados pelo uso de uma enzima de mananase purificada. Mais especificamente, o antisoro contra a mananase da invenção pode ser incitado imunizando-se coelhos (ou outros
 15 roedores) de acordo com o procedimento descrito por N. Axelsen *et al.*, no: A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Capítulo 23 ou A. Johnstone e R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (mais especificamente nas páginas de 27 a 31). As imunoglobulinas purificadas
 20 podem ser obtidas a partir do antisoro, por exemplo pela precipitação salina ((NH₄)₂ SO₄), seguido pela diálise e pela cromatografia de troca iônica, por exemplo, em DEAE-Sephadex. A caracterização imunoquímica de proteínas pode ser feita pela análise Ouchterlony de difusão dupla (O. Ouchterlony no: Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir, Ed.) Blackwell
 25 Scientific Publications, 1967, páginas 655 a 706), pela imuno-elektroforese cruzada (N. Axelsen *et al.*, acima, Capítulos 3 e 4) ou pela imuno-elektroforese foguete (N. Axelsen *et al.*, Capítulo 2).

USO NA INDÚSTRIA DE DETERGENTE

Em outros aspectos, a presente invenção diz respeito a uma

composição detergente que compreende a mananase ou a preparação de mananase da invenção para um processo para o tratamento a máquina de tecidos, que compreende tratar o tecido durante um ciclo de lavagem de um processo de lavagem a máquina com uma solução de lavagem que contenha a mananase ou a preparação de mananase da invenção e a composições de
5 limpeza que incluem composições de lavar roupa, de lavar louça, de limpador de superfície dura, de limpeza pessoal e oral/dentária, que compreendem uma mananase e opcionalmente uma outra enzima selecionada dentre celulasas, amilases, enzimas que degradam a pectina e xiloglicanases e que forneçam
10 desempenho de limpeza superior, isto é remoção superior de manchas, limpezas de encardidos e manutenção da brancura.

Sem estar ligado a esta teoria, acredita-se que a mananase da presente invenção seja capaz de degradar ou hidrolisar eficazmente qualquer sujeiras ou manchas que contenham galactomananas e, conseqüentemente, de
15 limpar roupas que contenham tais sujeiras ou manchas.

As composições de limpeza da invenção devem conter pelo menos um componente detergente adicional. A natureza exata destes componentes adicionais e os níveis de sua incorporação dependerão da forma física da composição e da natureza d operação de limpeza para a qual devem
20 ser usados.

As composições de limpeza da presente invenção preferivelmente compreenderão ainda um ingrediente detergente selecionado de um tensoativo selecionado, uma outra enzima, um construtor e/ou um sistema de branqueamento.

25 As composições de limpeza de acordo com a invenção podem ser líquidas, em pasta, em géis, barras, tabletes, pulverização, espuma, pó ou granular. As composições granulares também podem estar na forma “compacta” e as composições líquidas também podem estar em uma forma “concentrada”.

As composições da invenção podem ser formuladas, por exemplo, como composições de lavar louças a mão e a máquina, composições detergentes de lavar roupa a mão ou a máquina que incluem composições de aditivos de lavar roupa de composições adequadas para o uso nas operações de molho e/ou pré tratamento de tecidos tingidos, composições amaciantes de tecido adicionadas no enxágue e composições para o uso nas operações de limpeza de superfície dura nos cuidados domésticos gerais. As composições que contenham tais carboidrases também podem ser formuladas como produtos de sanitização, limpadores de lentes de contato e produtos de cuidados de saúde e de beleza tais como cuidado oral/dentário e composições de limpeza pessoal.

Quando formulados como composições para o uso em métodos de lavagens manuais de louça, as composições da invenção preferivelmente contém um tensoativo e preferivelmente outros compostos detergentes selecionados de compostos poliméricos orgânicos, agentes acentuadores de espuma, íons metálicos do grupo II, solventes, hidrótropos e enzimas adicionais.

Quando formulados como composições adequadas para o uso em um método de lavagem em máquina de lavar roupas, as composições da invenção preferivelmente contém tanto um composto tensoativo quanto um construtor e adicionalmente um ou mais componentes detergentes, preferivelmente selecionados de compostos poliméricos orgânicos, agentes de branqueamento, enzimas adicionais, supressores de espuma, dispersantes, dispersantes de cal-sabão, agentes de suspensão de sujeira e anti-redeposição e inibidores de corrosão. As composições de lavar roupa também pode conter agentes amaciantes como componentes detergentes adicionais. Tais composições que contenham carboidrase podem fornecer limpeza de tecido, remoção de manchas, manutenção da brancura, amaciamento, destaque de cor, inibição da transferência de corante e sanitização quando formulados

como composições detergentes de lavar roupas.

As composições da invenção também podem ser usadas como produtos aditivos de detergente na forma sólida ou líquida. Tais produtos aditivos são intencionados a suplementar ou reforçar o desempenho de composições detergentes convencionais e podem ser adicionados em qualquer estágio do processo de limpeza.

Se for necessário a densidade das composições detergentes de lavar roupas variam aqui de 400 a 1200 g/litro, preferivelmente de 500 a 950 g/litro da composição medidos a 20° C.

A forma “compacta” das composições neste é melhor refletida pela densidade e, em termos de composição, pela quantidade de sal enchedor inorgânico; os sais enchedores inorgânicos são ingredientes convencionais das composições detergentes na forma de pó; em composições detergentes convencionais, os sais enchedores estão presentes em quantidades substanciais, tipicamente de 17 a 35 % em peso da composição total. Nas composições compactas, o sal enchedor está presente em quantidades que não excedam a 15 % da composição total, preferivelmente não excedendo a 10 %, mais preferivelmente não excedendo a 5 % em peso da composição. Os sais enchedores inorgânicos tais como os referidos nas presentes composições são selecionados dos sais de metal alcalino e de metal alcalino terroso de sulfatos e cloretos. UM sal enchedor preferido é o sulfato de sódio.

As composições detergentes líquidas de acordo com a presente invenção também podem estar em uma “forma concentrada”, em tais casos, as composições detergentes líquidas de acordo com a presente invenção conterão uma quantidade menor de água, comparado aos detergentes líquidos convencionais. Tipicamente, o teor de água do detergente líquido concentrado é preferivelmente menor do que 40 %, mais preferivelmente menor do que 30 %, ou mais preferivelmente menor do que 20 % em peso da composição detergente.

COMPOSIÇÕES DE LIMPEZA

SISTEMA DE TENSOATIVO

As composições de limpeza ou detergentes de acordo com a presente invenção compreendem um sistema de tensoativo, em que o tensoativo pode ser selecionado de tensoativos não iônicos e/ou aniônicos e/ou catiônicos e/ou anfóliticos e/ou zwitteriônicos e/ou semi-polares.

O tensoativo está tipicamente presente em um nível de 0,1 % a 60 % em peso. O tensoativo é preferivelmente formulado para ser compatível com o híbrido de enzima e componentes de enzima presentes na composição.

Em composições líquidas ou em gel o tensoativo é formulado mais preferivelmente de um modo tal que promova, ou pelo menos não degrade, a estabilidade de qualquer híbrido de enzima ou enzima destas composições.

Sistemas adequados para o uso de acordo com a presente invenção compreende como um tensoativo um ou mais dos tensoativos não iônicos e/ou aniônicos aqui descritos.

Óxidos de polietileno, polipropileno e de polibutileno condensados de fenóis alquílicos são adequados para o uso como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo da presente invenção, com os condensados de óxido de polietileno sendo os preferidos. Estes compostos incluem os produtos de condensação dos fenóis alquílicos tendo um grupo alquila contendo de cerca de 6 a cerca de 14 átomos de carbono, preferivelmente de cerca de 8 a cerca de 14 átomos de carbono na configuração de uma cadeia reta ou ramificada com o óxido de alquilenos. Em uma modalidade preferida, o óxido de etileno está presente em uma quantidade igual a aproximadamente 2 até cerca de 25 moles mais preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 15 moles de óxido de etileno por mol de alquil fenol. Comercialmente, os tensoativos não iônicos disponíveis deste tipo incluem Igepal® CO-630, comercializado pela GAF Corporation e Triton® X-45, X-114, X-100 e X-102, todos comercializados pela Rohm &

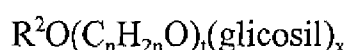
Haas Company. Estes tensoativos são habitualmente chamados de alquilfenóis alcoxilados (por exemplo, alquil fenóis etoxilados).

Os produtos de condensação de álcoois alifáticos primários e secundários com cerca de 1 a cerca de 25 moles de óxido de etileno são adequados para o uso como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo não iônico da presente invenção. A cadeia alquílica do álcool alifático pode ser reto ou ramificada, primária ou secundária e, no geral contém de cerca de 8 a cerca de 22 átomos de carbono. Preferidos são os produtos de condensação de álcoois que tenham um grupo alquila contendo de cerca de 8 a cerca de 20 átomos de carbono, mais preferivelmente de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono, com cerca de 2 a cerca de 10 moles de óxido de etileno por mol de álcool. Cerca de 2 a cerca de 7 moles de óxido de etileno e o mais preferivelmente de 2 a 5 moles de óxido de etileno por mol de álcool estão presentes nos ditos produtos de condensação. Os exemplos de tensoativos não iônicos comercialmente disponíveis deste tipo incluem Tergitol® 15-S-9 (o produto de condensação de álcool linear C_{11} - C_{15} com 9 moles de óxido de etileno), Tergitol® 24-L-6 NMW (o produto de condensação do álcool primário C_{12} - C_{14} com 6 moles de óxido de etileno com uma distribuição restrita de peso molecular), ambos comercializados pela Union Carbide Corporation; Neodol® 45-9 (o produto de condensação de álcool linear C_{14} - C_{15} com 9 moles de óxido de etileno), neodol® 23-3 (o produto de condensação de álcool linear C_{12} - C_{13} com 3,0 moles de óxido de etileno), Neodol® 45-7 (o produto de condensação de álcool linear C_{14} - C_{15} com 7 moles de óxido de etileno), Neodol® 45-5 (o produto de condensação de álcool linear C_{14} - C_{15} com 5 moles de óxido de etileno), comercializados pela Shell Chemical Company, Kyro® EOB (o produto de condensação de álcool C_{13} - C_{15} com 9 moles de óxido de etileno), comercializado pela The Procter & Gamble Company e Genapol LA 050 (o produto de condensação de álcool C_{12} - C_{14} com 5 moles de óxido de etileno), comercializado pela

Hoechst. A faixa preferida de HLB nestes produtos é de 8 a 11 e o mais preferido de 8 a 10.

Da mesma maneira utilizáveis como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo da presente invenção são os alquilpolissacarídeos divulgados na US 4.565.647, tendo um grupo hidrofóbico contendo de cerca de 6 a cerca de 30 átomos de carbono, preferivelmente de cerca de 10 a cerca de 16 átomos de carbono e um polissacarídeo, por exemplo, um poliglicosídeo, um grupo hidrofílico contendo de cerca de 1,3 a cerca de 10, preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 3, o mais preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 2,7 unidades de sacarídeo. Qualquer sacarídeo redutor contendo 5 ou 6 átomos de carbono pode ser usado, por exemplo, porções de glicose, galactose e galactosila podem ser substituídas no lugar das porções de glicosila (opcionalmente o grupo hidrofóbico está ligado nas posições 2, 3, 4, etc., dando assim uma glicose ou galactose como oposto a um glicosídeo ou galactosídeo). As ligações intersacarídicas podem ser, por exemplo, entre a posição um das unidades adicionais de sacarídeo e as posições 2, 3, 4 e/ou 6 nas unidades precedentes de sacarídeo.

Os alquilpoliglicosídeos preferidos têm a fórmula:



Em que R^2 é selecionado do grupo que consiste de alquila, alquilfenila, hidroxiálquila, hidroxiálquilfenila e misturas destes em que os grupos alquila contêm de cerca de 10 a cerca de 18, preferivelmente de cerca de 12 a cerca de 14 átomos de carbono; n é 2 ou 3, preferivelmente 2; t é de 0 a cerca de 10, preferivelmente 0; e x é de cerca de 1,3 a cerca de 10, preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 3, o mais preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 2,7. A glicosila é preferivelmente derivada da glicose. Para preparar estes compostos, o álcool ou o álcool alquilpolietóxi é primeiro formado e depois reagido com a glicose ou com uma fonte de glicose, para formar o glicosídeo (ligação na posição 1). As unidades adicionais de glicosila podem ser depois

ligadas entre a sua posição 1 e as unidades de glicosila precedentes nas posições 2, 3, 4 e/ou 6, preferível e predominantemente na posição 2

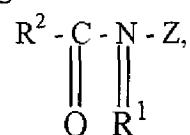
Os produtos de condensação do óxido de etileno com uma base hidrofóbica formada pela condensação do óxido de propileno com propileno glicol também são adequados para o uso como os sistemas adicionais de tensoativo não iônico da presente invenção. A porção hidrofóbica destes compostos terão preferivelmente um peso molecular de cerca de 1500 a cerca de 1800 e exibirão insolubilidade em água. A adição de porções de polioxietileno a esta porção hidrofóbica tende a aumentar a solubilidade em água das moléculas como um todo e o caráter líquido do produto é retido até o ponto onde o teor de polioxietileno é de cerca de 50 % do peso total do produto de condensação que corresponde à condensação com até cerca de 40 moles de óxido de etileno. Os exemplos de compostos deste tipo incluem alguns dos tensoativos Pluronic® comercialmente disponíveis, comercializados pela BASF.

Também adequados para o uso como o tensoativo não iônico do sistema de tensoativo não iônico da presente invenção são os produtos de condensação do óxido de etileno com o produto que resulta da reação de óxido de propileno e etilenodiamina. A porção hidrofóbica destes produtos consiste do produto de reação da etileno diamina e óxido de propileno em excesso e, no geral, tem um peso molecular de cerca de 2500 a cerca de 3000. Esta porção hidrofóbica é condensada com óxido de etileno até o ponto em que o produto de condensação contenha de cerca de 40 % a cerca de 80 % em peso de polioxietileno e tenha um peso molecular de cerca de 5.000 a cerca de 11.000. Os exemplos deste tipo de tensoativo não iônico incluem alguns dos compostos Tetronic® comercialmente disponíveis, comercializados pela BASF.

Preferidos par o uso como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo da presente invenção são os óxidos de polietileno

condensados de alquil fenóis, os produtos de condensação de álcoois alifáticos primários secundários cerca de 1 a cerca de 25 moles de óxido de etileno, alquilpolissacarídeos e misturas destes. Os mais preferidos são os etoxilados de alquilfenol C₈-C₁₄ tendo de 3 a 15 grupos etóxi e etoxilados de álcool C₈-C₁₈ (preferivelmente C₁₀ *avg.*) tendo de 2 a 10 grupos etóxi e misturas destes.

Os tensoativos não iônicos altamente preferidos são tensoativos de poliidroxi ácido graxo de amida da fórmula:



em que R¹ é H ou R¹ é hidrocarbila C₁₋₄, 2-hidroxietila, 2-hidroxipropila ou uma mistura destes, R² é hidrocarbila C₅₋₃₁ e Z é uma poliidroxiidrocarbila tendo uma cadeia de hidrocarbila linear com pelo menos 3 hidroxilas diretamente conectadas na cadeia ou um derivado alcoxilado desta. Preferivelmente, R¹ é metila, R² é cadeia reta de alquila C₁₁₋₁₅ ou alquila C₁₆₋₁₈ ou alquenila tal como alquila de coco ou misturas destes e Z é derivado de um açúcar redutor tal como glicose, frutose, maltose ou lactose em uma reação de aminação redutiva.

Os tensoativos aniônicos altamente preferidos incluem tensoativos de alquil sulfato alcoxilados. Os exemplos destes são sais ou ácidos solúveis em água da fórmula RO(A)_mSO₃M em que R é um grupo alquila ou hidroxialquila C₁₀-C₂₄ não substituídos tendo um componente alquila C₁₀-C₂₄, preferivelmente uma alquila ou hidroxialquila C₁₂-C₂₀, mais preferivelmente uma alquila ou hidroxialquila C₁₂-C₁₈, A é uma unidade etóxi ou propóxi, m é maior do que 0, tipicamente entre cerca de 0,5 e cerca de 3 e M é H ou um cátion que pode ser, por exemplo, um cátion de metal (por exemplo, sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, etc.), cátion amônio ou amônio substituído. Os alquil sulfatos etoxilados bem como os alquil sulfatos propoxilados são aqui considerados. Os exemplos específicos de cátions

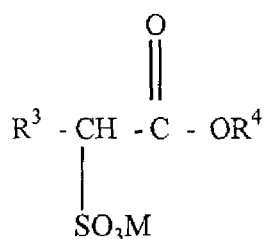
amônio substituídos incluem cátions de metil-, dimetil-, trimetil-amônio e cátions de amônio quaternário tais como cátions tetrametil-amônio e dimetil piperidínio e aqueles derivados de alquilaminas tais como etilamina, dietilamina, trietilamina, mistura destes e outros. Os tensoativos exemplares

5 são sulfato de alquila C_{12} - C_{18} polietoxilado (1,0) (C_{12} - C_{18} E(1,0)M), sulfato de alquila C_{12} - C_{18} polietoxilado (2,25) (C_{12} - C_{18} (2,25)M), sulfato de alquila C_{12} - C_{18} polietoxilado (3,0) (C_{12} - C_{18} E(3,0)M) e sulfato de alquila C_{12} - C_{18} polietoxilado (4,0) (C_{12} - C_{18} E(4,0)M), em que M é convenientemente selecionado de sódio e potássio.

10 Os tensoativos aniônicos adequados para serem usados são os tensoativos de éster de alquilsulfonato incluindo os ésteres lineares de ácidos carboxílicos C_8 - C_{20} (isto é, ácidos graxos) que são sulfonados com SO_3 gasoso, de acordo com "The Journal of the American Oil Chemists Society", 52 (1975), pp. 323 a 329. Os materiais de partida adequados podem incluir

15 substâncias graxas naturais como as derivadas de sebo, óleo de palma, etc.

O tensoativo de éster de alquil sulfonato preferido, especialmente para aplicações na lavagem de roupas, compreende os tensoativos de éster de alquil sulfonato da fórmula estrutural:



em que R^3 é uma hidrocarbila C_8 - C_{20} , preferivelmente uma alquila ou uma

20 combinação destas, R^4 é uma hidrocarbila C_1 - C_6 , preferivelmente uma alquila ou uma combinação destas e M é um cátion que forme um sal solúvel em água com o éster de alquil sulfonato. Os cátions formadores de sal adequados incluem os metais tais como sódio, potássio e lítio e cátions de amônio substituídos ou não substituídos, tais como monoetanolamina, dietanolamina

25 e trietanolamina. Preferivelmente, R^3 é alquila C_{10} - C_{16} e R^4 é metila, etila ou

isopropila. São especialmente preferidos os ésteres de metil sulfonato em que R^3 é alquila C_{10} - C_{16} .

Outros tensoativos aniônicos adequados incluem os tensoativos de alquil sulfato que sejam sais ou ácidos solúveis em água da fórmula $ROSO_3M$, em que R é uma hidrocarbila C_{10} - C_{24} , preferivelmente uma alquila ou hidroxialquila tendo um componente de alquila C_{10} - C_{20} , mais preferivelmente uma alquila ou hidroxialquila C_{12} - C_{18} e M é H ou um cátion, por exemplo, um cátion de metal alcalino (por exemplo, sódio, potássio, lítio) ou amônio ou amônio substituído (por exemplo, cátions metil-, dimetil- e trimetil amônio e cátions de amônio quaternário tais como cátions tetrametil-amônio e dimetil piperidínio e cátions de amônio quaternário derivados de alquilaminas tais como etilamina, dietilamina, trietilamina e misturas destes, e outros). Tipicamente, as cadeias alquílicas de C_{12} - C_{16} são preferidas para temperaturas de lavagem mais baixas (por exemplo, abaixo de cerca de 50° C) e as cadeias alquílicas C_{16} - C_{18} são preferidas para temperaturas de lavagem mais altas (por exemplo, acima de cerca de 50° C). Outros tensoativos aniônicos utilizáveis para propósitos detergentes também podem ser incluídos nas composições detergentes de lavar roupas da presente invenção. Estes podem incluir sais (incluindo, por exemplo, sais de sódio, potássio, amônio e amônio substituído, tais como sais de mono-, di- e trietanolamina) de sabão, alcanossulfonatos C_8 - C_{22} , primários ou secundários, olefinsulfonatos C_8 - C_{24} , ácidos policarboxílicos sulfonados preparados pela sulfonação do produto pirolizado de citratos de metal alcalino terroso, por exemplo, como descrito no pedido de patente Britânico Nº 1.082.179, alquilpoliglicoletersulfatos C_8 - C_{24} contendo até 10 moles de óxido de etileno); sulfonatos de alquil glicerol, sulfonatos graxos de acil glicerol, sulfatos graxos de oleil glicerol, sulfatos éter de alquil fenol de óxido de etileno, sulfonatos de parafina, fosfatos de alquila, isetionatos tais como os isetionatos de acila, tauratos de N-acila, succinamatos e sulfosuccinatos de

alquila, monoésteres de sulfosuccinatos (especialmente monoésteres C_{12} - C_{18} saturados e não saturados) e diésteres de sulfosuccinatos (especialmente diésteres C_6 - C_{12} saturados e não saturados), sarcosinatos de acila, sulfatos de alquilpolisacarídeos tais como os sulfatos de alquilpoliglicosídeo (os compostos não iônicos, não sulfatados são descritos abaixo), sulfatos de alquila primária, ramificada e carboxilatos de alquil polietóxi tais como aqueles da fórmula $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO-M^+$, em que R é uma alquila C_8 - C_{22} , k é um número inteiro de 1 a 10 e M é um cátion formador de sal solúvel. Os ácidos de resina e os ácidos de resina hydrogenada também são adequados, tais como colofonia de breu, colofonia de breu hydrogenada e ácidos de resina e ácidos de resina hydrogenados presentes em tall-oil ou derivados deste.

Os sulfonatos de alquilbenzeno são altamente preferidos. São especialmente preferidos os sulfonatos de alquil benzeno lineares (de cadeia reta) (LAS) em que o grupo alquila preferivelmente contém de 10 a 18 átomos de carbono.

Outros exemplos são descritos em "Surface Active Agents and Detergents" (Vol. I e II por Schwartz, Perry e Berch). Uma variedade de tais tensoativos também são no geral divulgados na US 3.929.678, (Coluna 23, linha 58 até Coluna 29, Linha 23, incorporados aqui por referência).

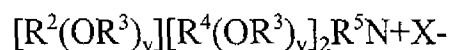
Quando incluídos nestes, as composições detergentes de lavagem de roupas da presente invenção tipicamente compreende de cerca de 1 % a cerca de 40 %, preferivelmente de cerca de 3 % a cerca de 20 % em peso de tais tensoativos aniônicos.

As composições detergentes de limpeza ou de lavagem de roupas da presente invenção também podem conter tensoativos catiônicos, anfotéricos, zwitteriônicos e semi polares, bem como os tensoativos não iônicos e/ou aniônicos outros que não aqueles já descritos aqui.

Os tensoativos detergentes catiônicos adequados para o uso nas

composições detergentes de lavar roupa da presente invenção são aqueles que tenham um grupo hidrocarbila de cadeia longa. Os exemplos de tais tensoativos catiônicos incluem os tensoativos de amônio tais como os halogenídeos de alquiltrimetilamônio e aqueles tensoativos que tenham a

5 fórmula:



em que R^2 é um grupo alquila ou alquil benzila tendo de cerca de 8 a cerca de 18 átomos de carbono na cadeia alquílica, cada R^3 é selecionado do grupo que consiste de $-CH_2CH_2-$, $CH_2CH(CH_3)-$, $-CH_2CH(CH_2OH)-$, $-CH_2CH_2CH_2-$ e misturas destes; cada R^4 é selecionado do grupo que consiste de alquila C_1-

10 C_4 , hidroxialquila C_1-C_4 , estruturas de anel de benzila formadas pela união de dois grupos R^4 , $-CH_2CHOHCHOHCOR^6CHOHCH_2OH$, em que R^6 é qualquer hexose ou polímero de hexose tendo um peso molecular menor do que cerca de 1000 e hidrogênio quando y não é 0; R^5 é o mesmo como R^4 ou é uma cadeia alquílica, em que o número total de átomos de carbono ou R^2

15 mais R^5 não é mais do que cerca de 18; cada y é de 0 a cerca de 10 e a soma dos valores y é de 0 a cerca de 15 e X é qualquer ânion compatível.

Os tensoativos catiônicos altamente preferidos são os compostos de amônio quaternário solúveis em água utilizáveis na presente composição tendo a fórmula:



20 em que R_1 é alquila C_8-C_{16} , cada um de R_2 , R_3 e R_4 é independentemente alquila C_1-C_4 , hidróxi alquila C_1-C_4 benzila e $-(C_2H_4)_xH$ onde x tem um valor de 2 a 5 e X é um ânion. Não mais do que um de R_2 , R_3 e R_4 deve ser benzila.

O comprimento preferido da cadeia alquílica para R_1 é $C_{12}-C_{15}$, particularmente onde o grupo alquila é uma mistura de comprimentos de

25 cadeia derivados de gordura de coco ou de semente de palma ou é derivado sinteticamente pela olefina formada ou pela síntese de álcoois OXO.

Os grupos preferidos para R_2 , R_3 e R_4 são grupos metila e

hidroxietila e o ânion X pode ser selecionado de íons haleto, metossulfato, acetato e fosfato.

Os exemplos de compostos adequados de amônio quaternário das fórmulas (i) para o uso nesta são:

- 5 cloreto ou brometo de trimetil amônio de coco;
 - cloreto ou brometo de metil diidroxietil amônio de coco;
 - cloreto de decil trietil amônio;
 - cloreto ou brometo de decil dimetil hidroxietil amônio;
 - cloreto ou brometo de dimetil C₁₂-C₁₅ hidroxietil amônio;
 - 10 cloreto ou brometo de dimetil hidroxietil amônio de coco;
 - metil sulfato de miristil trimetil amônio;
 - cloreto ou brometo de lauril dimetil benzil amônio;
 - cloreto ou brometo de lauril dimetil (etenóxi)₄ amônio;
 - ésteres de colina (os compostos da fórmula (i) em que R₁ é
- $$\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{C}_{12-14} \text{ alquila e } \text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4 \text{ são metila})$$

- 15 dialquil imidazolinás [compostos da fórmula (i)].

Outros tensoativos catiônicos utilizáveis nesta também estão descritos na US 4.228.044 e na EP 000 224.

- Quanto desta maneira incluídos, as composições detergentes de lavar roupas da presente invenção tipicamente compreende de 0,2 % a
- 20 cerca de 25 %, preferivelmente de cerca de 1 % a cerca de 8 % em peso de tais tensoativos catiônicos.

- Os tensoativos anfotéricos também são adequados para o uso nas composições detergentes de lavar roupas da presente invenção. Estes tensoativos podem ser amplamente descritos como derivados alifáticos de
- 25 aminas secundárias ou terciárias ou derivados alifáticos de aminas heterocíclicas secundárias e terciárias em que o radical alifático pode ser de cadeia reta ou ramificada. Um dos substituintes alifáticos contém pelo menos

cerca de 8 átomos de carbono, tipicamente de cerca de 8 a cerca de 18 átomos de carbono e pelo menos um contém um grupo aniônico que solubiliza em água, por exemplo, carbóxi, sulfonato, sulfato. Ver a US 3.929.678 (coluna 19, linhas 18 a 35) para exemplos de tensoativos anfolíticos.

5 Quando incluídos nesta, as composições detergentes de lavar roupas da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2 % a cerca de 15 %, preferivelmente de cerca de 1 % a cerca de 10 % em peso de tais tensoativos anfolíticos.

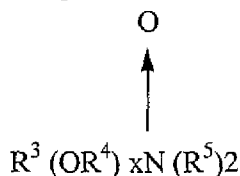
10 Os tensoativos zwiteriônicos também são adequados para o uso em composições detergentes de lavar roupas. Estes tensoativos podem ser amplamente descritos como derivados de aminas secundárias e terciárias ou derivados de aminas heterocíclicas secundárias e terciárias ou compostos derivados de amônio quaternário, fosfônio quaternário ou sulfônio terciário. Ver a US 3.929.678 (coluna 19, linha 38 até a coluna 22, linha 48) para
15 exemplos de tensoativos zwiteriônicos.

Quando incluídos nesta, as composições detergentes de lavar roupas da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2 % a cerca de 15 %, preferivelmente de cerca de 1 % a cerca de 10 % em peso de tais tensoativos zwiteriônicos.

20 Os tensoativos não iônicos, semi-polares são uma categoria especial de tensoativos não iônicos que inclui óxidos de amina solúveis em água contendo uma porção alquila de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono e duas porções selecionadas do grupo que consiste de grupos alquila e grupos hidroxialquila contendo de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de
25 carbono; os óxidos de fosfina solúveis em água contendo uma porção alquila de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono e duas porções selecionadas do grupo que consiste de grupos alquila e grupos hidroxialquila contendo de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de carbono e sulfóxidos solúveis em água contendo uma porção alquila de cerca de 10 a 18 átomos de carbono e uma

porção selecionada do grupo que consiste de porções de alquila e de hidroalquila de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de carbono

Os tensoativos detergentes não iônicos, semipolares incluem os tensoativos de óxido de amina que tenham a fórmula:



5 Em que R^3 é um grupo alquila, hidroalquila ou alquil
fenila ou misturas destes contendo de cerca de 8 a cerca de 22 átomos de
carbono; R^4 é um grupo alquilenos ou hidroalquilenos contendo de cerca de 2
a cerca de 3 átomos de carbono ou misturas destes; x é de 0 a cerca de 3 e
cada R^5 é um grupo alquila ou hidroalquila contendo de cerca de 1 a cerca
10 de 3 átomos de carbono ou um grupo de óxido de polietileno contendo de
cerca de 1 a cerca de 3 grupos de óxido de etileno. Os grupos R^5 podem ser
ligados uns aos outros, por exemplo, através de um átomo de oxigênio ou de
nitrogênio, para formar uma estrutura de anel.

Estes tensoativos de óxido de amina em particular incluem
15 óxidos de alquil dimetil amina e óxidos de alcóxi $\text{C}_8\text{-C}_{12}$ etil diidróxi etil
amina.

Quando incluídos nesta, as composições detergentes de lavar
roupas da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2 % a cerca de
15 %, preferivelmente de cerca de 1 % a cerca de 10 % em peso de tais
20 tensoativos não iônicos semi-polares.

SISTEMA FORMADOR

As composições de acordo com a presente invenção podem
ainda compreender um sistema formador. Qualquer sistema formador
convencional é adequado para o uso nesta incluindo materiais de
25 aluminossilicato, silicatos, policarboxilatos e ácidos graxos, materiais tais
como etilenodiamino tetraacetato, sequestrantes de íon metálico tais como

aminopolifosfonatos, particularmente ácido etilenodiamino tetrametileno fosfônico e ácido dietileno triamina pentamentilenofosfônico. Embora menos preferidos por razões ambientais óbvias, os formadores de fosfato também podem ser aqui usados.

5 Os formadores adequados podem ser um material inorgânico de troca iônica, habitualmente um material inorgânico de aluminossilicato hidratado, mais particularmente um zeólito sintético hidratado, tal como os zeólitos hidratados A, X, B, HS ou MAP.

10 Um outro material formador inorgânico adequado é silicato em camada, por exemplo, SKS-6 (Hoechst). O SKS-6 é um silicato cristalino em camada que consiste de silicato de sódio ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$).

Os policarboxilatos adequados que contenham um grupo carbóxi incluem ácido lático, ácido glicólico e derivados de éter destes, como divulgado nas Patentes Belgas N^{os} 831.368, 821.369 e 821.370. Os policarboxilatos que contenham dois grupos carbóxi incluem os sais solúveis em água de ácido succínico, ácido malônico, ácido (etilenodióxi) diacético, ácido maléico, ácido diglicólico, ácido tartárico, ácido tartrônico e ácido fumárico, bem como os carboxilatos de éter descritos na German Offenle-
 15 enschrift 2.446.686 e 2.446.487, US 3.935.257 e os carboxilatos de sulfinila descritos na Patente Belga N^o 840.623. Os policarboxilados que contenham três grupos carbóxi incluem, em particular, os citratos, aconitratos e citraconatos solúveis em água bem como os derivados de succinato tais como os carboximetiloxissuccinatos descritos na Patente Britânica N^o 1.379.241, os lactoxissuccinatos descritos no pedido Holandês 7205873 e os materiais de
 20 oxipolicarboxilato tais como os 2-oxa-1,1,3-propano tricarboxilatos descritos na Patente Britânica N^o 1.387.447.

Os policarboxilatos que contenham quatro grupos carbóxi incluem os oxidissuccinatos divulgados na Patente Britânica N^o 1.261.829, os 1,1,2,2-etano tetracarboxilatos, 1,1,3,3-propano tetracarboxilatos que

5 contenham substituintes sulfo incluem os derivados de sulfossucinato divulgados nas Patentes Britânicas N^{os} 1.398.421 e 1.398.422 e na US 3.936.448 e os citratos pirolisados, sulfonados descritos na Patente Britânica N^o 1.082.179, enquanto os policarboxilatos que contenham substituintes de fosfona são divulgados na Patente Britânica N^o 1.439.000.

10 Os policarboxilatos alicíclicos e heterocíclicos incluem ciclopentano-cis,cis-cis-tetracarboxilatos, pentacarboxilatos de ciclopentadienida, 2,3,4,5-tetraidro-furan-cis,cis,cis-tetracarboxilatos, 2,5-tetraidro-furan-cis, discarboxilatos, 2,2,5,5-tetraidrofuran-tetracarboxilatos, 1,2,3,4,5,6-hexano-hexacarboxilatos e derivados de carboximetila de álcoois poliídricos tais como sorbitol, manitol e xilitol. Os policarboxilatos aromáticos incluem ácido melítico, ácido piromelítico e os derivados do ácido ftálico divulgados na Patente Britânica N^o 1.425.343.

15 Dos acima, os policarboxilatos preferidos são os hidroxicarboxilatos que contenham até três grupos carbóxi por molécula, mais particularmente citratos.

20 Os sistemas formadores preferidos para o uso nas composições presentes incluem uma mistura de um formador de aluminossilicato insolúvel em água tal como o zeólito A ou de um silicato em camada (SKS-6) e um agente de quelação de carboxilato solúvel em água tal como o ácido cítrico.

25 Um quelante adequado para a inclusão nas composições detergentes de acordo com a invenção é o ácido etilenodiamino-N,N'-dissuccínico (EDDS) ou os seus sais de metal alcalino, metal alcalino terroso, amônio ou de amônio substituído ou misturas destes. Os compostos de EDDS preferidos são os da forma de ácido livre e seus sais de sódio ou de magnésio. Os exemplos de tais sais de sódio preferidos de EDDS incluem Na₂EDDS e Na₄EDDS. Os exemplos de tais sais de magnésio preferidos de EDDS incluem MgEDDS e Mg₂EDDS. Os sais de magnésio são os mais preferidos

para a inclusão nas composições de acordo com a invenção.

Os sistemas formadores preferidos incluem uma mistura de um formador de aluminossilicato insolúvel em água tal como o zeólito A e um agente de quelação de carboxilato solúvel em água tal como o ácido
5 citrico.

Outros materiais formadores que podem formar parte do sistema formador para o uso em composições granulares incluem materiais inorgânicos tais como carbonatos de metal alcalino, bicarbonatos, silicatos e materiais orgânicos tais como os fosfonatos orgânicos, os amino
10 polialquilenos fosfonatos e os amino policarboxilatos. Outros sais orgânicos solúveis em água adequados são os ácidos homo- ou co-poliméricos ou seus sais em que o ácido policarboxílico compreende pelo menos dois radicais carboxila separados um do outro por não mais do que dois átomos de carbono.

15 Os polímeros deste tipo são divulgados na GB-A-1.596.756. Os exemplos de tais sais são poliacrilatos de peso molecular de 2000 a 5000 e seus copolímeros com anidrido maléico, tais copolímeros tendo um peso molecular de 20.000 a 70.000, especialmente de cerca de 40.000.

Os sais formadores de detergência são normalmente incluídos
20 em quantidades de 5 % a 80 % em peso da composição. Os níveis preferidos de formadores para detergentes líquidos são de 5 % a 30 %.

ENZIMAS:

A mananase é incorporada nas composições de limpeza ou de detergente de acordo com a invenção, preferivelmente em um nível de 0,0001
25 % a 2 %, mais preferivelmente de 0,0005 % a 0,5 %, o mais preferido de 0,001 % a 0,1 % da enzima pura por peso da composição.

As composições de limpeza da presente invenção podem ainda compreender como um elemento essencial uma carboidrase selecionada do grupo que consiste de celulasas, amilases, enzimas que degradam a

pectina e xiloglicanases. Preferivelmente, as composições de limpeza da presente invenção compreenderão uma manase, uma amilase e uma *bioscouring-type* da enzima selecionada do grupo que consiste de celulases, enzimas que degradam pectina e xiloglicanases.

5 As celulases utilizáveis na presente invenção incluem tanto celulases bacterianas quanto fúngicas. Preferivelmente terão um pH ótimo entre 5 e 12 e uma atividade específica acima de 50 CEVU/mg (Unidade de Viscosidade de Celulose). As celulases adequadas são divulgadas nas Patentes U.S. 4.435.307, J61078384 e WO 96/02653 que divulgam a celulase
10 fúngica produzida a partir do *Humicola insolens*, *Trichoderma*, *Thielavia* e *Sporotrichum*, respectivamente. A EP 739 982 descreve celulases isoladas das novas espécies de *Bacillus*. As celulases adequadas também são divulgadas nas GB-A-2075028; GB-A-2095275; DE-OS-22 47 832 e WO 95/26398.

15 Os exemplos de tais celulases são as celulases produzidas por uma cepa do *Hunicola insolens* (*Humicola grisea* var. *thermoidea*), particularmente a cepa *Humicola insolens*, DSM 1800. Outras celulases adequadas são as celulases originadas do *Humicola insolens* tendo um peso molecular de cerca de 50 kD, um ponto isoelétrico de 5,5 e contendo 415
20 aminoácidos, e uma endo-beta-1,4-glicanase de ~4,3kD derivada do *Humicola indolens*, DSM 1800; uma celulase preferida tem a sequência de aminoácido divulgada no Pedido de Patente PCT N^o WO 91/17243. As celulases também adequadas são as celulases EGIII do *Trichoderma longibrachiatum* descrita na WO 94/21801. As celulases especialmente
25 adequadas são as celulases que tenham os benefícios de proteção da cor. Os exemplos de tais celulases são as celulases descritas nas WO 96/29397, EP-A-0495257, WO 91/17243, WO 91/17244 e WO 91/21801. Outras celulases adequadas para propriedades de proteção e ou limpeza de tecidos são descritas nas WO 96/34092, WO 96/17994 e WO 95/24471.

As ditas celulasas são normalmente incorporadas na composição detergente em níveis de 0,0001 % a 2 % da enzima pura por peso da composição detergente.

As celulasas preferidas para o propósito da presente invenção
5 são celulasas alcalinas, isto é enzima que tenha pelo menos 25 %, mais preferivelmente pelo menos 40 % da sua atividade máxima em um pH que varia de 7 a 12. As celulasas mais preferidas são as enzimas que tenham a sua atividade máxima em um pH que varie de 7 a 12. Uma celulase alcalina preferida é a celulase vendida sob o nome comercial de Carezyme® pela
10 Novo Nordisk A/S.

As amilases (α e/ou β) podem ser incluídas para a remoção de manchas com base em carboidrato. A WO 94/02597, Novo Nordisk A/S publicada em 03 de fevereiro de 1994, descreve composições de limpeza que incorporam amilases mutantes. Ver também a WO 95/10603, Novo Nordisk
15 A/S, publicada em 20 de abril de 1995. Outras amilases conhecidas para o uso em composições de limpeza incluem tanto as α - quanto as β -amilases. As α -amilases são conhecidas na técnica e incluem aquelas divulgadas nas Patente US Nº 5.003.257; EP 252.666; WO 91/00353; FR 2.676.456; EP 285.123; EP 525.610; EP 368.341; e relatório descritivo da Patente Britânica
20 Nº 1.296.839 (Novo). Outras amilases adequadas são amilases acentuadas na estabilidade descritas na WO 94/18314, publicada em 18 de agosto de 1994 e na WO 96/05295, Genencor, publicada em 22 de fevereiro de 1996 e variantes de amilase que tenham modificações adicionais no precursor imediato, disponível da Novo Nordisk A/S, divulgada na WO 95/10613,
25 publicada em abril de 1995. Também adequadas são as amilases descritas na EP 277 216, WO 95/26397 e na WO 96/23873 (todas da Novo Nordisk).

Os exemplos de produtos comerciais de α -amilases são Purafect Ox An® da Genencor e Termamyl®, Ban®, Fungamyl® e Duramyl®, todas disponíveis da Novo Nordisk A/S Dinamarca. A WO 95/26397

descreve outras amilases adequadas: α -amilases caracterizadas por terem uma atividade específica pelo menos 25 % mais alta do que a atividade específica do Termamyl® em uma faixa de temperatura de 25° C a 55° C e em um valor de pH na faixa de 8 a 10, medidos pelo ensaio de atividade de α -amilase Phadebas®. As adequadas são as variantes das enzimas acima, descritas na WO 96/23873 (Novo Nordisk). Outras enzimas amilolíticas com propriedades melhoradas com respeito ao nível de atividade e a combinação de termoestabilidade e um nível mais alto de atividade estão descritas na WO 95/35382.

10 As amilases preferidas para o propósito da presente invenção são as amilases vendidas sob o nome comercial Termamyl, Duramyl e Maxamyl e/ou as variantes de α -amilase, que demonstram a termoestabilidade aumentada, divulgada como a SEQ ID NO: 2 na WO 96/23873.

15 As amilases preferidas para aplicações específicas são amilases alcalinas, isto é enzimas que tenham uma atividade enzimática de pelo menos 10 %, preferivelmente pelo menos 25 %, mais preferivelmente pelo menos 40 % da sua atividade máxima em um pH que varia de 7 a 12. As amilases mais preferidas são enzimas que tenham a sua atividade máxima em um pH que varia de 7 a 12.

20 As enzimas amilolíticas são incorporadas nas composições detergentes da presente invenção em um nível de 0,0001 % a 2 %, preferivelmente de 0,00018 % a 0,06 %, mais preferivelmente de 0,00024 % a 0,048 % da enzima pura por peso da composição.

25 O termo “enzima que degrada a pectina” é intencionada a abranger arabinanase (EC 3.2.1.99), galactanases (EC 3.2.1.89), poligalacturonase (EC 3.2.1.15), exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67), exo-poli-alfa-galacturonidase (EC 3.2.1.82), pectino liase (EC 4.2.2.10), pectino esterase (EC 3.2.1.11), pectato liase (EC 4.2.2.2), exo-poligalacturonato liase

(EC 4.2.2.9) e hemicelulases tais como endo-1,3- β -xilosidase (EC 3.2.1.32), xilan-1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55). As enzimas que degradam pectina são misturas naturais das atividades enzimáticas mencionadas acima. As enzimas de pectina incluem
 5 portanto as pectino metilesterases que hidrolisam as ligações do éster de pectino metila, as poligalacturonases que clivam as ligações glicosídicas entre as moléculas do ácido galacturônico e as pectino transeliminases ou liases que atuam sobre os ácidos pécticos para realizar a clivagem não hidrolítica de ligações α -1 $\rightarrow$ 4 glicosídicas para formar derivados não
 10 saturados de ácido galacturônico.

As enzimas que degradam a pectina são incorporadas nas composições de acordo com a invenção, preferivelmente em um nível de 0,0001 % a 2 %, mais preferivelmente de 0,0005 % a 0,5 %, ou mais preferido de 0,001 % a 0,1 % de enzima pura por peso da composição total.

15 As enzimas preferidas que degradam a pectina para aplicações específicas são enzimas alcalinas que degradam a pectina, isto é enzimas que tenham uma atividade enzimática de pelo menos 10 %, preferivelmente de pelo menos 25 %, mais preferivelmente de pelo menos 40 % da sua atividade máxima em um pH que varia de 7 a 12. As enzimas mais preferidas que
 20 degradam a pectina são enzimas que tenham a sua atividade máxima em um pH que varia de 7 a 12. As enzimas alcalinas que degradam a pectina são produzidas por microorganismos alcalofílicos, por exemplo, microorganismos bacterianos, fúngicos e de levedura tais como as espécies *Bacillus*. Os microorganismos preferidos são o *Bacillus firmus*, *Bacillus*
 25 *circulans* e o *Bacillus subtilis*, como descrito na JP 56131376 e na JP 56068393. As enzimas alcalinas que decompõem a pectina incluem a galacturan-1,4- α -galacturonase (EC 3.2.1.67), atividades de poligalacturonase (EC 3.2.1.15), pectino esterase (EC 3.1.1.11), pectato liase (EC 4.2.2.2) e suas isoenzimas e estas podem ser produzidas por intermédio das

espécies *Erwinia*. Os preferidos são *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *E. amylovora*, *E. herbicola*, *E. dissolvens* como descrito nas JP 59066588, JP 63042988 e no World J. Microbiol. Microbiotechnol. (8, 2, 115 a 120) 1992. As ditas enzimas alcalinas de pectina também podem ser produzidas pelas

5 espécies *Bacillus* como divulgado na JP 73006557 e no Agr. Biol. Chem. (1972), 36(2) 285 a 293.

O termo xiloglicanase abrange a família das enzimas descritas por Vincken e Voragen na Wageningen University [Vincken *et al.*, (1994) Plant Physiol., 104, 99 a 107] e são capazes de degradar xiloglicanos como

10 descrito em Hayashi *et al.*, (1989) Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., 40, 139 a 168. Vincken *et al.*, demonstraram a remoção de revestimento de xiloglicano da celulose da parede celular isolada de maçã por uma xiloglicanase purificada a partir do *Trichoderma viride* (endo-IV-glicanase). Esta enzima

acentua a degradação enzimática da celulose embutida na parede celular e

15 trabalha em sinergia com as enzimas de pectina. A Rapidase LIQ+ da Gist-Brocades contém uma atividade de xiloglicanase.

Esta xiloglicanase é incorporada nas composições de limpeza de acordo com a invenção preferivelmente em um nível de 0,0001 % a 2 %, mais preferivelmente de 0,0005 % a 0,5 %, ou mais preferido de 0,001 % a

20 0,1 % de enzima pura por peso da composição.

As xiloglicanases preferidas para aplicações específicas são as xiloglicanases alcalinas, isto é enzimas que tenham uma atividade enzimática de pelo menos 10 %, preferivelmente de pelo menos 25 %, mais preferivelmente de pelo menos 40 % da sua atividade máxima em um pH que

25 varia de 7 a 12. As xiloglicanases mais preferidas são enzimas que tenham a sua atividade máxima em uma faixa de pH de 7 a 12.

As enzimas mencionadas acima podem ser de qualquer origem adequada, tal como de origem vegetal, animal, bacteriana, fúngica e de levedura. A origem pode ser ainda mesofílica ou extremofílica

(psicrofílica, psicrotrópica, termofílica, barofílica, alcalofílica, acidofílica, halofílica, etc.). As formas purificadas ou não purificadas destas enzimas podem ser usadas. Atualmente, é prática comum modificar enzimas do tipo selvagem pelas técnicas de proteína/engendramento genético, de modo a
5 otimizar a sua eficiência de desempenho nas composições de limpeza da invenção. Por exemplo, as variantes podem ser planejadas tal que a compatibilidade da enzima aos ingredientes habitualmente encontrados em tais composições seja aumentada. Alternativamente, a variante pode ser planejada tal que o pH ótimo, a estabilidade do branqueamento ou quelante, a
10 atividade catalítica e outros, da variante de enzima sejam ajustados para condizer com a aplicação particular de limpeza.

Em particular, a tensão deve ser focalizada sobre os aminoácidos sensíveis à oxidação no caso de estabilidade ao branqueamento e sobre as cargas de superfície quanto a compatibilidade do tensoativo. O
15 ponto isoelétrico de tais enzimas podem ser modificados pela substituição de alguns aminoácidos carregados, por exemplo, um aumento no ponto isoelétrico pode ajudar a melhorar a compatibilidade com tensoativos aniônicos. A estabilidade das enzimas pode ser ainda acentuada pela criação de por exemplo pontes salinas adicionais e sítios de ligação de metal de
20 reforço para aumentar a estabilidade do quelante.

AGENTES DE BRANQUEAMENTO:

Os ingredientes detergentes opcionais adicionais que podem ser incluídos nas composições detergentes da presente invenção incluem agentes de branqueamento tais como PB1, PB4 e percarbonato com um
25 tamanho de partícula de 400 a 800 microns. Estes componentes de agente de branqueamento podem incluir um ou mais agentes de branqueamento de oxigênio e, dependendo do agente branqueador escolhido, um ou mais ativadores de branqueamento. Quando presentes, os compostos de branqueamento de oxigênio estarão tipicamente presentes em níveis de cerca

de 1 % a cerca de 25 %. No geral, os compostos de branqueamento são componentes opcionais adicionados em formulações não líquidas, por exemplo detergentes granuláveis.

Um componente de agente de branqueamento para o uso nesta
5 pode ser qualquer um dos agentes de branqueamento, utilizáveis para composições detergentes, incluindo branqueadores de oxigênio, bem como outros conhecidos na técnica.

Um agente de branqueamento adequado para a presente invenção pode ser um agente de branqueamento ativado ou não ativado.

10 Uma categoria de agente de branqueamento de oxigênio que pode ser usada abrange agentes de branqueamento de ácido percarboxílico e seus sais. Os exemplos adequados desta classe de agentes inclui monoperoxifalato de magnésio hexaidratado, o sal de magnésio do ácido meta-cloro perbenzóico, o ácido 4-nonilamino-4-oxoperoxibutírico e o ácido
15 diperoxidodecanodióico. Tais agentes de branqueamento são divulgados nas US 4.483.781, US 740.446, EP 0 133 354 e US 4.412.934. Os agentes de branqueamento altamente preferidos também incluem o ácido 6-nonilamino-6-oxoperoxicapróico como descrito na US 4.634.551.

Uma outra categoria de agentes de branqueamento que podem
20 ser usados abrange os agentes de branqueamento de halógeno. Os exemplos de agentes de branqueamento de hipoclorito, por exemplo, incluem o ácido tricloro isocianúrico e os dicloroisocianuratos de sódio e de potássio e N-cloro e N-bromo alceno sulfonamidas. Tais materiais são normalmente adicionados de 0,5 a 10 % em peso do produto acabado, preferivelmente de 1
25 a 5 % em peso.

Os agentes que liberam peróxido de hidrogênio podem ser usados em combinação com ativadores de branqueamento tais como tetraacetiletlenodiamina (TAED), nonanoiloxibenzenossulfonato (NOBS, descrito na US 4.412.934), 3,5-trimetilexanoloxibenzenossulfonato

(ISONOBS, descrito na EP 120 591) ou pentaacetilglicose (PAG) que são peridrolisados para formar um perácido como as espécies branqueadora ativas, levando a um efeito melhorado de branqueamento. Além disso, muito adequado são os ativadores de branqueamento C8 (6-octanamido-caproil) oxibenzeno-sulfonato, C9(6-nonanamido caproil) oxibenzenossulfonato e C10 (6-decanamido caproil) oxibenzenossulfonato ou mistura destes. Da mesma maneira, os ativadores adequados são ésteres de citrato acilado tais como os divulgados no Pedido de Patente Européia Nº 91870207.7.

Os agentes branqueadores utilizáveis, incluindo peroxiácidos e sistemas branqueadores que compreendem ativadores de branqueamento e compostos branqueadores de peroxigênio para o uso em composições de limpeza de acordo com a invenção estão descritos no Pedido USSN 08/136.626.

O peróxido de hidrogênio também pode estar presente pela adição de um sistema enzimático (isto é, uma enzima e um substrato desta) que seja capaz da geração de peróxido de hidrogênio no início ou durante o processo de lavagem e/ou enxágue. Tais sistemas enzimáticos são divulgados no Pedido de Patente Européia EP 0 537 381.

Os agentes de branqueamento outros que não os agentes de branqueamento de oxigênio também são conhecidos na técnica e podem ser aqui utilizados. Um tipo de agente de branqueamento que não de oxigênio, de interesse particular inclui agentes de branqueamento fotoativados tais como as ftalocianinas sulfonadas de zinco e/ou de alumínio. Estes materiais podem ser depositados no substrato durante o processo de lavagem. Na irradiação com luz, na presença de oxigênio, tal como pendurando-se roupas para secar na luz do dia, a ftalocianina sulfonada de zinco é ativada e, conseqüentemente, o substrato é branqueado. A ftalocianina de zinco preferida e um processo branqueador fotoativado são descritos na US 4.033.718. Tipicamente, a composição detergente conterá cerca de 0,025 % a

cerca de 1,25 % em peso de ftalocianina sulfonada de zinco.

Os agentes de branqueamento também podem compreender um catalisador de manganês. O catalisador de manganês pode ser, por exemplo, um dos compostos descritos em “Efficient manganese catalysts for
5 low-temperature bleaching”, Nature 369, 1994, páginas 637 a 639.

SUPRESSORES DE ESPUMAS:

Um outro ingrediente opcional é um supressor de espumas, exemplificado por siliconas e misturas de sílica-silicona. As siliconas podem ser, no geral, representadas por materiais alquilados de polisiloxana,
10 enquanto a sílica é normalmente usada em formas finamente divididas, exemplificada por aerogéis e xerogéis de sílica e sílicas hidrofóbicas de vários tipos. Estes materiais podem ser incorporados como particulados, em que o supressor de espuma é vantajosa e livremente incorporado em um carregador impermeável, detergente, de superfície substancialmente não
15 ativa, solúvel em água ou dispersível em água. Alternativamente, o supressor de espuma pode ser dissolvido ou disperso em um carregador líquido e aplicado por pulverização sobre um ou mais dos outros componentes.

Um agente controlador de espuma preferido de silicona é divulgado na US 3.933.672. Outros supressores de espuma particularmente
20 utilizáveis são os supressores de espuma de silicona alto emulsificantes, descritos no Pedido de Patente Alemã DTOS 2.646.126. Um exemplo de tal composto é o DC-544, comercialmente disponível da Dow Corning, que é um copolímero de siloxana-glicol. Os agentes controladores de espuma especialmente preferidos são os sistemas supressores de espuma que
25 compreendem uma mistura de óleos de silicona e 2-alkil-alkanóis. Os 2-alkil-alkanóis adequados são 2-butil-octanol que são comercialmente disponíveis sob o nome comercial Isofol 12 R.

Os sistemas supressores de espuma são descritos no Pedido de Patente Européia Nº 92201649.8. As ditas composições podem compreender

uma mistura de sílica/silica em combinação com sílica fumigada não porosa tais como Aerosil®.

Os supressores de espuma descritos acima são normalmente utilizados em níveis de 0,001 % a 2 % em peso da composição, preferivelmente de 0,01 % a 1 % em peso.

OUTROS COMPONENTES:

Outros componentes usados nas composições detergentes podem ser utilizados, tais como agentes de suspensão de sujeira, agentes de liberação de sujeira, abrillantadores óticos, abrasivos, bactericidas, inibidores de embaciamento, agentes corantes e/ou perfumes encapsulados ou não encapsulados.

Os materiais de encapsulação especialmente adequados são cápsulas solúveis em água que consistem de uma matriz de polissacarídeo e compostos de poliálcool, tais como os descritos na GB 1.464.616.

Outros materiais de encapsulação solúveis em água, adequados compreendem dextrinas derivadas de ésteres ácidos de amido não gelatinizados de ácidos dicarboxílicos substituídos tais como os descritos na US 3.455.838. Estas dextrinas de éster ácido são, preferivelmente =, preparadas de amidos tais como milho ceroso, sorgo ceroso, sagú, tapioca e batata. Os exemplos adequados de materiais de encapsulação incluem N-Lok fabricado pela National Starch. O material de encapsulação N-Lok consiste de um amido de milho modificado e glicose. O amido é modificado pela adição de grupos monofuncionais substituídos, tais como anidrido de ácido octenil succínico.

Os agentes de anti-redeposição e de suspensão de sujeira adequados nesta incluem derivados de celulose tais como celulose metílica, celulose carboximetílica e celulose hidroxietílica e ácidos policarboxílicos homo- ou co-poliméricos ou seus sais. Os polímeros deste tipo incluem os poliácridatos e copolímeros de anidrido maléico-ácido acrílico anteriormente

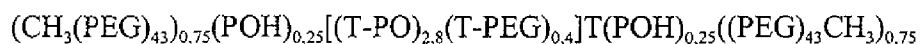
mencionados como formadores, bem como copolímeros de anidrido maléico com etileno, éter metilvinílico e ácido metacrílico, o anidrido maléico; constituindo pelo menos 20 % em mol do copolímero. Estes materiais são normalmente usados em níveis de 0,5 % a 10 % em peso, mais
 5 preferivelmente de 0,75 % a 8 %, o mais preferivelmente de 1 % a 6 % em peso da composição.

Os abrillantadores óticos preferidos são aniônicos no caráter, os exemplos dos quais são 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2:2' dissulfonato de dissódio, 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2:2'-dissulfonato de dissódio,
 10 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2:2'-dissulfonato de dissódio, 4',4''-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2-sulfonato de monossódio, 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)-estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio,
 15 4,4'-bis-(2-anilino-4-(1-metil-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio, 2-(estilbil-4''-(nafto-1',2':4,5)-1,2,3-triazol-2''-sulfonato de sódio e 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenila.

Outros materiais poliméricos utilizáveis são os polietileno glicóis, particularmente aqueles de peso molecular entre 1.000 e 10.000, mais
 20 particularmente de 2.000 a 8.000 e o mais preferivelmente em torno de 4.000. Estes são usados em níveis de 0,20 % a 5 %, mais preferivelmente de 0,25 % a 2,5 % em peso. Estes polímeros e os sais de poli-carboxilato homo- ou copoliméricos anteriormente mencionados são valiosos para melhorar a
 25 manutenção da brancura, a deposição de cinzas do tecido e desempenho de limpeza sobre a argila, proteináceos e sujeiras oxidáveis na presença de impurezas de metal de transição.

Os agentes de liberação de sujeira utilizáveis nas composições da presente invenção são convencionalmente copolímeros ou terpolímeros do

ácido tereftálico com unidades de etileno glicol e/ou propileno glicol em vários arranjos. Os exemplos de tais polímeros são divulgados nas US 4.116.885 e 4.711.730 e na EP 0 272 033. Um polímero particular preferido, de acordo com a EP 0 272 033 tem a fórmula:



5 onde PEG é $-(\text{OC}_2\text{H}_4)\text{O}-$, PO é $(\text{OC}_3\text{H}_6\text{O})$ e T é $(\text{pOOC}_6\text{H}_4\text{CO})$.

Também são muito utilizáveis os poliésteres modificados como copolímeros aleatórios de tereftalato de dimetila, sulfoisofталato de dimetila, etileno glicol e 1,2-propanodiol, os grupos finais consistindo primariamente de sulfobenzoatos e em segundo lugar de mono ésteres de etileno glicol e/ou 1,2-propanodiol. O objetivo é obter um polímero encapuzado em ambas as extremidades por grupos de sulfobenzoato, “primariamente”, no presente contexto, a maioria dos ditos copolímeros aqui serão encapuzados na extremidade por grupos de sulfobenzoato. Entretanto, alguns copolímeros serão menos do que completamente encapuzados e portanto seus grupos finais podem consistir de monoésteres de etileno glicol e/ou 1,2-propanodiol, destes consiste o “em segundo lugar” de tal espécie.

Os poliésteres selecionados aqui contêm cerca de 46 % em peso de ácido dimetil tereftálico, cerca de 16 % em peso de 1,2-propanodiol, cerca de 10 % em peso de etileno glicol, cerca de 13 % em peso de ácido dimetil sulfobenzóico e cerca de 15 % em peso de ácido sulfoisofталico e têm um peso molecular de cerca de 3.000. Os poliésteres e seu método de preparação estão descritos em detalhes na EP 311 342.

AGENTES AMACIANTES:

Os agentes amaciantes de tecido também podem ser incorporados nas composições detergentes de lavar roupas de acordo com a presente invenção. Estes agentes podem ser do tipo inorgânico ou orgânico. Os agentes amaciantes inorgânicos são exemplificados pelas argilas de esmectita divulgadas na GB-A-1 400898 e na US 5.019.292. Os agentes

orgânicos de amaciantes de tecido incluem as aminas terciárias insolúveis em água como divulgado na GB-A1 514 276 e na EP 0 011 340 e a sua combinação com sais de amônio mono quaternário C_{12} - C_{14} são divulgados na EP-B-0 026 528 e di-amidas de cadeia longa como divulgado na EP 0 242 919. Outros ingredientes orgânicos utilizáveis dos sistemas de amaciamento de tecido incluem materiais de óxido de polietileno de alto peso molecular como divulgado na EP 0 299 575 e EP 0 313 146.

Os níveis de argila de esmectita estão normalmente na faixa de 5 % a 15 %, mais preferivelmente de 8 % a 12 % em peso, com o material sendo adicionado como um componente misturado a seco ao resto da formulação. Os agentes orgânicos de amaciamento de tecido tais como as aminas terciárias insolúveis em água ou os materiais de di-amida de cadeia longa são incorporados em níveis de 0,5 % a 5 % em peso, normalmente de 1 % a 3 % em peso, embora os materiais de óxido de polietileno de alto peso molecular e os materiais catiônicos solúveis em água seja adicionados em níveis de 0,1 % a 2 %, normalmente de 0,15 % a 1,5 % em peso. Estes materiais são normalmente adicionados à porção secada por pulverização da composição, embora em alguns exemplos possa ser mais conveniente adiciona-los como um particulado misturado a seco ou pulverizando-os como um líquido fundido sobre os outros componentes sólidos da composição.

AGENTES POLIMÉRICOS INIBIDORES DA TRANSFERÊNCIA DE PIGMENTO

As composições detergentes de acordo com a presente invenção também podem compreender de 0,001 % a 10 %, preferivelmente de 0,01 % a 2 %, mais preferivelmente de 0,05 % a 1 % em peso dos agentes poliméricos inibidores da transferência de pigmento. Os ditos agentes poliméricos inibidores da transferência de pigmento são normalmente incorporados nas composições detergentes para inibir a transferência de pigmentos dos tecidos coloridos para os tecidos lavados junto com eles. Estes

polímeros têm a capacidade de complexar ou adsorver os pigmentos fugitivos lixiviados dos tecidos pigmentados antes que os pigmentos tenham a oportunidade de se ligarem a outros artigos na lavagem.

Os agentes poliméricos inibidores da transferência de pigmento especialmente adequados são polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona e de N-vinilimidazol, polímeros de polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis ou misturas destes.

A adição de tais polímeros também acentua o desempenho das enzimas de acordo com a invenção.

USO NA INDÚSTRIA DE POLPA DE PAPEL

Além disso, é considerado que a mananase da presente invenção é utilizável nos processos de branqueamento isentos de cloro para polpa de papel (polpas químicas, polpas semiquímicas, polpas mecânicas ou polpas de kraft) de modo a aumentar o seu brilho. Diminuindo ou eliminando deste modo a necessidade para peróxido de hidrogênio no processo de branqueamento.

USO NAS INDÚSTRIAS DE PROCESSAMENTO TÊXTIL E DE FIBRA CELULÓSICA

A mananase da presente invenção pode ser usada em combinação com outras enzimas que degradem carboidrato (por exemplo, xiloglicanase, xilanase e várias pectinases) para a preparação de fibras ou para a limpeza de fibras em combinação com detergentes.

No presente contexto, o termo “material celulósico” é intencionado significar fibras, tecidos costurados ou não costurados, incluindo malhas, tecido transado, brim, fios e atoalhados, feitos de algodão, misturas de algodão ou celulósicos naturais ou biossintéticos (por exemplo, originários de fibras de celulose que contenham xilana tais como de polpa de madeira) ou misturas destes. Os exemplos de misturas são misturas de

algodão ou rayon/viscose com um ou mais materiais associados tais como lã, fibras sintéticas (por exemplo, fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de álcool polivinílico, fibras de cloreto de polivinila, fibras de cloreto de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliuréia, fibras de aramíde) e fibras que contenham celulose (por exemplo, rayon/viscose, rami, cânhamo, fibra de linho/tecido de linho, juta, fibras de celulose acetato, *lyocell*).

O processamento de material celulósico para a indústria têxtil, como por exemplo fibra de algodão, em um material pronto para a confecção de peças de roupa envolve várias etapas: a fiação da fibra em um fio; a construção do tecido trançado ou costurado, a partir do fio e a preparação subsequente, operações de tingimento e acabamento. Os artigos de tecido são construídos trançando-se fios de enchimento entre uma série de fios urdidos; os fios podem ser de dois tipos diferentes.

Desengomadura: a goma polimérica como por exemplo, manana, amido é adicionada antes da tecedura de modo a aumentar a velocidade da urdidura; este material deve ser removido antes dos procedimentos subsequentes. A enzima da invenção é utilizável para a remoção da goma que contém manana.

20 DEGRADAÇÃO DOS ESPESSANTES

As galactomananas tais como a goma guar e a goma de alfarroba são amplamente usadas como agentes espessantes, por exemplo, em alimentos e em pasta de impressão para a impressão artigos têxteis tais como impressões de camisetas. A enzima ou a preparação de enzima de acordo com a invenção podem ser usados para reduzir a viscosidade de por exemplo, alimentos residuais no equipamento de processamento e deste modo facilitar a limpeza após o processamento. Além disso, é considerado que a enzima ou a preparação de enzima é utilizável para reduzir a viscosidade da pasta de impressão, facilitando deste modo a lavagem da pasta de impressão em

excesso após a estampagem dos artigos têxteis.

DEGRADAÇÃO OU MODIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A enzima ou a preparação de enzima de acordo com a invenção é preferivelmente usada como um agente para a degradação ou
5 modificação de material contendo manana, galactomanana, glicomanana ou galactoglicomanana de origem vegetal. Os exemplos de tais materiais são goma guar e goma de alfarroba.

A mananase da invenção pode ser usada na modificação das propriedades físicoquímicas de material derivado de vegetal, tais como a
10 viscosidade. Por exemplo, a mananase pode ser usada para reduzir a viscosidade de alimentação ou alimento que contenha manana e para promover o processamento de material viscoso que contenha manana e para promover o processamento de material que contenha manana viscosa.

EXTRAÇÃO DE CAFÉ

15 A enzima ou a preparação de enzima da invenção também podem ser usadas para hidrolisar as galactomananas presentes em um extrato líquido de café, preferivelmente de modo a inibir a formação de gel durante a secagem por congelamento do café (instantâneo). Preferivelmente, a mananase da invenção é imobilizada de modo a reduzir o consumo de enzima
20 e evitar a contaminação do café. Este uso é ainda divulgado na EP-A-676 145.

USO NA FRATURA DE UMA FORMAÇÃO SUBTERRÂNEA (PERFURAÇÃO DE PETRÓLEO)

Além disso, é considerado que a enzima da presente invenção
25 seja utilizável como um rompedor de enzima como divulgado nas Patentes US N^{os} 5.806.597, 5.562.160, 5.201.360 e 5.067.566 concedida à BJ Services Company (Houston, TX, U.S.A.), todas as quais são aqui incorporadas por referência.

Consequentemente, a mananase da presente invenção é

utilizada em um método de fraturar uma formação subterrânea em um poço em que um fluido de fraturação passível de formar gel é primeiro formado misturando-se um fluido aquoso, um polímero hidratável, um agente de reticulação adequado para reticular o polímero hidratável para formar um gel de polímero e um rompedor de enzima, isto é a enzima da invenção. O gel polimérico reticulado é bombeado para dentro do poço sob pressão suficiente para quebrar a formação em torno deste. O rompedor de enzima é introduzido para degradar o polímero reticulado com o tempo para reduzir a viscosidade do fluido de modo que o mesmo pode ser bombeado da formação de volta para a superfície do poço.

O rompedor de enzima pode ser o ingrediente de um fluido de rompimento ou um complexo de rompedor-polímero reticulado que ainda compreenda um polímero hidratável e um agente de reticulação. O fluido ou complexo de fraturamento pode ser um gel ou pode ser passível de formar gel. O complexo é utilizável em um método para usar o complexo em um fluido de fraturamento para fraturar uma formação subterrânea que esteja em torno de um poço pelo bombeamento do fluido para uma localização desejada do poço sob pressão suficiente para fraturar a formação subterrânea em torno deste. O complexo pode ser mantido em um estado substancialmente não reativo pela manutenção de condições específicas de pH e de temperatura, até um tempo no qual o fluido é colocado no poço e a fratura desejada é completada. Uma vez que a fratura esteja completada, as condições específicas nas quais o complexo é inativo não são mais mantidas. Quando as condições mudam suficientemente, o complexo torna-se ativo e o rompedor inicia a catalisar a degradação do polímero motivando que o fluido de fraturamento torne-se suficientemente fluídico para ser bombeado da formação subterrânea para a superfície do poço.

MATERIAIS E MÉTODOS

ENSAIOS PARA TESTE DE ATIVIDADE

Um polipeptídeo da invenção que tenha atividade de mananase pode ser testado quanto a atividade de mananase de acordo com procedimentos de teste padrão conhecidos na técnica, tais como pela aplicação de uma solução a ser testada a furos de 4 mm de diâmetro feitos em
 5 placas de agar contendo 0,2 % de galactomanana AZCL (alfarroba), isto é substrato para o ensaio de endo-1,4-beta-D-mananase disponível como CatNº I-AZGMA da companhia Megazyme (endereço da Megazyme na Internet: <http://www.megazyme.com/Purchase/index.html>).

10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA (ManU) DA MANANASE ENSAIO COLORIMÉTRICO

Substrato: 0,2 % de AZCL-Galactomanana (Megazyme, Austrália) de alfarroba em tampão 0,1 M de glicina, pH 10,0.

O ensaio é realizado em um micro tubo de Eppendorf de 1,5
 15 ml em um termomisturador com agitação e controle de temperatura a 40° C. A incubação de 0,750 ml de substrato com 0,05 ml de enzima por 20 minutos, interrompida por centrifugação durante 4 minutos a 15.000 ppm. A cor do sobrenadante é medido em 600 nm em uma cubeta de um cm.

Uma ManU (unidades de mananase) dá 0,24 abs em 1 cm.

20 CEPAS E ORGANISMO DOADOR

O *Bacillus sp.* I633 mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 1.

O *E. coli* DSM 12197 compreende o plasmídeo contendo o
 25 DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 1).

O *Bacillus agaradhaerens* NCIMB 40482 mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 5.

O *E. coli* DSM 12180 compreende o plasmídeo contendo o

DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 5).

O *Bacillus sp.* AAI12 mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 9.

5 O *E. coli* DSM 12433 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 9).

O *Bacillus halodurans* mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 11.

10 O *E. coli* DSM 12441 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 11).

O *Humicola insolens* mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 13.

15 O *E. coli* DSM 9984 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 13).

O *Bacillus sp.* AA349 mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 15.

20 O *E. coli* DSM 12432 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 15).

O *E. coli* DSM 12847 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 17).

O *E. coli* DSM 12848 compreende o plasmídeo contendo o
25 DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 19).

O *Bacillus clausii* mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 21.

O *E. coli* DSM 12849 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 21).

O *E. coli* DSM 12850 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 23)

O *Bacillus sp.* compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 25.

5 O *E. coli* DSM 12846 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 25).

O *Bacillus sp.* compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 27.

10 O *E. coli* DSM 12851 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 27).

O *Bacillus licheniformis* mencionado acima compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 29.

15 O *E. coli* DSM 12852 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 29).

O *Bacillus sp.* compreende a beta-1,4-mananase que codifica a sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 31.

O *E. coli* DSM 12436 compreende o plasmídeo contendo o DNA que codifica a beta-1,4-mananase da invenção (SEQ ID NO: 31).

20 Cepa *E. coli*: Células de *E. coli* SJ2 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. J. Bacteriol., 172, 4315 a 4321), foram preparadas e transformadas pela eletroporação usando-se um eletroporador Gene
25 Pulser™ a partir de BIO-RAD como descrito pelo fornecedor.

B. subtilis PL 2306. Esta cepa é o *B. subtilis* DN 1885 com os genes apr e npr rompidos (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. J. Bacteriol.,

172, 4315 a 4321), rompidos na unidade transcricional do gene de celulase do *Bacillus subtilis* conhecido, que resulta em células de celulase negativas. O rompimento foi realizado essencialmente como descrito em (Eds. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch e Richard Losick (1993) *Bacillus subtilis* and other
5 Gram-Positive Bacteria, American Society for microbiology, p. 618).

As células competentes foram preparadas e transformadas como descrito por Yasbin, R. E., Wilson, G. A. e Young, F. E. (1975) Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells. *J. Bacteriol.*,
10 121: 296 a 304.

MÉTODOS GERAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

A menos de que de outro modo estabelecido, todas as manipulações e transformações de DNA foram realizadas usando-se métodos padrão de biologia molecular (Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular cloning: A
15 laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.*, (eds.) “Current protocols in Molecular Biology”. John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. e Cutting, S. M. (eds.) “Molecular Biological Methods for *Bacillus*”. John Wiley and Sons, 1990).

As enzimas para as manipulações de DNA foram usadas de acordo com as instruções do fabricante (por exemplo, endonucleases de
20 restrição, ligases, etc. são obteníveis da New England Biolabs, Inc.).

PLASMÍDEOS

pSJ1678: (ver o Pedido de Patente International publicado como WO 94/19454).

25 pBK-CMV (Stratagene inc., La Jolla Ca.)

pMOL944. Este plasmídeo é um derivado do pUB110, contendo essencialmente elementos que tornam o plasmídeo propagável no *Bacillus subtilis*, o gene de resistência à canamicina e tendo um promotor forte e um peptídeo de sinal clonado a partir do gene *amyL* do *B.*

licheniformis ATCC14580. O peptídeo de sinal contém um sítio SacII que o torna conveniente para clonar o DNA que codifica a parte madura de uma proteína em fusão com o peptídeo de sinal. Isto resulta na expressão de uma Pré-proteína que é direcionada contra o exterior da célula.

5 O plasmídeo foi construído por meio de engendramento genético comum e é resumidamente descrito a seguir.

CONSTRUÇÃO DE pMOL944:

O plasmídeo pUB110 (McKenzie, T. *et al.*, 1986, Plasmid 15: 93 a 103) foi digerido com a enzima de restrição única NciI. Um fragmento de PCR
10 amplificado a partir do promotor amyL codificado no plasmídeo pDN1981 (P, L. Jørgensen *et al.*, 1990, Gene, 96, p37 a 41.) foi digerido com NciI e inserido no pUB110 digerido por NciI para dar o plasmídeo pSJ2624.

Os dois iniciadores de PCR usados têm as seguintes sequências:

15 #LWN5494 5'-GTCGCCGGGGCGGCCGCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC-3'
#LWN5495 5'-GTCGCCCGGGAGCTCTGATCAGGTACCAAGCTTGT
CGACCTGCAGAATGAGGCAGCAAGAAGAT-3'

O iniciador #LWN5494 insere um sítio NotI no plasmídeo.

O plasmídeo pSJ2624 foi depois digerido com SacI e NotI e
20 um novo fragmento de PCR amplificado no promotor amyL codificado no pDN1981 foi digerido com SacI e NotI e este fragmento de DNA foi inserido no pSJ2624 digerido por SacI-NotI para dar o plasmídeo pSJ2670.

Esta clonagem substitui a primeira clonagem do promotor amyL com o mesmo promotor mas na direção oposta. Os dois iniciadores
25 usados para a amplificação por PCR têm as seguintes sequências:

#LWN5938 5'-GTCGGCGGCCGCTGATCACGTACCAAGCTTG
TCGACCTGCAGAATGAGGCAGCAAGAAGAT-3'
#LWN5939 5'-GTCGGAGCTCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC-3'

O plasmídeo pSJ2670 foi digerido com as enzimas de

restrição PstI e BclI e um fragmento de PCR amplificado a partir de uma sequência clonada de DNA que codifica a alcalino amilase SP722 (Patente # WO9526397-A1) foi digerido com PstI e BclI e inserido para dar o plasmídeo pMOL944. Os dois iniciadores usados para a amplificação por

5 PCR têm a seguinte sequência:

#LWN7864 5'-AACAGCTGATCACGACTGATCTTTTAGCTTGGCAC-3'

#LWN7901 5'-AACTGCAGCCGCGGCACATCATAATGGGACAAATG

GG-3'

O iniciador #LWN7901 insere um sítio SacII no plasmídeo.

10 CULTIVO DE CEPAS DOADORAS E ISOLAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A cepa relevante de *Bacillus*, por exemplo, *Bacillus sp.* 1633 foi cultivado em TY com pH ajustado para aproximadamente pH 9,7 pela adição de 50 ml de Sesquicarbonato de sódio 1 M por 500 ml de TY. Após 24 horas de incubação a 30° C e 300 rpm, as células foram colhidas e o DNA

15 genômico foi isolado pelo método descrito por Pitcher *et al.*, [Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J., Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate; Lett. Appl. Microbiol. 1989 8 151 a 156].

MEIO

TY (como descrito em Ausubel F. M. *et al.*, (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995).

20

LB agar (como descrito em Ausubel F. M. *et al.*, (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995).

LBPG é o LB agar suplementado com 0,5 % de glicose e 0,05 M de fosfato de potássio, pH 7,0.

25 AZCL-galactomanana é adicionado ao LBPG-agar para 0,5 % de AZCL-galactomanana, é da Megazyme, Austrália.

Meio BPX é descrito na EP 0 506 780 (WO 91/09129).

NZY agar (por litro) 5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄, 5 g de extrato de levedura, 10 g de amina NZ (hidrolizato de caseína), 15 g de agar;

água desionizada adicionada para 1 litro, pH ajustado com NaOH para pH 7,5 e autoclave.

Caldo NZY (por litro) 5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄, 5 g de extrato de levedura, 10 g de amina NZ (hidrolizato de caseína), água desionizada adicionada para 1 litro, pH ajustado com NaOH para pH 7,5 e autoclave.

NZY Top Agar (por litro) 5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄, 5 g de extrato de levedura, 10 g de amina NZ (hidrolizato de caseína), 0,7 % (p/v) de agarose; água desionizada adicionada para 1 litro, pH ajustado com NaOH para pH 7,5 e autoclave.

Os seguintes exemplos não limitantes ilustram a invenção.

EXEMPLO 1

Mananase derivada do *Bacillus sp* (I633)

Construção de uma biblioteca genômica do *Bacillus sp*. I633 no vetor lambdaZAPExpress

O DNA genômico do *Bacillus sp*. I633 foi parcialmente digerido com a enzima de restrição *Sau3A* e fracionada no tamanho pela eletroforese em um gel de agarose a 0,7 % (SeaKem agarose, FMC, USA). Os fragmentos entre 1,5 e 10 kb no tamanho foram isolados e concentrados a uma faixa de DNA rodando-se os fragmentos de DNA retrogradamente em um gel de agarose a 1,5 % seguido pela extração dos fragmentos das fatias de gel de agarose usando-se o conjunto de extração de gel Qiaquick de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Inc., USA). Para construir uma biblioteca genômica, ca. 100 ng de DNA fracionado, purificado do acima foi ligado com 1 ug da subdivisão do vetor lambdaZAPexpress desfosforilado, clivado por BamHI (Stratagene, La Jolla CA, USA) por 24 horas a + 4° C, de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 3 ul da mistura de ligação foi empacotada diretamente usando-se um extrato de empacotamento GigaPackIII Gold (Stratagene, USA) de acordo com as instruções dos

fabricantes (Stratagene). A biblioteca genômica do fago lambdaZAPExpress foi titulada usando-se a cepa MRF- do E. coli XL1-Blue da Stratagene (La Jolla, USA). A biblioteca genômica não amplificada compreendeu de 3×10^7 unidades formadoras de placa (pfu) com um fundo de vetor de menos do que 1 %.

AVALIAÇÃO QUANTO AOS CLONES DE BETA-MANANASE PELA EXPRESSÃO FUNCIONAL EM lambdaZAPExpress

Aproximadamente 5.000 unidades formadoras de placa (pfu) da biblioteca genômica foram colocadas em placa sobre placas de NZY-agar contendo 0,1 % de AZCL-galactomanana (MegaZyme, Austrália, cat. no. I-AZGMA), usando-se o E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, USA) como um hospedeiro, seguido pela incubação das placas a 37° C por 24 horas. Os clones lambda positivos em mananase foram identificados pela formação de halos azuis de hidrólise em torno dos clones de fago positivo. Estes foram recuperados pela avaliação das placas retirando a parte central das fatias de TOP-agar contendo as placas de interesse em 500 ul de tampão SM e 20 ul de clorofórmio. Os clones lambdaZAPExpress positivos em mananase foram purificados de placa colocando-se em placa uma alíquota do estoque fago e tirado sobre placas de NZY contendo 0,1 % de AZCL-galactomanana como acima. Os clones lambda positivos em mananase, únicos foram retirados em 500 ul de tampão SM e 20 ul de clorofórmio e purificados por mais uma rodada de colocação em placa como descrito acima.

EXCISÃO *IN VIVO* DE CLONE ÚNICO DOS FAGOMÍDEOS DOS CLONES lambdaZAPExpress POSITIVOS EM MANANASE

As células XL1-Blue E. coli (Stratagene, La Jolla Ca.) foram preparadas e recolocadas em suspensão em 10 mM de $MgSO_4$ como recomendado pela Stratagene (La Jolla, USA). Alíquotas de 250 ul dos estoques de fago puro dos clones positivos em mananase foram combinadas em tubos Falcon 2059 com 200 ul de células XL1-Blue MRF' ($OD_{600} = 1,0$)

e $> 10^6$ pfu/ml do fago auxiliar ExAssist M13 (Stratagene) e as misturas foram incubadas a 37° C por 15 minutos. Três ml do caldo NZY foram adicionados a cada tubo e os tubos foram incubados a 37° C por 2,5 horas. Os tubos foram aquecidos a 65 °C por 20 minutos para matar as células de E. coli e os bacteriofagos lambda; os fagomídeos sendo resistentes ao aquecimento. Os tubos foram girados a 3000 rpm por 15 minutos para remover os escombros celulares e os sobrenadantes foram decantados em tubos Falcon 2059 limpos. As alíquotas dos sobrenadantes contendo os fagomídeos de filamento único excisados foram usados para infectar 200 ul de células XL0LR do E. coli (Stratagene, OD600 = 1,0 em MgSO₄ 10 mM) pela incubação a 37° C por 15 minutos. 350 ul de caldo NZY foi adicionado às células e os tubos foram incubados por 45 minutos a 37° C. As alíquotas das células foram colocadas em placa sobre placas de agar com LB canamicina e incubadas por 24 horas a 37° C. Cinco colônias únicas excisadas foram novamente riscadas sobre placas de agar com LB canamicina contendo 0,1 % de AZCL-galactomanana (MegaZyme, Austrália). Os clones fagomídeos positivos em mananase foram caracterizados pela formação de halos azuis de hidrólise em torno das colônias positivas. Estas foram ainda analisadas por digestões em enzimas de restrição do DNA fagomídeo isolado (conjunto QiaSpin, Qiagen, USA) com EcoRI, PstI, EcoRI-PstI e HindIII seguido por eletroforese em gel de agarose.

ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÓIDEO

A sequência de nucleotídeo do clone genômico de beta-1,4-mananase pBXM3 foi determinado a partir de ambos os filamentos pelo método de terminação de cadeia de didesóxi (Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 a 5467) usando-se 500 ng de padrão purificado Qiagen (Qiagen, USA) o conjunto de sequenciamento de ciclo de terminal de Taq desóxi (Perkin-Elmer, USA), terminadores fluorescentemente rotulados e 5 pmol de cada um dos

iniciadores poliligadores pBK-CMV (Stratagene, USA) ou iniciadores oligonucleotídicos sintéticos. A análise dos dados de sequência foi realizada de acordo com Devereux *et al.*, 1984 (Devereux, J., Haeberli, P., e Smithies, O. (1994) Nucleic Acids Res. 12, 387 a 395).

5 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA

Um alinhamento múltiplo de sequência da família da glicoidrolase 5-beta-1,4-mananase do *Bacillus sp.* I633 da presente invenção (isto é, a SEQ ID NO: 2), *bacillus circulans* (GenBank/EMBL acesso nº 066185), *Vibrio sp.* (acesso nº 069347), *Streptomyces lividans* (acesso nº P51529) e *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (acesso nº P22533). O alinhamento múltiplo de sequência foi criado usando-se o programa PileUp da GCG Wisconsin software package, versão 8.1; com penalidade de criação gap de 3,00 e penalidade de extensão gap de 0,10.

SIMILARIDADES DE SEQUÊNCIA

15 A sequência de aminoácido deduzida da família 5-beta-1,4-mananase da presente invenção clonada a partir do *Bacillus sp.* I633 apresenta 75 % de similaridade e 60,1 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase do *Bacillus circulans* (GenBank/EMBL acesso nº 066185), 64,4 % de similaridade e 44,6 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Vibrio*
 20 *sp.* (acesso nº 069347), 63 % de similaridade e 43,2 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Streptomyces lividans* (acesso nº P51529), 52,5 % de similaridade e 34,4 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase do *Caldicellulosiruptor* (acesso nº P2253). As sequências foram alinhadas usando-se o programa GAP da GCG Wisconsin software package, versão 8.1;
 25 com penalidade de criação gap de 3,00 e penalidade de extensão gap de 0,10.

CLONAGEM DO GENE DE MANANASE DO *BACILLUS sp.* (I633)

A. SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA ENZIMA DE MANANASE DE NÚCLEO CATALÍTICO NO *B. SUBTILIS*:

A sequência de DNA que codifica a mananase da invenção foi

amplificada por PCR usando-se o conjunto de iniciador de PCR que consiste dos dois oligo nucleotídeos seguintes:

BXM2.superior.SacII

5'-GTT GAG AAA GCG GCC GCC TTT TTT CTA TTC TAC AAT CAC ATT ATC-3'

5 BXM2.núcleo.inferior.NotI

5'-GAC GAC GTA CAA GCG GCC GCT CAC TAC GGA GAA GTT CCT CCA TCA G-3'

Os sítios de restrição SacII e NotI estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *Bacillus sp.* I633 como
10 descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se
Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) de acordo com as instruções dos
fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de
Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de
gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq
15 polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador
térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1
minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de
ciclo de desnaturação a 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1
20 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Alíquotas de cinco µl do produto
da amplificação foram analisados por eletroforese em 0,7 % de géis de
agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de
DNA de 1,0 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene.

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

25 Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados
como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação
de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções dos
fabricantes. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH
8,5. 5 µg de pMOL944 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR

foram digeridos com SacII e NotI, submetidos a eletroforese em géis de agarose a 0,8 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque CTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi depois ligado ao pMOL944 digerido e purificado por SacII-NotI. A ligação foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de T4 DNA ligase e tampão T4 ligase (Boehringer Mannheim, Alemanha).

A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis* PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina-agar. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB748. O clone MB748 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foram usadas para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase (que corresponde às posições 91 a 990 na sequência de DNA anexa SEQ ID NO: 1 e às posições de 31 a 330 na sequência de proteína anexa SEQ ID NO: 2) com o códon de parada introduzido substituindo o resíduo de aminoácido nº 331 que corresponde às posições de pares de base de 1201 a 1203 na SEQ ID NO: 1.

B. SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE MANANASE MADURA DE COMPRIMENTO COMPLETO NO *B. SUBTILIS*.

A sequência de DNA que codifica a sequência de DNA da invenção foi amplificada por PCR usando-se o conjunto de iniciador de PCR que consiste destes dois oligo nucleotídeos:

BXM2.superior.SacII

5 5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AAT TCC GGA TTT TAT GTA AGC GG-3'

BXM2.inferior.NotI

5'-GTT GAG AAA GCG GCC GCC TTT TTT CTA TTC TAC AAT CAC ATT ATC-3'

Os sítios de restrição SacII e NotI estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *Bacillus sp.* (I633) como
10 descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se
Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) de acordo com as instruções dos
fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de
Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de
gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq
15 polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador
térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1
minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de
ciclo de desnaturação a 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1
20 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Alíquotas de cinco µl do produto
da amplificação foram analisados por eletroforese em 0,7 % de géis de
agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de
DNA de 1,5 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene.

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

25 Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados
como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação
de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções dos
fabricantes. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH
8,5. 5 µg de pMOL944 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR

foram digeridos com SacII e NotI, submetidos a eletroforese em géis de agarose a 0,8 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque GTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi depois ligado ao pMOL944 purificado e digerido por SacII-NotI. A ligação foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de T4 DNA ligase e tampão T4 ligase (Boehringer Mannheim, Alemanha).

10 A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis* PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina-agar. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

15 Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB643. O clone MB643 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foi usado para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase posição de 317 a 1693 na SEQ ID NO: 1 e 33 a 490 na SEQ ID NO: 2.

25 O clone MB643 foi cultivado em 25 x 200 ml de meio BPX com 10 µg/ml de canamicina em frascos de agitação com duas placas de deflexão de 500 ml por 5 dias a 37° C a 300 rpm.

 A sequência de DNA que codifica o domínio do terminal C de função desconhecida do resíduo de aminoácido nº 341 até o resíduo de

aminoácido nº 490 apresenta alta homologia a um domínio denominado X18 de uma mananase conhecida. Este X18 é encontrado no EMBL entrada AB007123 de: Yoshida S., Sako Y., Uchida A.: “Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for an enzyme from

5 *Bacillus circulans* K-1 that degrades guar gum” em *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 514 a 520 (1998). Este gene codifica o peptídeo, de sinal (aa 1 a 34), o núcleo catalítico de uma família de 5 mananase (aa 35 a 335), um ligador (aa 336 a 362) e finalmente o domínio X18 de função não conhecida (aa 363 a 516).

10 Este domínio X18 também é encontrado na beta-mananase do *Bacillus subtilis* no banco de dados de proteína Suiço entrada P55278 que divulga um gene que codifica um peptídeo de sinal (aa 1 a 26), um núcleo catalítico da família de 26 mananases (aa 27 a 360) e este domínio de proteína X18 de função não conhecida (aa 361 a 513); (Cloning and

15 sequencing of beta-mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39, Mendoza NS; Arai M; Sugimoto K; Ueda M; Kawaguchi T; Joson LM, Phillippines. In *Biochimica Et Biophysica Acta* Vol. 1243, Nº 3 pp. 552 a 554 (1995)).

EXEMPLO 2

expressão, purificação e caracterização da mananase do *Bacillus sp.* I633

20 O clone MB748 obtido como descrito no Exemplo 1 e sob o título Materiais e Métodos foi cultivado em 25 x 200 ml de meio de BPX com 10 µg/ml de canamicina em frascos de agitação com dois defletores de 500 ml por cinco dias a 37° C a 300 rpm.

4500 ml do fluído de cultura do frasco de agitação do clone

25 MB748 foi coletado e o pH foi ajustado para 5,6. 100 ml do agente catiônico (10 % C521) e 180 ml de agente aniônico (A130) foram adicionados durante a agitação para floculação. O material floculado foi separado por centrifugação usando-se uma centrífuga Sorval RC 3B a 9000 rpm por 20 minutos a 6° C. O sobrenadante foi clarificado usando-se filtros de vidro

Whatman GF/D e C e finalmente concentrado em um filtron com um corte de 10 kDa.

700 ml deste concentrado foi ajustado ao pH 7,5 usando-se hidróxido de sódio. A solução clara foi aplicada à cromatografia de troca aniônica usando-se uma coluna Q-Sepharose de 1000 ml equilibrada com 50 mmols de Tris pH 7,5. A atividade de mananase ligada foi eluída em 1100 ml usando-se um gradiente de cloreto de sódio. Este foi concentrado a 440 ml usando-se uma membrana Filtron. Para se obter a mananase altamente pura, o concentrado foi passado em uma coluna Superdex 200 equilibrada com acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0.

A enzima pura deu uma faixa única no SDS-PAGE com um peso molecular de 34 kDa.

CINÉTICA DE ESTADO FIXO USANDO-SE GOMA DE ALFARROBA:

O teste foi realizado usando-se quantidades diferentes do substrato de goma de alfarroba, incubando-se por 20 minutos a 40° C no pH 10 em tampão de glicina 0,1 M, seguido pela determinação da formação de açúcares redutores. A glicose foi usada como padrão para o cálculo da formação micromolar de açúcar redutor durante o estado fixo.

O seguinte dado foi obtido para a mananase altamente purificada da invenção:

Kcat de 467 por segundo com um desvio padrão de 13;

KM de 0,7 com um desvio padrão de 0,07.

O programa de computador grafit por Leatherbarrow da Erithacus Software U. K. foi usado para os cálculos. O açúcar redutor foi determinado usando-se o método PHBAH (Lever, M. (1972), A new reaction for colormetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. 47, 273 a 279.)

A seguinte sequência de terminal N da proteína purificada foi determinada: ANSGFYVSGTTLYDANG.

Estabilidade: a mananase foi completamente estável entre o pH 6,0 e 11 após a incubação por dois dias na temperatura ambiente. A enzima precipitou em pH baixo.

O perfil de atividade de pH mostra que a enzima é mais do que 60 % ativa entre o pH 7,5 e o pH 10.

O ótimo de temperatura foi descoberto ser 50° C no pH 10.

A calorimetria de varredura diferencial DSC deu 66° C como o ponto de fusão no pH 6,0 em tampão de acetato de sódio indicando que esta enzima de mananase é termoestável.

Propriedades imunológicas: o soro monoespecífico policlonal de coelho foi incitado contra a mananase clonada altamente purificada usando-se técnicas convencionais na companhia Dinamarquesa DAKO. O soro formou um bom e único precipitado em géis de agarose com a mananase bruta não purificada da invenção.

EXEMPLO 3

Uso da enzima do exemplo 2 em detergentes

Usando-se detergentes comerciais ao invés de tampão e incubação por 20 minutos a 40° C com 0,2 % de AZCL-galactomanana (Megazyme, Austrália) do grau de alfarroba como descrito acima seguido pela determinação da formação de cor azul, a enzima obtida como descrito no Exemplo 2 foi ativa no detergente em pó Europeu Ariel Futur com 60 % de atividade relativa, no detergente líquido Europeu Ariel Futur com 80 % de atividade relativa, no pó US Tide com 45 % de atividade relativa e no detergente líquido US Tide com 37 % de atividade relativa em relação à atividade relativa em tampão de glicina. Nestes testes, a concentração de detergente foi como recomendada nos pacotes de detergente comercial e a água de lavagem foi água de torneira tendo 18 graus de dureza Alemã sob condições Européias (Ariel Futur) e 9 graus sob as condições US (US Tide).

EXEMPLO 4

Construção e expressão de proteína de fusão entre a mananase do *Bacillus sp.* I633 (exemplos 1 E 2) e um domínio de ligação de celulose (cbd)

O CBD que codifica a sequência de DNA do gene CipB do *Clostridium thermocellum* da cepa YS (Poole DM; Morag E; Lamed R; Bayer EA; Hazlewood GP; Gilbert HJ (1992) Identification of the cellulose-binding domain of the cellulosome subunit S1 from *Clostridium thermocellum* YS, Fems Microbiology Letters Vol. 78, Nº 2-3 pp. 181 a 186 foi previamente introduzido em um vetor pMOL 1578. O DNA cromossômico que codifica o CBD pode ser obtido como descrito em Poole DM; Morag E; Lamed R; Bayer EA; Hazlewood GP; Gilbert HJ (1992) Identification of the cellulose-binding domain of the cellulosome subunit S1 from *Clostridium thermocellum* YS, Fems Microbiology Letters Vol. 78, Nº 2-3 pp. 181 a 186. Uma amostra de DNA que codifica o CBD foi usada como padrão em PCR e o CBD foi clonado em um plasmídeo pMB993 apropriado com base no vetor pMOL944.

O vetor pMB993 contém o CBD CipB com um ligador peptídico precedendo o CBD. O ligador consiste da seguinte sequência de peptídeo ASPEPTPEPT e está diretamente seguida pelo CBD CipB. Os aminoácidos AS são derivados da sequência de DNA que constitui o sítio de Restrição de Endonuclease NheI, que a seguir é usado par clonar a mananase da invenção.

Mananase.Superior.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AAT TCC GGA TTT TAT GTA AGC GG-3'

Mananase.inferior.NheI

25 5'-CAT CAT GCT AGC TGT AAA AAC GGT GCT TAA TCT CG-3'

Os sítios de restrição NheI e SacII estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *Bacillus sp.* (I633) como descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) de acordo com as instruções dos

fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

- 5 As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1 minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de ciclo de desnaturação à 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Alíquotas de cinco µl do produto da amplificação foram analisadas por eletroforese em 0,7 % de géis de agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de DNA de 0,9 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene.

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

- 15 Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. 5 µg de pMB993 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR foram digeridos com SacII e NheI, submetidos a eletroforese em géis de agarose a 0,7 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque GTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi depois ligado ao pMB993 purificado e digerido por SacII-NheI. A ligação foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de tampão T4 DNA ligase e T4 ligase (Boehringer Mannheim, Alemanha).

A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis* PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa

sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina-agar. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

5 Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB1014. O clone MB1014 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foi usado para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de
10 acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase-ligador-cbd como representado na SEQ ID NO: 3 e na sequência de proteína anexa SEQ ID NO: 4.

15 Assim, a construção final contém os seguintes elementos de expressão relevante (amyL-promotor)-(amyL-peptídeo de sinal)-mananase-ligador-CBD.

EXPRESSÃO E DETECÇÃO DE PROTEÍNA DE FUSÃO DE MANANASE-CBD

20 A MB1014 foi incubada por 20 horas em meio TY a 37° C e 250 rpm. 1 ml do sobrenadante isento de célula foi misturado com 200 µl de Avicel 10 % (Merck, Darmstadt, Alemanha) em Millipore H2O. A mistura foi deixada por ½ hora em incubação a 0° C após esta ligação da proteína de fusão BXM2-Ligador-CBD ao Avicel, o Avicel com a proteína ligada foi
25 centrifugado 5 minutos a 5000g. O grão foi recolocado em suspensão em 100 µl de tampão SDS-PAGE, ebulido a 95° C por 5 minutos, centrifugado a 5000g por 5 minutos e 25 µl foi carregado em um gel SDS-PAGE NOVEX com 4 a 20 % de Laemmli Tris-glicina (Novex USA). As amostras foram submetidas à eletroforese em uma mini célula X cell® (NOVEX, USA) como

recomendado pelo fabricante, todo o manuseio subsequente dos géis incluindo o tingimento com comassie, a retirada de pigmento e a secagem foram realizados como descrito pelo fabricante.

- 5 O aparecimento de uma faixa de proteína de aproximadamente 53 kDa, verificou a expressão no *B. subtilis* da fusão de comprimento completo de Mananase-Ligador-CBD codificada no plasmídeo pMB1014.

EXEMPLO 5

Mananase derivada do *Bacillus agaradhaerens*

Clonagem do gene de mananase do *Bacillus agaradhaerens*

- 10 Preparação do dna genômico

A cepa do *Bacillus agaradhaerens* NCIMD 40482 foi propagada em meio líquido como descrito na WO 94/01532. Após 16 horas de incubação a 30° C e 300 rpm, as células foram colhidas e o DNA genômico isolado pelo método descrito por Pitcher *et al.*, (Pitcher, D. G.,
15 Saunders, N. A., Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol., 8, 151 a 156).

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA

- O DNA genômico foi parcialmente digerido com a enzima de restrição Sau3A e fracionado no tamanho pela eletroforese em um gel de
20 agarose a 0,7 %. Os fragmentos entre 2 e 7 kb no tamanho foram isolados por eletroforese sobre DEAE-papel de celulose (Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1991) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem., 112, 295 a 298).

- 25 Os fragmentos de DNA isolados foram ligados ao DNA plasmídico pSJ1678 digerido por BamHI e a mistura de ligação foi usada para transformar o *E. coli* SJ2.

IDENTIFICAÇÃO DE CLONES POSITIVOS

Uma biblioteca de DNA no *E. coli*, construída como descrito

acima foi avaliada em placas de LB agar contendo 0,2 % de AZCL-galactomanana (Megazyme) e 9 µg/ml de Cloranfenico e incubadas durante a noite a 37° C. Os clones que expressam a atividade de mananase apareceram com halos de difusão azuis. O DNA plasmídeo de um destes clones foi isolado por Qiagen plasmid spin preps em 1 ml de caldo de cultura da noite anterior (as células incubadas a 37° C em TY com 9 µg/ml de Cloramfenicol e agitação a 250 rpm).

Este clone (MB525) foi ainda caracterizado pelo sequenciamento de DNA do fragmento de DNA Sau3A clonado. O sequenciamento de DNA foi realizado por *primerwalking*, usando-se o conjunto de sequenciamento de ciclo de terminal desóxi Taq (Perkin-Elmer, USA), terminadores fluorescentemente rotulados e oligonucleotídeos apropriados como iniciadores.

A análise dos dados de sequência foi realizada de acordo com Devereux *et al.*, (1984) Nucleic Acids Res. 12, 387 a 395. A sequência que codifica a mananase é apresentada na SEQ ID NO: 5. A sequência de proteína derivada é apresentada na SEQ ID NO: 6.

SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DA MANANASE DO *b. AGARADHAERENS* EM *B. SUBTILIS*

A mananase que codifica a sequência de DNA da invenção foi amplificada por PCR usando-se o conjunto de iniciadores de PCR que consiste destes dois oligo nucleotídeos:

Mananase.superior.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA GCA AGT ACA GGC TTT TAT GTT GAT GG-3'

Mananase.inferior.NotI

5'-GAC GAC GTA CAA GCG GCC GCG CTA TTT CCC TAA CAT GAT GAT ATT TTC G-3'

Os sítios de restrição SacII e NotII estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *B. agaradherens* NCIMB

40482 como descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Eliner) de acordo com as instruções dos fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1 minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de ciclo de desnaturação a 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Alíquotas de cinco µl do produto da amplificação foram analisadas por eletroforese em 0,7 % de géis de agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de DNA de 1,4 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene.

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. 5 µg de pMOL944 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR foram digeridos com SacII e NotI, submetidos a eletroforese em géis de agarose a 0,8 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque GTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi depois ligado ao pMOL944 purificado e digerido por SacII-NotI. A ligação foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de tampão T4 DNA ligase e T4 ligase (Boehringer Mannheim,

Alemanha).

A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis* PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB594. O clone MB594 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foi usado para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase, isto é as posições de 94 a 1404 da SEQ ID NO: 7 anexa. A proteína madura derivada é apresentada na SEQ ID NO: 8. Parecerá que o final 3' da mananase codificado pela sequência da SEQ ID NO: 5 foi mudado para aquele apresentado na SEQ ID NO: 7 devido ao planejamento do iniciador inferior usado na PCR. A sequência de aminoácido resultante é apresentada na SEQ ID NO: 8 está evidente que o término C da SEQ ID NO: 6 (SHHVREIGVQFSAADNSSGQTALYVDNVTLR) está trocado pelo término C da SEQ ID NO: 8 (IIMLGK).

EXEMPLO 6

Expressão, purificação e caracterização da mananase do *Bacillus agaradhaerens*

O clone MB594 obtido como descrito no Exemplo 5 foi cultivado em 25 x 200 ml de meio de BPX com 10 µg/ml de canamicina em frascos de agitação com dois defletores de 500 ml por cinco dias a 37° C a

300 rpm.

6500 ml do fluido de cultura do frasco de agitação do clone MB594 (lote #9813) foi coletado e o pH foi ajustado para 5,5. 146 ml do agente catiônico (C521) e 292 ml de agente aniônico (A130) foram adicionados durante a agitação para floculação. O material floculado foi separado por centrifugação usando-se uma centrífuga Sorval RC 3B a 9000 rpm por 20 minutos a 6° C. O sobrenadante foi clarificado usando-se filtros de vidro Whatman GF/D e C e finalmente concentrado em um filtron com um corte de 10 kDa.

750 ml deste concentrado foram ajustados ao pH 7,5 usando-se hidróxido de sódio. A solução clara foi aplicada à cromatografia de troca aniônica usando-se uma coluna Q-Sepharose de 900 ml equilibrada com 50 mmoles de Tris pH 7,5. A atividade de mananase ligada foi eluída usando-se um gradiente de cloreto de sódio.

A enzima pura deu uma faixa única no SDS-PAGE com um peso molecular de 38 kDa.

A sequência de aminoácido da enzima de mananase, isto é a sequência traduzida de DNA é apresentada na SEQ ID NO: 6.

Determinação das constantes cinéticas:

Substrato: goma de alfarroba (alfarroba) e análise de açúcar redutor (PHBAH). Goma de alfarroba da Sigma (G-0753).

Determinação cinética usando-se diferentes concentrações de goma de alfarroba e incubação durante 20 minutos a 40° C no pH 10 deu

Kcat: 467 por segundo.

K_m: 0,08 grama por litro.

Pm: 38 kDa

PI (ponto isoelétrico): 4,2

A temperatura ótima da mananase foi descoberta ser 60° C.

O perfil de atividade em pH apresentou atividade máxima

entre o pH 8 e 10.

A calorimetria de varredura diferencial DSC deu 77° C como o ponto de fusão no pH 7,5 em tampão Tris indicando que esta enzima é muito termoestável.

- 5 A compatibilidade a detergente usando-se 0,2 % de AZCL-Galactomanana de alfarroba como substrato e incubação como descrito acima a 40° C apresenta excelente compatibilidade com detergentes líquido convencionais e boa compatibilidade com detergentes em pó convencionais.

EXEMPLO 7

- 10 Uso da enzima da invenção em detergentes

A enzima purificada obtida como descrito no Exemplo 6 (lote #9813) apresentou desempenho de limpeza melhorado quando testada em um nível de 1 ppm em um teste de minilavagem usando-se um detergente líquido comercial convencional. O teste foi realizado sob as condições de lavagem

15 Norte Americanas convencionais.

EXEMPLO 8

Mananase derivada do *Bacillus sp.* AAI12

Construção de uma biblioteca genômica do *Bacillus sp.* AAI12

- 20 O DNA genômico do *Bacillus sp.* foi parcialmente digerido com a enzima de restrição *Sau3A* e fracionada no tamanho pela eletroforese em um gel de agarose a 0,7 % (SeaKem agarose, FMC, USA). Os fragmentos entre 1,5 e 10 kb no tamanho foram isolados e concentrados a uma faixa de DNA rodando-se os fragmentos de DNA retrogradamente em um gel de agarose a 1,5 % seguido pela extração dos fragmentos das fatias de gel de
- 25 agarose usando-se o conjunto de extração de gel Qiaquick de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Inc., USA). Para construir uma biblioteca genômica, ca. 100 ng de DNA fracionado, purificado do acima foi ligado com 1 ug da subdivisão do vetor lambdaZAPexpress desfosforilado, clivado por BamHI (Stratagene, La Jolla CA, USA) por 24 horas a + 4° C, de acordo

com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 3 μ l da mistura de ligação foi empacotada diretamente usando-se um extrato de empacotamento GigaPackIII Gold (Stratagene, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes (Stratagene). A biblioteca genômica do fago lambdaZAPExpress
 5 foi titulada usando-se a cepa MRF- do E. coli XL1-Blue da Stratagene (La Jolla, USA). A biblioteca genômica não amplificada compreendeu de $7,8 \times 10^7$ unidades formadoras de placa (pfu) com um fundo de vetor de menos do que 1 %.

10 AVALIAÇÃO QUANTO AOS CLONES DE BETA-MANANASE PELA EXPRESSÃO FUNCIONAL EM lambdaZAPExpress

Aproximadamente 5.000 unidades formadoras de placa (pfu) da biblioteca genômica foram colocadas em placa sobre placas de NZY-agar contendo 0,1 % de AZCL-galactomanana (MegaZyme, Austrália, cat. no. I-AZGMA), usando-se o E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, USA) como um
 15 hospedeiro, seguido pela incubação das placas a 37° C por 24 horas. Os clones lambda positivos em mananase foram identificados pela formação de halos azuis de hidrólise em torno dos clones de fago positivo. Estes foram recuperados das placas de avaliação retirando a parte central das fatias de TOP-agar contendo as placas de interesse em 500 μ l de tampão SM e 20 μ l de
 20 clorofórmio. Os clones lambdaZAPExpress positivos em mananase foram purificados de placa colocando-se em placa uma alíquota do estoque fago e tirado sobre placas de NZY contendo 0,1 % de AZCL-galactomanana como acima. Os clones lambda positivos em mananase, únicos foram retirados em 500 μ l de tampão SM e 20 μ l de clorofórmio e purificados por mais uma
 25 rodada de colocação em placa como descrito acima.

EXCISÃO *IN VIVO* DE CLONE ÚNICO DOS FAGOMÍDEOS DOS CLONES lambdaZAPExpress POSITIVOS EM MANANASE

As células XL1-Blue E. coli (Stratagene, La Jolla Ca.) foram preparadas e recolocadas em suspensão em 10 nM de $MgSO_4$ como

recomendado pela Stratagene (La Jolla, USA). Aliquotas de 250 μ l dos estoques de fago puro dos clones positivos em mananase foram combinadas em tubos Falcon 2059 com 200 μ l de células XL1-Blue MRF' (OD600 = 1,0) e $> 10^6$ pfu/ml do fago auxiliar ExAssist M13 (Stratagene) e as misturas

5 foram incubadas a 37° C por 15 minutos. Três ml do caldo NZY foram adicionados a cada tubo e os tubos foram incubados a 37° C por 2,5 horas. Os tubos foram aquecidos a 65 °C por 20 minutos para matar as células de *E. coli* e os bacteriófagos lambda; os fagomídeos sendo resistentes ao aquecimento. Os tubos foram girados a 3000 rpm por 15 minutos para

10 remover os escombros celulares e os sobrenadantes foram decantados em tubos Falcon 2059 limpos. As alíquotas dos sobrenadantes contendo os fagomídeos de filamento único excisados foram usados para infectar 200 μ l de células XL0LR do *E. coli* (Stratagene, OD600 = 1,0 em $MgSO_4$ 10 mM) pela incubação a 37° C por 15 minutos. 350 μ l de caldo NZY foram

15 adicionados às células e os tubos foram incubados por 45 minutos a 37° C. As alíquotas das células foram colocadas em placa sobre placas de agar com LB canamicina e incubadas por 24 horas a 37° C. Cinco colônias únicas excisadas foram novamente riscadas sobre placas de agar com LB canamicina contendo 0,1 % de AZCL-galactomanana (MegaZyme,

20 Austrália). Os clones fagomídeos positivos em mananase foram caracterizados pela formação de halos azuis de hidrólise em torno das colônias positivas. Estas foram ainda analisadas por digestões em enzimas de restrição do DNA fagomídeo isolado (conjunto QiaSpin, Qiagen, USA) com EcoRI, PstI, EcoRI-PstI e HindIII seguido por eletroforese em gel de agarose.

25 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLETOTÍDEO

A sequência de nucleotídeo do clone genômico de beta-1,4-mananase pBXM1 foi determinado a partir de ambos os filamentos pelo método de terminação de cadeia de didesóxi (Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 a 5467)

usando-se 500 ng de padrão purificado Qiagen (Qiagen, USA) o conjunto de sequenciamento de ciclo de terminal de Taq desóxi (Perkin-Elmer, USA), terminadores fluorescentemente rotulados e 5 pmol de cada um dos iniciadores poliligadores pBK-CMV (Stratagene, USA) ou iniciadores oligonucleotídicos sintéticos. A análise dos dados de sequência foi realizada de acordo com Devereux *et al.*, 1984 (Devereux, J., Haeberli, P., e Smithies, O. (1994) Nucleic Acids Res. 12, 387 a 395).

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA

Um alinhamento múltiplo de sequência da família da glicoidrolase 26 beta-1,4-mananases do *Bacillus sp.* AAI12 da presente invenção (isto é, a SEQ ID NO: 10), *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (GenBank/EMBL acesso nº P77847), *Dictyoglomus thermophilum* (acesso nº O30654), *Rhodothermus marinus* (acesso nº P49425), *Piromyces sp.* codificado pela ManA (acesso nº P55296), *Bacillus sp.* (acesso nº P91007), *Bacillus subtilis* (acesso nº O05512) e *Pseudomonas fluorescens* (acesso nº P49424) foi criado usando-se o programa PileUp da GCG Wisconsin software package, versão 8.1 (ver acima); com penalidade de criação gap de 3,00 e penalidade de extensão gap de 0,10.

SIMILARIDADES DE SEQUÊNCIA

A sequência de aminoácido deduzida da família 26 beta-1,4-mananase da invenção clonada a partir do *Bacillus sp.* AAI12 apresenta 45 % de similaridade de sequência e 19,8 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase do *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (GenBank/EMBL acesso nº P77847), 49 % de similaridade e 25,1 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Dictyoglomus thermophilum* (acesso nº O30654), 48,2 % de similaridade e 26,8 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Rhodothermus marinus* (acesso nº P49425), 46 % de similaridade e 19,5 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase codificada por ManA do *Piromyces sp.* (acesso nº P55296), 47,2 % de similaridade e 22 % de identidade à beta-1,4-

mananase do *Bacillus sp.* (acesso nº P91007), 52,4 % de similaridade e 27,5 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase do *Bacillus subtilis* (acesso nº O05512) e 60,6 % de similaridade e 37,4 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Pseudomonas fluorescens* (acesso nº P49424). As

5 sequências foram alinhadas usando-se o programa GAP da GCG Wisconsin software package, versão 8.1; com penalidade de criação gap de 3,00 e penalidade de extensão gap de 0,10.

CLONAGEM DO GENE DE MANANASE DO *BACILLUS sp.* (AAI12)

A. SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE MANANASE NO *B. SUBTILIS*:

10 A sequência de DNA que codifica a mananase da invenção foi amplificada por PCR usando-se o conjunto de iniciador de PCR que consiste destes dois oligo nucleotídeos:

BXM1.superior.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA TTT TCT GGA AGC GTT TCA GC-3'

15 BXM1.inferior.NotI

5'-CAG CAG TAG CGG CCG CCA CTT CCT GCT GGT ACA TAT GC-3'

Os sítios de restrição SacII e NotI estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *Bacillus sp.* AAI12 como descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se

20 Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) de acordo com as instruções dos fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

25 As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1 minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de ciclo de desnaturação a 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Aliquotas de cinco µl do produto

da amplificação foram analisados por eletroforese em 0,7 % de géis de agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de DNA de 1,0 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene.

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

5 Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. 5 µg de pMOL944 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR
10 foram digeridos com SacII e NotI, submetidos a eletroforese em géis de agarose a 0,8 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque GTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi
15 depois ligado ao pMOL944 digerido e purificado por SacII-NotI. A ligação foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de T4 DNA ligase e tampão T4 ligase (Boehringer Mannheim, Alemanha).

 A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis*
20 PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina-agar. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

25 Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB747. O clone MB747 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foram usadas para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de

acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase na SEQ ID NO: 9.

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANANASE 5 DO *BACILLUS* *sp.* AAI12

O clone MB747 obtido como descrito acima foi cultivado em 25 x 200 ml de meio de BPX com 10 µg/ml de canamicina em frascos de agitação com dois defletores de 500 ml por cinco dias a 37° C a 300 rpm.

- 4100 ml do fluido de cultura do frasco de agitação do clone
10 MB747 foram coletados e o pH foi ajustado para 7,0 e EDTA foi adicionado para uma concentração final de 2 mM. 185 ml do agente catiônico (10 % C521) e 370 ml de agente aniônico (A130) foram adicionados durante a agitação para floculação. O material floculado foi separado por centrifugação usando-se uma centrífuga Sorval RC 3B a 9000 rpm por 20 minutos a 6° C.
15 O sobrenadante foi clarificado usando-se filtros de vidro Whatman GF/D e C e finalmente concentrado em um filtron com um corte de 10 kDa.

- 1500 ml deste concentrado foi ajustado ao pH 7,5 usando-se hidróxido de sódio. A solução clara foi aplicada à cromatografia de troca aniônica usando-se uma coluna Q-Sepharose de 1000 ml equilibrada com 25
20 mmoles de Tris pH 7,5. A atividade de mananase ligada foi eluída em 1100 ml usando-se um gradiente de cloreto de sódio. Este foi concentrado a 440 ml usando-se uma membrana Filtron. Para se obter mananase altamente pura o concentrado foi passado em uma coluna Superdex equilibrada com acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0.

- 25 A enzima pura deu uma faixa única no SDS-PAGE com um peso molecular de 62 kDa.

A sequência de aminoácido da enzima de mananase, isto é a sequência traduzida de DNA é apresentada na SEQ ID NO: 10.

A seguinte sequência de terminal N foi determinada:

FSGSVSASGQELKMTDQN.

pI (ponto isoelétrico): 4,5

A calorimetria de varredura diferencial DSC deu 64° C como o ponto de fusão no pH 6,0 em tampão de acetato de sódio indicando que esta
5 enzima de mananase é termoestável.

Foi descoberto que a atividade catalítica aumenta com a força iônica indicando que a atividade específica da enzima pode ser aumentada usando-se tampão de sal de fosfato com alta força iônica.

A atividade de mananase do polipeptídeo da invenção é
10 inibida pelos íons cálcio.

Propriedades imunológicas: o soro monoespecífico policlonal de coelho foi incitado contra a mananase altamente purificada usando-se técnicas convencionais na companhia Dinamarquesa DAKO. O soro formou um bom e único precipitado em géis de agarose com a mananase bruta da
15 invenção.

EXEMPLO 9

Uso da enzima do exemplo 8 em detergentes

Usando-se detergentes comerciais ao invés de tampão e incubação por 20 minutos a 40° C com 0,2 % de AZCL-galactomanana
20 (Megazyne, Austrália) do grau de alfarroba como descrito acima seguido pela determinação da formação de cor azul, a enzima obtida como descrito no Exemplo 8 foi ativa no detergente em pó Europeu Ariel Futur com 132 % de atividade relativa, no pó US Tide com 108 % de atividade relativa e no detergente líquido US Tide com 86 % de atividade relativa em relação à
25 atividade medida em tampão de glicina. Nestes testes, a concentração de detergente foi como recomendada nos pacotes de detergente comercial e a água de lavagem foi água de torneira tendo 18 graus de dureza Alemã sob condições Européias (Ariel Futur) e 9 graus sob as condições US (US Tide).

EXEMPLO 10

Mananase derivada do *Bacillus halodurans*

Construção de uma biblioteca genômica do *Bacillus halodurans* no vetor pSJ1678

O DNA genômico do *Bacillus halodurans* foi parcialmente
 5 digerido com a enzima de restrição *Sau3A* e fracionada no tamanho pela
 eletroforese em um gel de agarose a 0,7 % (SeaKem agarose, FMC, USA).
 Os fragmentos de DNA entre 2 e 10 kb no tamanho foram isolados por
 eletroforese sobre DEAE-papel de celulose (Dretzen, G., Bellard, M.,
 Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1981) A reliable method for the recovery of
 10 DNA fragments from agarose e acrilamide gels, Anal. Biochem., 112, 295 a
 298). Os fragmentos de DNA foram ligados ao DNA plasmídico pSJ1678
 digerido por *BamHI* e a mistura de ligação foi usada para transformar o *E.*
coli SJ2.

15 AVALIAÇÃO QUANTO AOS CLONES DE BETA-MANANASE PELA EXPRESSÃO FUNCIONAL EM *ESCHERICHIA COLI*

Aproximadamente 10.000 unidades formadoras de colônia
 (cfu) da biblioteca genômica foram colocadas em placa sobre placas de LB-
 agar contendo 9 µg/ml de cloranfenicol e 0,1 % de AZCL-galactomanana
 (MegaZyme, Austrália, cat. no. I-AZGMA), usando-se o *E. coli* SJ2 como um
 20 hospedeiro, seguido pela incubação das placas a 37° C por 24 horas. As
 colônias de *E. coli* positivas em mananase foram identificados pela formação
 de halos azuis de hidrólise em torno dos clones plasmídicos positivos. Os
 clones positivos em mananase no pSJ1678 foram purificados na colônia
 riscando-se novamente as colônias isoladas sobre placas de LB contendo 9
 25 µg/ml de cloranfenicol e 0,1 % de AZCL-galactomanana como acima. Os
 clones plasmídicos positivos em mananase, únicos foram inoculados em 5 ml
 de meio LB contendo 9 µg/ml de cloranfenicol, para a purificação do DNA
 plasmídico.

ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLETOTÍDEO

A sequência de nucleotídeo do clone genômico de beta-1,4-mananase pBXM5 foi determinada a partir de ambos os filamentos pelo método de terminação de cadeia de didesóxi (Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 a 5467) usando-se 500 ng de padrão purificado Qiagen (Qiagen, USA) o conjunto de sequenciamento de ciclo de terminal de Taq desóxi (Perkin-Elmer, USA), terminadores fluorescentemente rotulados e 5 pmol de cada um dos iniciadores poliligadores pBK-CMV (Stratagene, USA) ou iniciadores oligonucleotídicos sintéticos. A análise dos dados de sequência foi realizada de acordo com Devereux *et al.*, 1984 (Devereux, J., Haeberli, P., e Smithies, O. (1994) Nucleic Acids Res. 12, 387 a 395).

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA

Um alinhamento múltiplo de sequência da família da glicoidrolase 5-beta-1,4-mananase do *Bacillus halodurans* da presente invenção (isto é, a SEQ ID NO: 12), *bacillus circulans* (GenBank/EMBL acesso nº 066185), *Vibrio sp.* (acesso nº 069347), *Streptomyces lividans* (acesso nº P51529) e *Caldicelulosiruptor saccharolyticus* (acesso nº P22533). O alinhamento múltiplo de sequência foi criado usando-se o programa PileUp da GCG Wisconsin software package, versão 8.1; com penalidade de criação gap de 3,00 e penalidade de extensão gap de 0,10.

SIMILARIDADES DE SEQUÊNCIA

A sequência de aminoácido deduzida da família 5-beta-1,4-mananase da presente invenção clonada a partir do *Bacillus halodurans* apresenta 77 % de similaridade e 60 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase do *Bacillus circulans* (GenBank/EMBL acesso nº O66185), 64,2 % de similaridade e 46 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Vibrio sp.* (acesso nº O69347), 63 % de similaridade e 41,8 % de identidade à beta-1,4-mananase do *Streptomyces lividans* (acesso nº P51529), 60,3 % de similaridade e 42 % de identidade de sequência à beta-1,4-mananase do

Caldicellulosiruptor saccharolyticus (acesso nº P2253). As sequências foram alinhadas usando-se o programa GAP da GCG Wisconsin software package, versão 8.1; com penalidade de criação gap de 3,00 e penalidade de extensão gap de 0,10.

5 CLONAGEM DO GENE DE MANANASE DO *BACILLUS HALODURANS* SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DA MANANASE MADURA DE COMPRIMENTO COMPLETO NO *B. SUBTILIS*:

A sequência de DNA que codifica a mananase da invenção foi amplificada por PCR usando-se o conjunto de iniciador de PCR que consiste
10 destes dois oligo nucleotídeos:

BXM5.superior.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA CAT CAC AGT GGG TTC CAT G-3'

BXM5.inferior.NotI

5'-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TAT TGA AAC ACA CTG CTT CTT TTA G-
15 3'

Os sítios de restrição SacII e NotI estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *Bacillus halodurans* como descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) de acordo com as instruções dos
20 fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador
25 térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1 minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de ciclo de desnaturação a 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Aliquotas de cinco µl do produto da amplificação foram analisados por eletroforese em 0,7 % de géis de

agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de DNA de 0,9 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados
5 como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. 5 µg de pMOL944 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR foram digeridos com SacII e NotI, submetidos a eletroforese em géis de
10 agarose a 0,8 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque GTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi depois ligado ao pMOL944 digerido e purificado por SacII-NotI. A ligação
15 foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de tampão T4 DNA ligase e T4 ligase (Boehringer Mannheim, Alemanha).

A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis* PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa
20 sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina-agar. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes
25 sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB878. O clone MB878 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foi usado para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do

plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase na posição de 97 a 993 na SEQ ID NO: 11 e de 33 a 331 na SEQ ID NO: 12.

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANANASE 5 DO *BACILLUS HALODURANS*

O clone MB878 obtido como descrito acima foi cultivado em 25 x 200 ml de meio de BPX com 10 µg/ml de canamicina em frascos de agitação com dois defletores de 500 ml por cinco dias a 37° C a 300 rpm.

5000 ml do fluido de cultura do frasco de agitação do clone
10 MB878 foi coletado e o pH foi ajustado para 6,0. 125 ml do agente catiônico (10 % C521) e 250 ml de agente aniônico (A130) foram adicionados durante a agitação para floculação. O material floculado foi separado por centrifugação usando-se uma centrífuga Sorval RC 3B a 9000 rpm por 20 minutos a 6° C. O sobrenadante foi ajustado ao pH 8,0 usando-se NaOH e
15 clarificado usando-se filtros de vidro Whatman GF/D e C. Depois 50 g de DEAE A-50 Sephadex foram equilibrados com acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e adicionados ao filtrado, a enzima foi ligada e deixada durante a noite na temperatura ambiente. A enzima ligada foi eluída com NaCl 0,5 M no tampão de acetato. Depois o pH foi ajustado para 8,0 usando-se hidróxido de
20 sódio e depois concentrada em um Filtron com um corte de 10 kDa a 450 ml e depois estabilizada com 20 % de glicerol, 20 % de MPG e 2 % de Berol. O produto foi usado para testes de aplicação.

2 ml deste concentrado foi ajustado ao pH 8,5 usando-se hidróxido de sódio. Para se obter mananase altamente pura, o concentrado foi
25 passado em uma coluna Superdex equilibrada com fosfato de sódio, pH 8,5. A enzima pura deu uma faixa única no SDS-PAGE com um peso molecular de 34 kDa.

A sequência de aminoácido da enzima de mananase, isto é a sequência traduzida de DNA é apresentada na SEQ ID NO: 12.

A seguinte sequência de terminal N da proteína purificada foi determinada: AHHSGFHVNGTTLYDA.

O perfil de atividade em pH usando-se o ensaio de ManU (incubação por 20 minutos a 40° C) apresenta que a enzima tem uma
5 atividade relativa mais alta do que 50 % entre o pH 7,5 e o pH 10.

O ótimo de temperatura foi descoberto (usando-se o ensaio de ManU, tampão de glicina) como sendo entre 60° C e 70° C no pH 10.

Propriedades imunológicas: o soro monoespecífico policlonal de coelho foi incitado contra a mananase clonada altamente purificada
10 usando-se técnicas convencionais na companhia Dinamarquesa DAKO. O soro formou um bom e único precipitado em géis de agarose com a mananase bruta não purificada da invenção.

EXEMPLO 11

Uso da enzima de mananase do exemplo 10 em detergentes

15 Usando-se detergentes comerciais ao invés de tampão e incubação por 20 minutos a 40° C com 0,2 % de AZCL-galactomanana (Megazyne, Austrália) do grau de alfarroba como descrito acima seguido pela determinação da formação de cor azul, a enzima de mananase obtida como
20 descrito no Exemplo 10 foi ativa com uma atividade mais alta do que 40 % em relação a atividade em tampão no detergente em líquido Europeu Ariel Futur, no pó US Tide e no detergente líquido US Tide. Nestes testes, a concentração de detergente foi como recomendada nos pacotes de detergente comercial e a água de lavagem foi água de torneira tendo 18 graus de dureza Alemã sob condições Européias (Ariel Futur) e 9 graus sob as condições US
25 (US Tide).

EXEMPLO 12

Mananase derivada do *Bacillus sp.* AA349

Clonagem do gene de mananase do *Bacillus sp.* (AA349)

subclonagem e expressão de uma enzima de mananase de núcleo catalítico no

B. subtilis:

A sequência de DNA que codifica a mananase da invenção foi amplificada por PCR usando-se o conjunto de iniciador de PCR que consiste dos dois oligo nucleotídeos seguintes:

5 BXM7.superior.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AGT GGA CAT GGG CAA ATG C-3'

BXM7.inferior.NotI

5'-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TAT TTT TTG TAT ACA CTA ACG ATT TC-3'

10 Os sítios de restrição SacII e NotI estão sublinhados.

O DNA cromossômico isolado do *Bacillus sp.* AA349 como descrito acima foi usado como padrão em uma reação de PCR usando-se Amplitaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) de acordo com as instruções dos fabricantes. A reação de PCR foi ajustada em tampão de PCR (10 mM de
15 Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de Mg Cl₂, 0,01 % (p/v) de gelatina) contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de AmpliTaq polimerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) e 100 pmol de cada iniciador.

As reações de PCR foram realizadas usando-se um ciclador térmico de DNA (Landgraf, Alemanha). Uma incubação a 94° C por 1
20 minuto seguido por trinta ciclos de PCR realizados usando-se um perfil de ciclo de desnaturação a 94° C por 30 segundos, cosendo-se a 60° C por 1 minuto, e extensão a 72° C por 2 minutos. Alíquotas de cinco µl do produto da amplificação foram analisadas por eletroforese em 0,7 % de géis de agarose (NuSieve, FMC). O aparecimento de um tamanho de fragmento de
25 DNA aproximado de 1,0 kb indicou a amplificação apropriada do segmento de gene.

SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO DE PCR:

Alíquotas de quarenta e cinco µl dos produtos de PCR gerados como descrito acima foram purificados usando-se o conjunto de purificação

de PCR QIAquick (Qiagen, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. O DNA purificado foi eluído em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. 5 µg de pMOL944 e vinte e cinco µl do fragmento purificado de PCR foram digeridos com SacII e NotI, submetidos a eletroforese em géis de agarose a 0,8 % abaixo da temperatura de formação de gel (SeaPlaque GTG, FMC), os fragmentos relevantes foram excisados dos géis e purificados usando-se o conjunto de extração QIAquick Gel (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA isolado por PCR foi depois ligado ao pMOL944 digerido e purificado por SacII-NotI. A ligação foi realizada durante a noite a 16° C usando-se 0,5 µg de cada fragmento de DNA, 1 U de tampão T4 DNA ligase e T4 ligase (Boehringer Mannheim, Alemanha).

A mistura de ligação foi usada para transformar o *B. subtilis* PL2306 competente. As células transformadas foram colocadas em placa sobre placas de LBPG-10 µg/ml de canamicina-agar. Após 18 horas de incubação a 37° C, as colônias foram semeadas nas placas. Diversos clones foram analisados isolando-se o DNA plasmídico do caldo de cultura da noite anterior.

Um tal clone positivo foi novamente riscado várias vezes sobre placas de agar como usado acima, este clone foi chamado MB879. O clone MB879 foi cultivado durante a noite em TY-10 µg/ml de canamicina a 37° C e no dia seguinte 1 ml das células foram usadas para isolar o plasmídeo das células usando-se o conjunto Qiaprep Spin Plasmid Miniprep #27106 de acordo com as recomendações dos fabricantes para as preparações do plasmídeo de *B. subtilis*. Este DNA foi sequenciado e revelou a sequência de DNA que corresponde à parte madura da mananase (que corresponde às posições 204 a 1107 na sequência de DNA anexa SEQ ID NO: 15 e às posições de 26 a 369 na sequência de proteína anexa SEQ ID NO: 16).

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANANASE

DO *Bacillus* sp. AA349

O clone MB879 obtido como descrito acima foi cultivado em 25 x 200 ml de meio de BPX com 10 µg/ml de canamicina em frascos de agitação com dois defletores de 500 ml por cinco dias a 37° C a 300 rpm.

5 400 ml do fluído de cultura do frasco de agitação do clone MB879 foi coletado e o pH foi 6,5. 19 ml do agente catiônico (10 % C521) e 38 ml de agente aniônico (A130) foram adicionados durante a agitação para floculação. O material floculado foi separado por centrifugação usando-se uma centrífuga Sorval RC 3B a 5000 rpm por 25 minutos a 6° C. O então
10 concentrado foi lavado com água para reduzir a condutividade em um Filtron com corte de 10 kDa para 150 ml. Depois o pH foi ajustado 4,0 e o líquido aplicado à cromatografia em coluna de S-Sepharose em um tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,0. A coluna foi primeiro eluída com um gradiente de NaCl para 0,5 M, depois a mananase eluiu usando-se tampão de
15 glicina 0,1 M, pH 10. A fração de mananase ativa foi reunida e deu uma faixa única no SDS-PAGE com um peso molecular de 38 kDa.

A sequência de aminoácido da enzima de mananase, isto é a sequência traduzida de DNA é apresentada na SEQ ID NO: 16.

O perfil de atividade em pH usando-se o ensaio de ManU
20 (incubação por 20 minutos a 40° C) apresenta que a enzima tem uma atividade relativa mais alta do que 30 % entre o pH 5 e o pH 10.

O ótimo de temperatura foi descoberto (usando-se o ensaio de ManU, tampão de glicina) como sendo entre 60° C e 70° C no pH 10.

Propriedades imunológicas: o soro monoespecífico policlonal
25 de coelho foi incitado contra a mananase clonada altamente purificada usando-se técnicas convencionais na companhia Dinamarquesa DAKO. O soro formou um bom e único precipitado em géis de agarose com a mananase bruta não purificada da invenção.

EXEMPLO 13

Uso da enzima do exemplo 12 em detergentes

Usando-se detergentes comerciais ao invés de tampão e incubação por 20 minutos a 40° C com 0,2 % de AZCL-galactomanana (Megazyne, Austrália) do grau de alfarroba como descrito acima seguido pela determinação da formação de cor azul, a enzima obtida como descrito no Exemplo 12 foi ativa com uma atividade mais alta do que 65 % em relação à atividade no tampão no detergente líquido Europeu Ariel Futur e no detergente líquido US Tide. A mananase foi mais do que 35 % ativa em detergentes em pó da Europa, Ariel Futur e no pó US Tide. Nestes testes, a concentração de detergente foi como recomendada nos pacotes de detergente comercial e a água de lavagem foi água de torneira tendo 18 graus de dureza Alemã sob condições Européias (Ariel Futur) e 9 graus sob as condições US (US Tide).

EXEMPLO 14

Mananase derivada da cepa fúngica do *Humicola insolens* DSM 1800
Clonagem de expressão de uma família de 26 beta-1,4-mananases do *Humicola insolens*
Cepa fúngica e condições de cultivo

A cepa DSM1800 do *Humicola insolens* foi fermentada como descrito na WO 97/32014, o micélio foi colhido após cinco dias de cultivo a 26° C, imediatamente congelado em N₂ líquido e armazenado a -80° C.

PREPARAÇÃO DE VIDRARIA, PONTEIRAS E SOLUÇÕES ISENTOS DE Rnase

Toda a vidraria usada nas isolações de RNA foram fervidas a + 220° C por pelo menos 12 horas. Os tubos de Eppendorf, as pontas de pipetas e as colunas plásticas foram tratados com 0,1 % de dietilpirocarbonato (DEPC) em EtOH por 12 horas e submetidos a autoclave. Todos os tampões e a água (exceto os tampões contendo Tris) foram tratados com 0,1 % de DEPC por 12 horas a 37° C e autoclavados.

EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA foi preparado pela extração com tiocianato de guanidínio seguido por ultra centrifugação através de uma almofada de CsCl 5,7 M (Chirgwin *et al.*, 1979) usando-se as seguintes modificações. O micélio congelado foi moído em N₂ líquido até um pó fino com um almofariz e um pistilo, seguido pela moagem em um moinho de café pré esfriado e imediatamente colocado em suspensão em 5 volumes de tampão de extração de RNA (GuSCN 4 M, 0,5 % de Na-laurilsarcosina, Na-citrato 25 mM, pH 7,0, β-mercaptoetanol 0,1 M). A mistura foi agitada por 30 minutos na temperatura ambiente e centrifugada (30 minutos, 5000 rpm, temperatura ambiente, Heraeus Megafuge 1,0 R) para granular o escombros celular. O sobrenadante foi coletado, cuidadosamente disposto em camada sobre uma almofada de CsCl 5,7 M (CsCl 5,7 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5, DEPC 0,1 %; autoclavada antes do uso) usando-se 26,5 ml do sobrenadante por cada 12,0 ml de almofada de CsCl e centrifugado para se obter o RNA total (Beckman, rotor SW28, 25.000 rpm, temperatura ambiente, 24 horas). Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o fundo do tubo contendo o grão de RNA foi cortado e enxaguado com EtOH a 70 %. O grão de RNA total foi transferido para um tubo de Eppendorf, colocado em suspensão em 500 µl de TE, pH 7,6 (se difícil, aquecer ocasionalmente por 5 minutos a 65° C), o fenol extraído e precipitado com etanol por 12 horas a -20° C (2,5 volumes de EtOH, 0,1 volume de NaAc 3 M, pH 5,2). O RNA foi coletado por centrifugação, lavado em EtOH a 70 % e recolocado em suspensão em um volume mínimo de DEPC-DIW. A concentração de RNA foi determinada medindo-se o OD_{260/280}.

ISOLAÇÃO DE POLI(A)⁺RNA

Os poli(A)⁺ RNAs foram isolados pela cromatografia de afinidade oligo(dT)-celulose (Aviv & Leder, 1972). Tipicamente, 0,2 g de oligo(dT)-celulose (Boehringer Mannheim, checado quanto a capacidade de

ligação) foi pré intumescido em 10 ml de 1 x tampão de carga de coluna (Tris-Cl 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, 0,1 % SDS) carregado em uma coluna plástica tampada, tratada com DEPC (Coluna Cromatográfica Poly Prep, Bio Rad) e equilibrada com 20 ml, 1 x de tampão de carga. O RNA total foi aquecido a 65° C por 8 minutos, extinto em gelo por 5 minutos e após a adição de um volume 2 x tampão de carga de coluna em relação a amostra de RNA carregada na coluna. O eluato foi coletado e novamente carregado de 2 a 3 vezes aquecendo-se a amostra como acima e arrefecendo em gelo antes de cada carga. A coluna de oligo(dT) foi lavada com 10 volumes de 1 x de tampão de carga, depois com 3 volumes de tampão de meio salino (Tris-Cl 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, 0,1 % de SDS), seguido pela eluição do poli(A)⁺RNA com três volumes de tampão de eluição (Tris-Cl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, 0,05 % de SDS) pré aquecido a + 65° C, coletando-se frações de 500 ml. O OD₂₆₀ foi lido para cada fração coletada e as frações contendo mRNA foram reunidas e precipitadas com etanol a -20° C por 12 horas. O poli(A)⁺ RNA foi coletado por centrifugação, recolocado em suspensão em DEPC-DIW e armazenado em alíquotas de 5 a 10 mg a -80°C.

SÍNTESE DO cDNA

20 SÍNTESE DO PRIMEIRO FILAMENTO

O cDNA de filamento duplo foi sintetizado a partir de 5 mg de poli(A)⁺ RNA do *Humicola insolens* pelo método da RNase H (Gubler & Hoffman 1983, Sambrook *et al.*, 1989) usando-se a modificação de grampo de cabelo desenvolvida por F. S. Hagen (*pers. comm.*). O poli(A)⁺ RNA (5 mg em 5 ml de água tratada com DEPC) foi aquecido a 70° C por 8 minutos, arrefecido em gelo e combinado em um volume final de 50 ml com tampão de transcriptase reversa (Tris-Cl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM, Bethesda Research Laboratories) contendo 1 mM de cada dNTP (Pharmacia), 40 unidades de inibidor de ribonuclease de placenta

humana (Rnasin, Promega), 10 mg de iniciador oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia) e 1000 unidades de transcriptase reversa SuperScript II RNase H (Bethesda Research Laboratories). O primeiro filamento do cDNA foi sintetizado incubando-se a mistura de reação a 45° C por 1 hora.

5 SÍNTESE DO SEGUNDO FILAMENTO

Após a síntese, 30 ml de Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM foram adicionados e os híbridos mRNA:cDNA foram precipitados por etanol por 12 horas a -20° C pela adição de 40 mg de carregador de glicogênio (Boehringer Mannheim), 0,2 volumes de NH₄Ac 10 M e 2,5 volumes de EtOH a 96 %. Os híbridos foram recuperados por centrifugação, lavados em EtOH a 70 %, secados ao ar e recolocados em suspensão em 250 ml do tampão do segundo filamento (Tris-Cl 20 mM, pH 7,4, KCl 90 mM, MgCl₂ 4,6 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, βNAD⁺ 16 mM) contendo 100 mM de cada dNTP, 44 unidades de E. coli DNA polimerase I (Amersham), 6,25 unidades de RNase H (Bethesda Research Laboratories) e 10,5 unidades de E. coli DNA ligase (New England Biolabs). A síntese do cDNA do segundo filamento foi realizada pela incubação do tubo de reação a 16° C por três horas e a reação foi interrompida pela adição de EDTA para concentração final de 20 mM seguido pela extração com fenol.

20 TRATAMENTO POR FEIJÃO *MUNG* NUCLEASE

O cDNA de filamento duplo (ds) foi precipitado com etanol a 20° C por 12 horas pela adição de 2 volumes de EtOH a 96 %, 0,1 volume de NaAc 3 M, pH 5,2, recuperado por centrifugação, lavado em EtOH a 70 %, secado (SpeedVac) e colocado em suspensão em 30 ml de tampão de feijão *Mung* nuclease (NaAc 30 mM, pH 4,6, NaCl 300 mM, ZnSO₄ 1 mM, DTT 0,35 mM, 2 % de glicerol) contendo 36 unidades de feijão *Mung* nuclease (Bethesda Research Laboratories). O DNA de grampo de cabelo de filamento único foi preso pela incubação da reação a 30° C por 30 minutos, seguido pela adição de 70 ml de Tris-Cl 10

mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, extração com fenol e precipitação com etanol com dois volumes de EtOH a 96 % e 0,1 volume de NaAc 3 M pH 5,2 a -20° C durante 12 horas.

TÉRMINO ABRUPTO COM T4 DNA POLIMERASE

5 O ds cDNA foi terminado de forma abrupta com T4 DNA polimerase em 50 µl de tampão T4 DNA polimerase (Tris-acetato 20 mM, pH 7,9, MgAc 10 mM, KAc 50 mM, DTT 1mM) contendo 0,5 mM de cada dNTP e 7,5 unidades de t\$ DNA polimerase (Invitrogen) incubando-se a mistura de reação a +37° C por 15 minutos. A reação foi interrompida pela
10 adição de EDTA para uma concentração final de 20 mM, seguido pela extração com fenol e precipitação com etanol.

LIGAÇÃO ADAPTADORA E SELEÇÃO DE TAMANHO

Após a reação estar completa o DNA foi ligado a adaptadores não palindrômicos BstX I (1 mg/ml, Invitrogen) em 30 µl de tampão de
15 ligação (Tris-Cl 50 mM), pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, 25 mg/ml de albumina de soro fetal bovino) contendo 600 pmol de adaptadores BstX I e 5 unidades de T4 ligase (Invitrogen) incubando-se a mistura de reação a + 16° C por 12 horas. A reação foi interrompida aquecendo-se a + 70° C por 5 minutos e o cDNA adaptado foi fracionado no
20 tamanho por eletroforese em gel de agarose (0,8 % de HSB-agarose, FMC) para separar os adaptadores não ligados e os cDNA pequenos. O cDNA foi selecionado por tamanho com um corte em 0,7 kb e o cDNA foi eletroeluído a partir de gel de agarose em Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM por 1 hora a 100 volts, o fenol extraído e o etanol precipitado a -20° C por 12 horas
25 como acima.

CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DO *HUMICOLA INSOLENS*

Os cDNAs adaptados foram recuperados por centrifugação, lavados em EtOH a 70 % e recolocado em suspensão em 25 µl de DIW. Antes da ligação da biblioteca em escala maior, quatro ligações teste foram

realizadas em 10 ml de tampão de ligação (o mesmo como acima) cada um contendo 1 ml de ds cDNA (tubos de reação #1 a #3) 2 unidades de T4 ligase (Invitrogen) e 50 ng (tubo #1), 100 ng (tubo #2) e 200 ng (tubo #3 e #4) do vetor pYES 2.0 clivado por BstX I (Invitrogen). As reações de ligação foram realizadas pela incubação a + 16° C por 12 horas, aquecido a 70° C por 5 minutos e 1 ml de cada ligação eletroporada (200 W, 2,5 kV, 25 mF) para 40 ml de células E. coli 1061 competente (OD600 = 0,9 em 1 litro de caldo LB, lavado duas vezes em DIW frio uma vez em 20 ml de glicerol a 10 %, recolocado em suspensão em 2 ml de glicerol a 10 %). Após a adição de 1 ml de SOC a cada mistura de transformação, as células foram cultivadas a + 37° C por 1 hora, 50 ml colocados em placa sobre placas de LB + ampicilina (100 mg/ml) e cultivados a + 37° C por 12 horas.

Usando-se as condições ótimas, uma ligação em larga escala foi ajustada em 40 ml de tampão de ligação contendo 9 unidades de T4 ligase e a reação foi incubada a + 16° C por 12 horas. A reação de ligação foi interrompida aquecendo-se a 70° C por 5 minutos, o etanol precipitou a -20° C por 12 horas, recuperados por centrifugação e recolocados em suspensão em 10 ml de DYW. Aliquotas de um ml foram transformados em células E. coli 1061 eletrocompetentes usando-se as mesmas condições de eletroporação como acima e as células transformadas foram tituladas e a biblioteca colocada em placa sobre placas de LB + ampicilina com 5000 a 7000 c.f.u./placa. A biblioteca de cDNA que compreende 1×10^6 clones recombinantes foi armazenada como 1) agrupamentos individuais (5000 a 7000 c.f.u./agrupamento) em glicerol a 25 % a -80° C, 2) grãos de célula dos mesmos agrupamentos a -20° C e 3) DNA plasmídico purificado por Qiagen a partir dos agrupamentos individuais a -20° C (Qiagen Tip 100, Diagen).

CLONAGEM DE EXPRESSÃO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DOS cDNAs DA BETA -1,4-MANANASE DO *HUMICOLA INSOLENS*

Aliquotas de um ml de DNA plasmídico purificado (100

ng/ml) dos agrupamentos individuais foram submetidos a eletroporação (200 W, 1,5 kV, 25 mF) em 40 ml de células de *S. cerevisiae* W3124 eletrocompetente (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; precl::HIS3, prb1::LEU2; cir +) (OD600 = 1,5 em 500 ml de YPD, lavado
5 duas vezes em DIW frio, uma vez em sorbitol 1 M frio, recolocado em suspensão em 0,5 ml de sorbitol 1 M, Becker & Guarante, 1991). Após a adição de 1 ml de sorbitol frio 1 M, alíquotas de 80 ml foram colocados em placa sobre SC + glicose – uracila para dar 250 a 400 unidades formadoras de colônia por placa e incubadas a 30° C durante 3 a 5 dias. As placas foram
10 replicadas em placas de SC + galactose - uracila, contendo AZCl-galactomanana (MegaZyme, Austrália) incorporado nas placas de agar. No total, ca. 50.000 colônias de levedura da biblioteca do *H. insolens* foram avaliadas quanto aos clones positivos em mananase.

Os clones positivos foram identificados pela formação de
15 halos azuis de hidrólise em torno das colônias de levedura correspondente. Os clones foram obtidos como colônias únicas, os insertos de cDNA foram diretamente amplificados a partir dos lisatos de célula de levedura usando-se iniciadores poliligadores pYES biotinilados, purificados por sistema de pérolas magnéticas (Dynabead M-280, Dynal) e caracterizados
20 individualmente pelo sequenciamento do final 5' de cada clone de cDNA usando-se o método de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977) e sistema Sequenase (United States Biochemical).

As colônias de levedura positivas em mananase foram inoculadas em 20 ml de caldo YPD em tubos de 50 ml. Os tubos foram
25 agitados por 2 dias a 30°C e as células foram colhidas por centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm. O DNA total de levedura foi isolado de acordo com a WO 94/14953, dissolvido em 50 ml de água autoclavada e transformado no *E. coli* por eletroporação como acima. Os clones de cDNA pYES 2.0 contendo o inserto foram recuperados colocando-se em placa sobre placas de

LB + ampicilina agar, o DNA plasmídeo foi isolado a partir do *E. coli* usando-se procedimentos padrão e analisado pela digestão com enzimas de restrição.

ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO

- 5 A sequência de nucleotídeo do clone de cDNA da beta-1,4-mananase do *H. insolens* de comprimento completo pC1M59 foi determinada de ambos os filamentos pelo método de terminação de cadeia didesóxi (Sanger *et al.*, 1977), usando-se 500 ng de padrão purificado por Qiagen (Qiagen, USA), o conjunto de sequenciamento de ciclo de terminal Taq desóxi (Perkin-Elmer, USA), terminadores fluorescentemente rotulados e 5 pmol dos iniciadores poliligadores pYES 2.0 (Invitrogen, USA). A análise dos dados de sequência foi realizada de acordo com Devereux *et al.*, (1984).

EXPRESSÃO HETERÓLOGA NO *ASPERGILLUS ORYZAE*

TRANSFORMAÇÃO DO *ASPERGILLUS ORYZAE*

- 15 A transformação do *Aspergillus oryzae* foi realizada como descrito por Christensen *et al.*, (1988), *Biotechnology* 6, 1419 a 1422.

CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DA BETA-1,4-MANANASE PARA EXPRESSÃO DE *ASPERGILLUS*

- 20 O DNA plasmídico foi isolado do clone de mananase pC1M59 usando-se procedimentos padrão e analisado pela análise de enzima de restrição. O inserto de cDNA foi excisado usando-se enzimas de restrição apropriadas e ligados no vetor de expressão do *Aspergillus* pHD414, que é um derivado do plasmídeo p775 (descrito na EP 238023). A construção do pHD414 é ainda descrita na WO 93/11249.

- 25 TRANSFORMAÇÃO DO *ASPERGILLUS ORYZAE* OU *ASPERGILLUS NIGER*

Procedimento geral: 100 ml de YPD (Sherman *et al.*, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) são inoculados com esporos de *A. oryzae* ou *A. niger* e incubados com agitação a 37° C por cerca

de 2 dias. O micélio é colhido por filtração através de miracloth e lavado com 200 ml de MgSO_4 0,6 M. O micélio é colocado em suspensão em 15 ml de MgSO_4 1,2 M, NaH_2PO_4 10 mM, pH = 5,8. A suspensão é esfriada em gelo e 1 ml de tampão contendo 120 mg de Novozym® 234 é adicionado. Após 5 minutos, 1 ml de BSA 12 mg/ml é adicionado e a incubação com agitação suave é continuada por 1,5 a 2,5 horas a 37° C até que uma grande quantidade de protoplastos seja visível em uma amostra inspecionada sob o microscópio. A suspensão é filtrada através de miracloth, o filtrado transferido para um tubo estéril e coberto com 5 ml de sorbitol 0,6 M, Tris-HCl 100 mM, pH 7,0.

10 A centrifugação é realizada por 15 minutos a 100g e os protoplastos são coletados do topo da almofada de MgSO_4 . 2 volumes de STC são adicionados à suspensão de protoplasto e a mistura é centrifugada por 5 minutos a 1000g. O grão de protoplasto é recolocado em suspensão em 3 ml de STC e novamente peletizado. Isto é repetido. Finalmente os protoplastos são

15 recolocados em suspensão em 0,2-1 ml de STC. 100 μl de suspensão de protoplasto são misturados com 5-25 μg do DNA apropriado em 10 μl de STC. Os protoplastos são misturados com p3SR2 (um plasmídeo que carrega o gene amdS do *A. nidulans*). A mistura é deixada na temperatura ambiente por 25 minutos. 0,2 ml de PEG 4000 a 60 %, CaCl_2 10 mM e Tris-HCl 10

20 mM, pH 7,5 é adicionado e cuidadosamente misturado (duas vezes) e finalmente 0,85 ml da mesma solução é adicionado e cuidadosamente misturado. A mistura é deixada na temperatura ambiente por 25 minutos, centrifugados a 2500g por 15 minutos e o grão é recolocado em suspensão em 2 ml de sorbitol 1,2 M. Depois de mais uma sedimentação, os

25 protoplastos são disseminados sobre placas apropriadas. Os protoplastos são disseminados sobre placas mínimas para inibir o desenvolvimento de fundo. Após a incubação por 4 a 7 dias a 37° C os esporos foram coletados e disseminados para colônias únicas. Este procedimento foi repetido e os esporos de uma colônia única após a segunda re-isolação são armazenados

como um transformante definido.

PURIFICAÇÃO DOS TRANSFORMANTES DE *ASPERGILLUS ORYZAE*

As colônias do *Aspergillus oryzae* são purificadas através de esporos conidiais em AmdS+-placas (+ 0,01 % de Triton X-100) e cultivadas em YPM por 3 dias a 30° C.

IDENTIFICAÇÃO DE TRANSFORMANTES DE *ASPERGILLUS ORYZAE* POSITIVOS EM MANANASE

Os sobrenadantes dos transformantes do *Aspergillus oryzae* foram avaliados quanto à atividade de beta-1,4-mananase sobre placas de agar contendo 0,2 % de AZCl-galactomanana (MegaZyme, Austrália) como substrato. Os transformantes positivos foram identificados analisando-se as placas quanto aos halos azuis de hidrólise após 24 horas de incubação a 30° C.

ANÁLISE DE SDS-PAGE

A análise de SDS-PAGE dos sobrenadantes dos transformantes do *Aspergillus oryzae* que produzem beta-1,4-mananase. Os transformantes foram cultivados em 5 ml de YPM por 3 dias. 10 µl de sobrenadante foram aplicados a gel de SDS-poliacrilamida a 12 % que foi subsequentemente corado com Coomassie Brilliant Blue.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANANASE DO *HUMICOLA INSOLENS*

O gene foi transformado em ads do *A. oryzae* descrito acima e a cepa transformada foi cultivada em um fermentador usando-se um padrão médio de xarope de maltose, sacarose, MgSO₄, Ka₂PO₄ e K₂SO₄ e extrato de levedura em ácido cítrico e traços de metais. Incubação durante 6 dias a 34° C com ar.

O caldo de fermentação (5000 ml) foi colhido e o micélio separado do líquido por filtração. O líquido claro foi concentrado em um filtron para 275 ml.

A mananase foi purificada usando-se a cromatografia catiônica. Uma coluna de S-Spharose foi equilibrada com ácido cítrico 25 mM pH 4,0 e a ligação da mananase à coluna e foi eluído usando-se um gradiente de cloreto de sódio (0-0,5 M). As frações ativas em mananase foram reunidas e o pH ajustado para 7,3. Os 100 ml de mananase reunida foram depois concentradas a 5 ml com proteína em torno de 13 mg por ml e usadas para testes de aplicação. Para uma purificação adicional 2 ml foram aplicados à cromatografia de tamanho em Superdex 200 em tampão de acetato de sódio pH 6,1. A fração ativa em mananase apresentou faixas coradas iguais no SDS-PAGE com um peso molecular de 45 kDa e 38 kDa, indicando a degradação proteolítica do domínio não catalítico de terminal N.

A sequência de aminoácido da enzima mananase, isto é, a sequência traduzida de DNA é apresentada na SEQ ID NO: 14.

A sequência de DNA da SEQ ID NO: 13 codifica um peptídeo de sinal nas posições de 1 a 21. Um domínio de função desconhecida também encontrado em outras mananases é representado na sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 14 nas posições de 22 a 159 e o domínio catalítico ativo é encontrado nas posições de 160 a 488 da SEQ ID NO: 14. A mais alta homologia de sequência foi encontrada para DICTYOGLOMUS THERMOPHILUM (49 % de identidade); sequência de mananase EMBL; AF013989 apresentada por REEVES R. A., GIBBS M. D., BERGQUIST P. L., apresentada em julho de 1997.

Peso Molecular: 38 kDa.

DSC em tampão de acetato de sódio, pH 6,0 foi de 65°.

O perfil de atividade em pH usando-se o ensaio de ManU (incubação por 20 minutos a 40° C) apresenta que a enzima tem uma atividade ótima no pH 8.

O ótimo de temperatura foi descoberto (usando-se o ensaio de ManU, goma de alfarroba AZCL, Megazyme como o substrato) como sendo

70° C no pH 10.

Propriedades imunológicas: o soro monoespecífico policlonal de coelho foi incitado contra a mananase clonada altamente purificada usando-se técnicas convencionais na companhia Dinamarquesa DAKO. O
5 soro formou um bom e único precipitado em géis de agarose com a mananase bruta não purificada da invenção.

EXEMPLO 15

Avaliação de lavagem da família de 26 mananases do *Humicola insolens*

O desempenho de lavagem foi avaliado lavando-se uma
10 amostra de tecido revestida com goma de alfarroba em uma solução de detergente com a mananase da invenção. Após a lavagem o efeito foi visualizado sujando-se as amostras de tecido com óxido de ferro.

Preparação das amostras de tecido com goma de alfarroba: amostras de tecidos de algodão limpas foram embebidas em uma solução de
15 2 g/litro de goma de alfarroba e secadas durante a noite na temperatura ambiente. As amostras de tecido foram pré lavadas em água e novamente secadas.

Lavagem: As amostras de tecido com goma de alfarroba, pequenas, circulares foram colocadas em um béquer com 6,7 g/litro de Ariel
20 Futur líquido em água a 15°dH e incubadas por 30 minutos a 40° C com agitação magnética. As amostras de tecido foram enxaguadas em água de torneira e secadas.

Sujeira: As amostras de tecido foram colocadas em um béquer com 0,25 g/litro de Fe_2O_3 e agitadas por 3 minutos. As amostra foram
25 enxaguadas em água de torneira e secadas.

Avaliação: A remissão das amostras de tecido foi medida a 440 nm usando-se um espectrofotômetro de remissão MacBeth ColorEye 7000.

Os resultados são expressos como:

$$\text{Delta de remissão} = (R_{\text{após lavagem}} - R_{\text{antes da lavagem}})_{\text{enzima}} - (R_{\text{após lavagem}} - R_{\text{antes da lavagem}})_{\text{controle}}$$

onde R é a remissão a 440 nm.

A mananase desta invenção é claramente eficaz nas amostras de tecido com goma de alfarroba, com um desempenho de lavagem ligeiramente melhor do que a mananase de controle do *Bacillus sp.* I633.

- 5 O desempenho de lavagem da família de 26 mananases do *Humicola insolens* comparado à mananase do *Bacillus sp.* I633 (Exemplos de 1 a 3) dados como valores de delta de remissão:

Dose de enzima em mg/l	Mananase de <i>Humicola insolens</i>	I633mananase <i>Bacillus sp.</i>
0	0	0
0,01	6,6	5,0
0,1	9,3	8,6
1,0	10,2	77
10,0	10,5	9,7

EXEMPLOS DE 16 a 40

- 10 Os seguintes exemplos são intencionados a exemplificar as composições da presente invenção, mas não são necessariamente intencionados a limitar ou de outro modo definir o escopo da invenção,

- Nas composições de detergente, os níveis de enzimas são expressados por enzima pura em peso da composição total e a menos que de outro modo especificado, os ingredientes detergentes são expressos em peso das composições totais, Aqui as identificações abreviadas de componente
- 15 têm os seguintes significados:

LAS	:	Alquila C ₁₁₋₁₃ linear benzeno sulfonato de sódio,
TAS	:	Alquil sulfato sódico de sebo,
CxyAS	:	Alquila C _{1x} - C _{1y} sulfato de sódio,
20 CxySAS	:	(2,3) Alquila C _{1x} - C _{1y} secundária sulfato de sódio,
CxyEz	:	Álcool C _{1x} - C _{1y} primário, predominantemente linear

- condensado com uma média de z moles de óxido de etileno,
- CxyEzS : Alquila $C_{1x} - C_{1y}$ sulfato de sódio condensado com uma média de z moles de óxido de etileno,
- 5 QAS : $R_2, N+(CH_3)_2(C_2H_4OH)$ com $R_2 = C_{12}-C_{14}$
- QAS 1 : $R_2, N+(CH_3)_2(C_2H_4OH)$ com $R_2 = C_8-C_{11}$,
- APA : Amido propil dimetil amina C_8-10 ,
- Soap : Carboxilato sódico de alquila linear derivado de uma mistura 80/20 de ácidos graxos de sebo e de coco,
- 10 Não iônico : Álcool graxo $C_{13}-C_{15}$ misto etoxilado/propoxilado com um grau médio de etoxilação de 3,8 e um grau médio de propoxilação de 4,5,
- Neodol 45-13 : Álcool primário linear $C_{14}-C_{15}$ etoxilado, vendido pela Shell Chemical CO,
- 15 STS : Tolueno sulfonato de sódio,
- CFAA : Alquila $C_{12}-C_{14}$ N-metil glicamida,
- TFAA : Alquila $C_{16}-C_{18}$ N-metil glicamida,
- TPKFA : Ácidos graxos $C_{12}-C_{14}$ de corte integral de topo,
- Silicato : Silicato de sódio amorfo (relação $SiO_2:Na_2O = 1,6$ a $3,2$),
- 20 Metassilicato : Metassilicato de sódio (relação $SiO_2:Na_2O = 1,0$),
- Zeólito A : Aluminossilicato de sódio hidratado da fórmula $Na_{12}(AlO_2SiO_2)_{12}, 27H_2O$ tendo um tamanho de partícula primária na faixa de 0,1 a 10 micrômetros (Peso expresso em uma base anidra),
- 25 Na-SKS-6 : Silicato cristalino disposto em camada da fórmula $\delta-Na_2Si_2O_5$,
- Citrato : Citrato trissódico diidratado de atividade de 86,4 % com uma distribuição de tamanho de partícula entre 425 e 850 micrômetros,

	Cítrico	:	Ácido cítrico anidro,
	Borato	:	Borato de sódio
	Carbonato	:	Carbonato de sódio anidro com um tamanho de partícula entre 200 e 900 micrômetros,
5	Bicarbonato	:	Hidrogeno carbonato de sódio anidro com uma distribuição de tamanho de partícula entre 400 e 1200 micrômetros,
	Sulfato	:	Sulfato de sódio anidro,
	Mg Sulfato	:	Sulfato de magnésio anidro,
10	STPP	:	Tripolifosfato de sódio,
	TSP	:	Pirofosfato Tetraassódico,
	MA/AA	:	Copolímero aleatório de acrilato/maleato 4:1, peso molecular médio de cerca de 70.000 a 80.000,
	MA/AA 1	:	Copolímero aleatório de acrilato/maleato 6:4, peso molecular médio de cerca de 10.000,
15	AA	:	Polímero de poliacrilato de sódio de peso molecular médio de 4.500,
	PA30	:	Ácido poliacrílico de peso molecular médio entre cerca de 4.500 a 8.000,
20	480N	:	Copolímero aleatório de acrilato/metacrilato 7:3, peso molecular médio de cerca de 3.500,
	Polygel/carbopo:		Poliacrilatos reticulados de alto peso molecular,
	PB1	:	Perborato de sódio anidro monoidratado de fórmula nominal $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$,
25	PB4	:	Perborato de sódio tetraidratado de fórmula nominal $\text{NaBO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$,
	Percarbonato	:	Percarbonato de sódio anidro de fórmula nominal $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$,
	NaDCC	:	Dicloroisocianurato de sódio,

	TAED	:	Tetraacetiletilenodiamina,
	NOBS	:	Sulfonato de Nonanoiloxibenzeno na forma do Sal de sódio,
	NACA-OBS	:	(6-nonamidocaproil) oxybenzeno sulfonato,
5	DTPA	:	Ácido dietileno triamino pentaacético,
	HEDP	:	Ácido 1,1-hidroxietano difosfônico,
	DETPMP	:	Dietiltriamino penta (metileno) fosfonato, comercializado pela Monsanto sob o nome comercial de Dequest 2060,
10	EDDS	:	Ácido etilenodiamino-N,N'-dissuccínico, (S,S) isômero na forma do seu sal de sódio,
	MnTACN	:	1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano de manganês,
	Branqueador fotoativado	:	Ftalocianina de zinco sulfonada encapsulada em polímero solúvel em destrina
15	Branqueador Fotoativado 1	:	Alumino ftalocianina sulfonada encapsulada em em polímero solúvel de dextrina,
	PAAC	:	Sal de cobalto (III) de pentaamino acetato,
	Parafina	:	Óleo de parafina vendido sob o nome comercial Winog 70 pela Wintershall,
20	NaBz	:	Benzoato de sódio,
	BzP	:	Peróxido de Benzoíla,
	Mananase	:	Como aqui descrita,
	Protease	:	Enzima proteolítica vendida sob o nome comercial Savinase, Alcalase, Durazym pela Novo Nordisk A/S,
25			Maxacal, Maxapem vendidos pela Gist-Brocades e as proteases descritas nas patentes WO 91/06637 e/ou WO 95/10591 e/ou EP 251 446,
	Amilase	:	Enzima amilolítica vendida sob o nome comercial Purafact Ox Am ^R descrita nas WO 94/18314 e WO

- SRP 2 : Polímero de bloco curto de poli(1,2-propileno tereftalato) dietoxilado,
- QEA : bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n)(CH₃)-N⁺-C₆H₁₂-N⁺-(CH₃)bis((C₂H₅O)-(C₂H₄O))_n, em que n = de 20 a 30,
- 5 PEI : Polietilenoimina com um peso molecular médio de 1800 e um grau médio de etoxilação de 7 resíduos de etilenoóxi por nitrogênio,
- SCS : Cumeno sulfonato de sódio,
- HMWPEO : Óxido de polietileno de alto peso molecular,
- 10 PEG_x : Polietileno glicol de um peso molecular de x,
- PEO : Óxido de polietileno com um peso molecular médio de 5.000;
- TEPAE : Tetraetilenopentaamina etoxilada,
- BTA : Benzotriazol,
- 15 PH : Medido como uma solução a 1 % em água destilada a 20°C,

EXEMPLO 16

As seguintes composições detergentes de lavar roupas de alta densidade foram preparadas de acordo com a presente invenção:



	I	II	III	IV	V	VI
LAS	8,0	8,0	8,0	2,0	6,0	6,0
TAS	-	0,5	-	0,5	1,0	0,1
C46 (S)AS	2,0	2,5	-	-	-	-
C25AS	-	-	-	7,0	4,5	5,5
C68AS	2,0	5,0	7,0	-	-	-
C25E5	-	-	3,4	10,0	4,6	4,6
C25E7	3,4	3,4	1,0	-	-	-
C25E3S	-	-	-	2,0	5,0	4,5
QAS	-	0,8	-	-	-	-
QAS I	-	-	-	0,8	0,5	1,0
Zeólito	18,1	18,0	14,1	18,1	20,0	18,1
Cítrico	-	-	-	2,5	-	2,5
Carbonato	13,0	13,0	27,0	10,0	10,0	13,0
Na-SKS-6	-	-	-	10,0	-	10,0
Silicato	1,4	1,4	3,0	0,3	0,5	0,3
Citrato	-	1,0	-	3,0	-	-
Sulfato	26,1	26,1	26,1	6,0	-	-
Mg sulfato	0,3	-	-	0,2	-	0,2
MA/AA	0,3	0,3	0,3	4,0	1,0	1,0
CMC	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4
PB4	9,0	9,0	5,0	-	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	18,0	18,0
TAED	1,5	0,4	1,5	-	3,9	4,2
NACA-OBS	-	2,0	1,0	-	-	-
DETPMP	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
SRP I	-	-	-	0,2	-	0,2
EDDS	-	0,25	0,4	-	0,5	0,5
CFAA	-	1,0	-	2,0	-	-
HEDP	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
QEA	-	-	-	0,2	-	0,5
Protease	0,009	0,009	0,01	0,04	0,05	0,03
Mananase	0,05	0,009	0,03	0,009	0,03	0,009
Amilase	0,002	0,002	0,002	0,006	0,008	0,008
Celulase	0,0007	-	-	0,0007	0,0007	0,0007
Lipase	0,006	-	-	0,01	0,01	0,01
Branqueador fotoativado (ppm)	15	15	15	-	20	20
PVNO/PVPVI	-	-	-	0,1	-	-
Abrilhantador I	0,09	0,09	0,09	-	0,09	0,09
Perfume	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
Silicona anti-espuma	0,5	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Densidade em g/litro	850	850	0,5	850	850	850
Miscelânea e menores						
Miscelânea e menores				até 100%		

EXEMPLO 17

As seguintes composições detergentes granulares de lavar roupas de utilidade particular sob condições de lavagem em máquina Européia foram preparadas de acordo com a presente invenção:

	I	II	III	IV	V	VI
LAS	5,5	7,5	5,0	5,0	6,0	7,0
TAS	1,25	1,9	-	0,8	0,4	0,3
C46 (S)AS/C25AS	-	2,2	5,0	5,0	5,0	2,2
C25E3S	-	0,8	1,0	1,5	3,0	1,0
C45E7	3,25	-	-	-	-	3,0
TFAA	-	-	2,0	-	-	-
C25E5	-	5,5	-	-	-	-
QAS	0,8	-	-	-	-	-
QAS 1	-	0,7	1,0	0,5	1,0	0,7
STPP	19,7	-	-	-	-	-
Zeólito A	-	19,5	25,0	19,5	20,0	17,0
Na-SKS-6/ácido cítrico (79:21)	-	10,6	-	10,6	-	-
Na-SKS-6	-	-	9,0	-	10,0	10,0
Carbonato	6,1	21,4	9,0	10,0	10,0	18,0
Bicarbonato	-	2,0	7,0	5,0	-	2,0
Silicato	6,8	-	-	0,3	0,5	-
Citrato	-	-	4,0	4,0	-	-
Sulfato	39,8	-	-	5,0	-	12,0
Mg sulfato	-	-	0,1	0,2	0,2	-
MA/AA	0,5	1,6	3,0	4,0	1,0	1,0
CMC	0,2	0,4	1,0	1,0	0,4	0,4
PB4	5,0	12,7	-	-	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	18,0	15,0
TAED	0,5	3,1	-	-	5,0	-
NACA-OBS	1,0	3,5	-	-	-	2,5
DETPMP	0,25	0,2	0,3	0,4	-	0,2
HEDP	-	0,3	-	0,3	0,3	0,3
QEA	-	-	1,0	1,0	1,0	-
Protease	0,009	0,03	0,03	0,05	0,05	0,02
Mananase	0,03	0,03	0,001	0,03	0,005	0,009
Lipase	0,003	0,003	0,006	0,006	0,006	0,004
Celulase	0,0006	0,000	0,0005	0,0005	0,0007	0,0007
Amilase	0,002	0,002	0,006	0,006	0,01	0,003
PVNO/PVPVI	-	-	0,2	0,2	-	-
PVP	0,9	1,3	-	-	-	0,9
SRP 1	-	-	0,2	0,2	0,2	-
Alvejante fotoativado (ppm)	15	27	-	-	20	20
Alvejante fotoativado 1 (ppm)	15	-	-	-	-	-
Abrilhantador 1	0,08	0,2	-	-	0,09	0,15
Abrilhantador 2	-	0,04	-	-	-	-
Perfume	0,3	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3
Silicona anti-espuma	0,5	2,4	0,3	0,5	0,3	2,0
Densidade em g/litro	750	750	750	750	750	750

Miscelânea e menores

até 100%

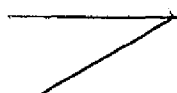
EXEMPLO 18

As seguintes composições detergentes de utilidade particular sob condições de lavagem de máquina Européia foram preparadas de acordo com a presente invenção:

	I	II	III	IV
Pó soprado				
LAS	6,0	5,0	11,0	6,0
TAS	2,0	-	-	2,0
Zeólito A	24,0	-	-	20,0
STPP	-	27,0	24,0	-
Sulfato	4,0	6,0	13,0	-
MA/AA	1,0	4,0	6,0	2,0
Silicato	1,0	7,0	3,0	3,0
CMC	1,0	1,0	0,5	0,6
Abrilhantador 1	0,2	0,2	0,2	0,2
Antiespuma de silicone	1,0	1,0	1,0	0,3
DETPMP	0,4	0,4	0,2	0,4
Pulverização				
Abrilhantador	0,02	-	-	0,02
C45E7	-	-	-	5,0
C45E2	2,5	2,5	2,0	-
C45E3	2,6	2,5	2,0	-
Perfume	0,5	0,3	0,5	0,2
Antiespuma de silicone	0,3	0,3	0,3	-
Aditivos secos				
QEA	-	-	-	1,0
EDDS	0,3	-	-	-
Sulfato	2,0	3,0	5,0	10,0
Carbonato	6,0	13,0	15,0	14,0
Cítrico	2,5	-	-	2,0
QAS 1	0,5	-	-	0,5
Na-SKS-6	10,0	-	-	-
Percarbonato	18,5	-	-	-
PB4	-	18,0	10,0	21,5
TAED	2,0	2,0	-	2,0
NACA -OBS	3,0	2,0	4,0	-
Protease	0,03	0,03	0,03	0,03
Mananase	0,009	0,01	0,03	0,001
Lipase	0,008	0,008	0,008	0,004
Amilase	0,003	0,003	0,003	0,006
Abrilhantador 1	0,05	-	-	0,05
Miscelânea e menores		até 100%		

EXEMPLO 19

As seguintes composições detergentes granulares foram preparadas de acordo com a presente invenção:



	I	II	III	IV	V	VI
Pó soprado						
LAS	23,0	8,0	7,0	9,0	7,0	7,0
TAS	-	-	-	-	1,0	-
C45AS	6,0	6,0	5,0	8,0	-	-
C45AES	-	1,0	1,0	1,0	-	-
C45E35	10,0	-	-	-	2,0	4,0
Zeólito A	-	18,0	14,0	12,0	10,0	10,0
MA/AA	7,0	0,5	-	-	-	2,0
MA/AA 1	-	-	-	-	-	-
AA	5,0	3,0	3,0	2,0	3,0	3,0
Sulfato	10,0	6,3	14,3	11,0	15,0	19,3
Silicato	15,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato	0,4	20,0	10,0	20,7	8,0	6,0
PEG 4000	-	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0
DTPA	0,3	0,9	0,5	-	-	0,5
Abrilhantador 2	-	0,2	0,3	-	0,1	0,3
Pulverização	-	-	-	-	-	-
C45E7	3,0	2,0	-	-	2,0	2,0
C25E9	-	-	-	2,0	-	-
C23E9	0,3	-	1,5	2,0	-	2,0
Perfume	-	0,3	0,3	-	0,3	0,3
Aglomerados						
C45AS	-	5,0	5,0	2,0	-	5,0
LAS	-	2,0	2,0	-	-	2,0
Zeólito A	-	7,5	7,5	8,0	-	7,5
Carbonato	-	4,0	4,0	5,0	-	4,0
PEG 4000	-	0,5	0,5	-	-	0,5
Miscelânea (água, etc.)	-	2,0	2,0	2,0	-	2,0
Aditivos secos						
QAS	-	-	-	-	1,0	-
Cítrico	-	-	-	-	2,0	-
PB4	-	-	-	-	12,0	1,0
PB1	4,0	1,0	3,0	2,0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	2,0	10,0
Carbonato	-	5,3	1,8	-	4,0	4,0
NOBS	4,0	-	6,0	-	-	0,6
Metil celulose	0,2	-	-	-	-	-
Na-SKS-6	8,0	-	-	-	-	-
STS	-	-	2,0	-	1,0	-
Ácido sulfônico culmeno	-	1,0	-	-	-	2,0
Protease	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
Mananase	0,0009	0,01	0,03	0,009	0,01	0,001
Lipase	0,004	-	0,004	-	0,004	0,008
Amilase	0,003	-	0,002	-	0,003	-
Celulase	0,0005	0,0005	0,0005	0,000	0,0005	0,0005
PVPVI	-	-	-	-	0,5	0,1
PVP	-	-	-	-	0,5	-
PVNO	-	-	0,5	0,3	-	-
QEA	-	-	-	-	1,0	-
SRP1	0,2	0,5	0,3	-	0,2	-
Antiespuma de silicone	0,2	0,4	0,2	0,4	0,1	-
Sulfato de Mg	-	-	0,2	-	0,2	-

Miscelânea e menores

Até 100%

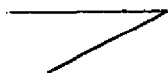
EXEMPLO 20

As seguintes composições detergentes não contendo nenhum branqueador de uso particular na lavagem de roupas coloridas foram preparadas de acordo com a presente invenção

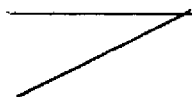
	I	II	III
Pó soprado			
Zeólito A	15,0	15,0	-
Sulfato	-	5,0	-
LAS	3,0	3,0	-
DETPMP	0,4	0,5	-
CMC	0,4	0,4	-
MA/AA	4,0	4,0	-
Aglomerados			
C45AS	-	-	11,0
LAS	6,0	5,0	-
TAS	3,0	2,0	-
Silicato	4,0	4,0	-
Zeólito A	10,0	15,0	13,0
CMC	-	-	0,5
MA/AA	-	-	2,0
Carbonato	9,0	7,0	7,0
Pulverização			
Perfume	0,3	0,3	0,5
C45E7	4,0	4,0	4,0
C25E3	2,0	2,0	2,0
Aditivos secos			
MA/AA	-	-	3,0
Na-SKS-6	-	-	12,0
Citrato	10,0	-	8,0
Bicarbonato	7,0	3,0	5,0
Carbonato	8,0	5,0	7,0
PVPVI/PVNO	0,5	0,5	0,5
Protease	0,03	0,02	0,05
Mananase	0,001	0,004	0,03
Lipase	0,008	0,008	0,008
Amilase	0,01	0,01	0,01
Celulase	0,001	0,001	0,001
Antiespuma de silicone	5,0	5,0	5,0
Sulfato	-	9,0	-
Densidade (g/l)	700	700	700
Miscelânea e menores		Até 100%	

5 **EXEMPLO 21**

As seguintes composições detergentes foram preparadas de acordo com a presente invenção:



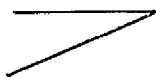
	I	II	III	IV
Grânulo base				
Zeólito A	30,0	22,0	24,0	10,0
Sulfato	10,0	5,0	10,0	7,0
MA/AA	3,0	-	-	-
AA	-	1,6	2,0	-
MA/AA 1	-	12,0	-	6,0
LAS	14,0	10,0	9,0	20,0
C45AS	8,0	7,0	9,0	7,0
C45AES	-	1,0	1,0	-
Silicato	-	1,0	0,5	10,0
Sabão	-	2,0	-	-
Abrilhantador 1	0,2	0,2	0,2	0,2
Carbonato	6,0	9,0	10,0	10,0
PEG 4000	-	1,0	1,5	-
DTPA	-	0,4	-	-
Pulverização				
C25E9	-	-	-	5,0
C45E7	1,0	1,0	-	-
C23E9	-	1,0	2,5	-
Perfume	0,2	0,3	0,3	-
Aditivos secos				
Carbonato	5,0	10,0	18,0	8,0
PVPVI/PVNO	0,5	-	0,3	-
Protease	0,03	0,03	0,03	0,02
Mananase	0,002	0,009	0,015	0,03
Lipase	0,008	-	-	0,008
Amilase	0,002	-	-	0,002
Celulase	0,0002	0,0005	0,0005	0,0002
NOBS	-	4,0	-	4,5
PB1	1,0	5,0	1,5	6,0
Sulfato	4,0	5,0	-	5,0
SRP 1	-	0,4	-	-
Supressores de espuma	-	0,5	0,5	-
Miscelânea e menores		Até 100%		



EXEMPLO 22

As seguintes composições detergentes granulares foram preparadas de acordo com a presente invenção:

	I	II	III
Pó soprado			
Zeólito A	20,0	-	15,0
STPP	-	20,0	-
Sulfato	-	-	5,0
Carbonato	-	-	5,0
TAS	-	-	1,0
LAS	6,0	6,0	6,0
C68AS	2,0	2,0	-
Silicato	3,0	8,0	-
MA/AA	4,0	2,0	2,0
CMC	0,6	0,6	0,2
Abrilhantador 1.	0,2	0,2	0,1
DETPMP	0,4	0,4	0,1
STS	-	-	1,0
Pulverização			
C45E7	5,0	5,0	4,0
Antiespuma de silicone	0,3	0,3	0,1
Perfume	0,2	0,2	0,3
Aditivos secos			
QEA	-	-	1,0
Carbonato	14,0	9,0	10,0
PB1	1,5	2,0	-
PB4	18,5	13,0	13,0
TAED	2,0	2,0	2,0
QAS	-	-	1,0
Alvejante fotoativado	15 ppm	15 ppm	15 ppm
Na-SKS-6	-	-	3,0
Protease	0,03	0,03	0,007
Mananase	0,001	0,005	0,02
Lipase Amilase	0,004	0,004	0,004
Celulase	0,006	0,006	0,003
Sulfato	0,0002	0,0002	0,0005
Densidade (g/l)	10,0	20,0	5,0
	700	700	700
Miscelânea e outros		Até 100%	



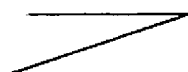
EXEMPLO 23

As seguintes composições detergentes foram preparadas de acordo com a presente invenção:

	I	II	III
Pó soprado			
Zeólito A	15,0	15,0	15,0
Sulfato	-	5,0	-
LAS	3,0	3,0	3,0
QAS	-	1,5	1,5
DETPMP	0,4	0,2	0,4
EDDS	-	0,4	0,2
CMC	0,4	0,4	0,4
MA/AA	4,0	2,0	2,0
Aglomerados			
LAS	5,0	5,0	5,0
TAS	2,0	2,0	1,0
Silicato	3,0	3,0	4,0
Zeólito A	8,0	8,0	8,0
Carbonato	8,0	8,0	4,0
Pulverização			
Perfume	0,3	0,3	0,3
C45E7	2,0	2,0	2,0
C25E3	2,0	-	-
Aditivos secos			
Citrato	5,0	-	2,0
Bicarbonato	-	3,0	-
Carbonato	8,0	15,0	10,0
TAED	6,0	2,0	5,0
PB1	14,0	7,0	10,0
PEQ	-	-	0,2
Argila de bentonia	-	-	10,0
Protease	0,03	0,03	0,03
Mananase	0,001	0,005	0,01
Lipase	0,008	0,008	0,008
Celulase	0,001	0,001	0,001
Amilase	0,01	0,01	0,01
Antiespuma de silicone	5,0	5,0	5,0
Sulfato	-	3,0	-
Densidade (g/l)	850	850	850
Miscelânea e outros		Até 100%	

EXEMPLO 24

5 As seguintes composições detergentes foram preparadas de acordo com a presente invenção:



	I	II	III	IV
LAS	18,0	14,0	24 0	20,0
QAS	0,7	1,0	-	0,7
TFAA	-	1,0	-	-
5 C23E56,5	-	-	1,0	-
C45E7	-	1,0	-	-
C45E3S	1,0	2,5	1,0	-
STPP	32,0	18,0	30,0	22,0
Silicato	9,0	5,0	9,0	,8,0
10 Carbonato	11,0	7,5	10,0	5,0
Bicarbonato	-	7,5	-	-
PB1	3,0	1,0	-	-
PB4	-	1,0	-	-
NOBS	2,0	1,0	-	-
15 DETPMP	-	1,0	-	-
DTPA	0,5	-	0,2	0,3
SRP 1	0,3	0,2	-	0,1
MA/AA	1,0	1,5	2,0	0,5
CMC	0,8	0,4	0,4	,0,2
20 PEI	-	-	0,4	-
Sulfato	20,0	10,0	20,0	30,0
Mg sulfato	0,2	-	0,4	0,9
Mananase	0,001	0,005	0,01	0,015
Protease	0,03	0,03	0,02	0,02
25 Amilase	0,008	0,007	-	0,004
Lipase	0,004	-	0,002	-
Celulase	0,0003	-	-	0,0001
Branqueador	30 ppm	20 ppm	-	10 ppm
Fotoativado				
30 Perfume	0,3	0,3	0,1	0,2
Abrilhantador 1/2	0,05	0,02	0,08	0,1
Miscelânea e menores		Até 100 %		

EXEMPLO 25

As seguintes formulações detergentes líquidas foram preparadas de acordo com a presente invenção (Os teores são dados em partes em peso, as enzimas são expressas em enzima pura)

	I	II	III	IV	V
LAS	11,5	8,8	-	3,9	-
C25E2,5S	-	3,0	18,0	-	16,0
40 C45E2,25S	11,5	3,0	-	15,7	-
C23E9	-	2,7	1,8	2,0	1,0
C23E7	3,2	-	-	-	-
CFAA	-	-	5,2	-	3,1
TPKFA	1,6	-	2,0	0,5	2,0
45 Cítrico (50 %)	6,5	1,2	2,5	4,4	2,5
Formiato de Ca	0,1	0,06	0,1	-	-
Formiato de Na	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
SCS	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	-	3,0	2,0	2,9
50 hidróxido de Na	5,8	2,0	3,5	3,7	2,7
Etanol	1,75	1,0	3,6	4,2	2,9

	1,2 Propanodiol	3,3	2,0	8,0	7,9	5,3
	Monoetanolamina	3,0	1,5	1,3	2,5	0,8
	TEPAE	1,6	-	1,3	1,2	2
	Mananase	0,001	0,01	0,015	0,015	0,001
5	Protease	0,03	0,01	0,03	0,02	0,02
	Lipase	-	-	0,002	-	-
	Amilase	-	-	-	0,002	-
	Celulase	-	-	0,0002	0,0005	0,0001
	SRP 1	0,2	-	0,1	-	-
10	DTPA	-	-	0,3	-	-
	PVNO	-	-	0,3	-	0,2
	Abrilhantador 1	0,2	0,07	0,1	-	-
	Anti-espumante de silicona	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1
15	Miscelânea e água					

EXEMPLO 26

As seguintes formulações detergentes líquidas foram preparadas de acordo com a presente invenção (Os teores são dados em partes em peso, as enzimas são expressas em enzima pura)

20		I	II	III	IV
	LAS	10,0	13,0	9,0	-
	C25AS	4,0	1,0	2,0	10,0
	C25E3S	1,0	-	-	3,0
	C25E7	6,0	8,0	13,0	2,5
25	TFAA	-	-	-	4,5
	APA	-	1,4	-	-
	TPKFA	2,0	-	13,0	7,0
	Cítrico	2,0	3,0	1,0	1,5
	Ácido Dodecenil/ tetradecenil succínico	12,0	10,0	-	-
30	Ácido graxo de semente de colza	4,0	2,0	1,0	-
	Etanol	4,0	4,0	7,0	2,0
	1,2 Propanodiol	4,0	4,0	2,0	7,0
35	Monoetanolamina	-	-	-	5,0
	Trietanolamina	-	-	8,0	-
	TEPAE	0,5	-	0,5	0,2
	DETPMP	1,0	1,0	0,5	1,0
	Mananase	0,001	0,015	0,01	0,03
40	Protease	0,02	0,02	0,01	0,008
	Lipase	-	0,002	-	0,002
	Amilase	0,004	0,004	0,01	0,008
	Celulase	-	-	-	0,002
	SRP 2	0,3	-	0,3	0,1
45	Ácido bórico	0,1	0,2	1,0	2,0
	Cloreto de Ca	-	0,02	-	0,01
	Abrilhantador 1	-	0,4	-	-
	Supressor de espuma	0,1	0,3	-	0,1
50	Opacificador	0,8	0,4	-	0,3
	NaOH até pH	8,0	8,0	7,6	7,7
	Miscelânea e água				

EXEMPLO 27

As seguintes composições detergentes líquidas foram preparadas de acordo com a presente invenção (Os níveis são dados em partes em peso, a enzima são expressas em enzima pura)

	I	II	III	IV
5				
LAS	25,0	-	-	-
C25AS	-	13,0	18,0	15,0
C25E3S	-	2,0	2,0	4,0
C25E7	-	-	4,0	4,0
10				
TFAA	-	6,0	8,0	8,0
APA	3,0	1,0	2,0	-
TPKFA	-	15,0	11,0	11,0
Cítrico	1,0	1,0	1,0	1,0
Ácido dodecenil/ 15 tetradecenil succínico	15,0	-	-	-
Ácido graxo de semente de colza	1,0	-	3,5	-
Etanol	7,0	2,0	3,0	2,0
1,2 Propanodiol	6,0	8,0	10,0	13,0
20				
Monoetanolamina	-	-	9,0	9,0
TEPAE	-	-	0,4	0,3
DETPMP	2,0	1,2	1,0	-
Mananase	0,001	0,0015	0,01	0,01
Protease	0,05	0,02	0,01	0,02
25				
Lipase	-	-	0,003	0,003
Aamilase	0,004	0,01	0,01	0,01
Celulase	-	-	0,004	0,003
SRP 2	-	-	0,2	0,1
Ácido bórico	1,0	1,5	2,5	2,5
30				
Argila Bentonita	4,0	4,0	-	-
Abrilhantador I	0,1	0,2	0,3	-
Supressor de espuma	0,4	-	-	-
Opacificador	0,8	0,7	-	-
NaOH até pH	8,0	7,5	8,0	8,2
35				
Miscelânea e água				

EXEMPLO 28

As seguintes composições detergentes líquidas foram preparadas de acordo com a presente invenção (Os teores são dados em partes em peso, as enzimas são expressas em enzima pura)

	I	II
40		
LAS	27,6	18,9
C45AS	13,8	5,9
C13E8	3,0	3,1
Ácido Oléico	3,4	2,5
45		
Cítrico	5,4	5,4
Hidróxido Na	0,4	3,6
Formiato de Ca	0,2	0,1
Formiato de Na	-	0,5
Etanol	7,0	-

	Monoetanolamina	16,5	8,0
	1,2 propanodiol	5,9	5,5
	Ácido xileno sulfônico	-	2,4
	TEPAE	1,5	0,8
5	Protease	0,05	0,02
	Mananase	0,001	0,01
	PEG	-	0,7
	Abrilhantador 2	0,4	0,1
	Perfume	0,5	0,3
10	Água e Menores		

EXEMPLO 29

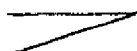
As seguintes composições detergentes granulares de tecido que fornece capacidade de “maciez através da lavagem” foram preparadas de acordo com a presente invenção

	I	II
15	C45AS	-
	LAS	10,0
	C68AS	-
	C45E7	-
20	C25E3	-
	Hidróxi alquil-dimetil de coco	5,0
	cloreto de etil amônio	1,0
	Citrato	3,0
	Na-SKS-6	11,0
25	Zeólito A	15,0
	MA/AA	4,0
	DETPMP	0,4
	PB1	15,0
	Percarbonato	-
30	TAED	15,0
	Argila Smectita	5,0
	HMWPEO	10,0
	Mananase	0,1
	Protease	0,01
35	Lipase	0,01
	Amilase	0,01
	Celulase	0,005
	Silicato	0,001
	Carbonato	-
40	Supressor de espuma	3,0
	CMC	5,0
	Miscelânea e menores	10,0
		4,0
		0,1
		até 100 %

EXEMPLO 30

A seguinte composição amaciante de tecido adicionada no enxágue foi preparada de acordo com a presente invenção

DEQA (2)	20,0
Mananase	0,0008



	Celulase	0,001
	HCl	0,03
	Agente anti-espumante	0,01
	Corante Azul	25 ppm
5	CaCl ₂	0,20
	Perfume	0,90
	Miscelânea e água	até 100 %

EXEMPLO 31

As seguintes composições condicionadoras adicionadas com amaciante e secante de tecidos foram preparadas de acordo com a presente invenção:

	I	II	III	IV	V
DEQA	2,6	19,0	-	-	-
DEQA(2)	-	-	-	-	-
DTMAMS	-	-	-	26,0	51,8
SDASA	-	-	70,0	42,0	40,2
Ácido esteárico de IV=0	0,3	-	-	-	-
Neodol 45-13	-	-	13,0	-	-
Ácido Hidroclórico	0,02	0,02	-	-	-
Etanol	-	-	1,0	-	-
Mananase	0,0008	0,0002	0,0005	0,005	0,0002
Perfume	1,0	1,0	0,75	1,0	1,5
Glycoperse S-20	-	-	-	-	15,4
Monostearato - de glicerol	-	-	26,0	-	-
Digeranil Succinato	-	-	0,38	-	-
Anti-espumante de silicona	0,01	0,01	-	-	-
Eletrólito	-	0,1	-	-	-
Argila	-	-	-	3,0	-
Corante	10 ppm	25 ppm	0,01	-	-
Água e menores	100 %	100 %	-	-	-

EXEMPLO 32

As seguintes composições detergentes de barra de lavar roupa foram preparadas de acordo com a presente invenção (Os teores são dados em partes em peso, as enzimas são expressas em enzima pura)

	I	II	III	VI	V	III	VI	V
LAS	-	-	19,0	15,0	21,0	6,75	8,8	-
C28AS	30,0	13,5	-	-	-	15,75	11,2	22,5
Laurato de Na	2,5	9,0	-	-	-	-	-	-
Zeólito A	2,0	1,25	-	-	-	1,25	1,25	1,25
Carbonato	20,0	3,0	13,0	8,0	10,0	15,0	15,0	10,0

	Carbonato de Ca	27,5	39,0	35,0	-	-	40,0	-	40,0
	Sulfato TSPP	5,0	5,0	3,0	5,0	3,0			5,0
5	STPP	5,0	-	-	-	-	5,0	2,5	
	STPP	5,0	15,0	10,0	-	-	7,0	8,0	10,0
	Argila	-	10,0	-	-	5,0	-	-	-
	Bentonita								
	DETPMP	-	0,7	0,6	-	0,6	0,7	0,7	0,7
	CMC	-	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	1,0
10	Talco	-	-	10,0	15,0	10,0	-	-	-
	Silicato	-	-	4,0	5,0	3,0	-	-	-
	PVNO	0,02	0,03	-	0,01	-	0,02	-	-
	MA/AA	0,4	1,0	-	-	0,2	0,4	0,5	0,4
	SRP 1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
15	Mananase	0,001	0,001	0,01	0,01	0,015	0,001	0,05	0,01
	Amilase	-	-	0,01	-	-	-	0,002	-
	Protease	0,001	0,004	0,001	0,003	0,003	0,001	0,001	0,003
	Lipase	-	0,002	-	0,002	-	-	-	-
	Celulase	-	,0003	-	-	,0003	,0002	-	-
20	PEO	-	0,2	-	0,2	0,3	-	-	0,3
	Perfume	1,0	0,5	0,3	0,2	0,4	-	-	0,4
	Sulfato Mg	-	-	3,0	3,0	3,0	-	-	-
	Abrilhantador	0,15	0,1	0,15	-	-	-	-	0,1
25	Branqueador fotoativado (ppm)	15,0	15,0	15,0	15,0	-	-	15,0	

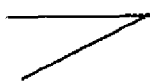
EXEMPLO 33

As seguintes composições detergentes aditivas foram preparadas de acordo com a presente invenção

		I	II	III
30	LAS	-	5,0	5,0
	STPP	30,0	-	20,0
	Zeólito A	-	35,0	20,0
	PB1	20,0	15,0	-
	TAED	10,0	8,0	-
35	Mananase	0,001	0,01	0,01
	Protease	0,3	0,3	0,3
	Amilase	-	0,06	0,06
	Menores, água e miscelâneas		Até 100 %	

EXEMPLO 34

40 As seguintes composições detergentes de lavar louças compactas de alta densidade (0,96 Kg/litro) foram preparadas de acordo com a presente invenção



		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	STPP	-	-	54,3	51,4	51,4	-	-	50,9
	Citrato	35,0	17,0	-	-	-	46,1	40,2	-
	Carbonato	-	17,5	14,0	14,0	14,0	-	8,0	32,1
5	Bicarbonato	-	-	-	-	-	25,4	-	-
	Silicato	32,0	14,8	14,8	10,0	10,0	1,0	25,0	3,1
	Metassilicato	-	2,5	-	9,0	9,0	-	-	-
	PB1	1,9	9,7	7,8	7,8	7,8	-	-	-
	PB4	8,6	-	-	-	-	-	-	-
10	Percarbonato	-	-	-	-	-	6,7	11,8	4,8
	Não iônico	1,5	2,0	1,5	1,7	1,5	2,6	1,9	5,3
	TAED	5,2	2,4	-	-	-	2,2	-	1,4
	HEDP	-	1,0	-	-	-	-	-	-
	DETPMP	-	0,6	-	-	-	-	-	-
15	MnTACN	-	-	-	-	-	-	0,008	-
	PAAC	-	-	0,008	0,01	0,007	-	-	-
	BzP	-	-	-	-	1,4	-	-	-
	Parafina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	-	-
	Mananase	0,001	0,001	0,002	0,002	0,001	0,003	0,002	0,002
20	Protease	0,072	0,072	0,029	0,053	0,046	0,026	0,059	0,06
	Amilase	0,012	0,012	0,006	0,012	0,013	0,009	0,017	0,03
	Lipase	-	0,001	-	0,005	-	-	-	-
	BTA	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-	0,3	0,3
	MA/AA	-	-	-	-	-	-	4,2	-
25	480N	3,3	6,0	-	-	-	-	-	0,9
	Perfume	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
	Sulfato	7,0	20,0	5,0	2,2	0,8	12,0	4,6	-
	pH	10,8	11,0	10,8	11,3	11,3	9,6	10,8	10,9
	Miscelânea e água					até 100 %			

30 EXEMPLO 35

As seguintes composições detergentes granulares de lavar louças de densidade 1,02 Kg/litro foram preparadas de acordo com a presente invenção

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VII
35	STPP	30,0	30,0	33,0	34,2	29,6	31,1	26,6	17,6
	Carbonato	30,5	30,5	31,0	30,0	23,0	39,4	4,2	45,0
	Silicato	7,4	7,4	7,5	7,2	13,3	3,4	43,7	12,4
	Metassilicato	-	-	4,5	5,1	-	-	-	-
	Percarbonato	-	-	-	-	-	4,0	-	-
40	PB1	4,4	4,2	4,5	4,5	-	-	-	-
	NADCC	-	-	-	-	2,0	-	1,6	1,0
	Não iônico	1,2	1,0	0,7	0,8	1,9	0,7	0,6	0,3
	TAED	1,0	-	-	-	-	0,8	-	-
	PAAC	-	0,004	0,004	0,004	-	-	-	-
45	BzP	-	-	-	1,4	-	-	-	-
	Parafina	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-	-	-
	Mananase	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	Protease	0,036	0,015	0,03	0,028	-	0,03	-	-
	Amilase	0,003	0,003	0,01	0,006	-	0,01	-	-
50	Lipase	0,005	-	0,001	-	-	-	-	-
	BTA	0,15	0,15	0,15	0,15	-	-	-	-

Perfume	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	
Sulfato	23,4	25,0	22,0	18,5	30,1	19,3	23,1	23,6
pH	10,8	10,8	11,3	11,3	10,7	11,5	12,7	10,9
Miscelânea e água	Até 100 %							

5 EXEMPLO 36

As seguintes composições detergentes de tablete foram preparadas de acordo com a presente invenção pela compressão de uma composição detergente granular de lavar louças em uma pressão de 13 KN/cm² usando-se uma prensa padrão 12 de cabeçote rotativo:

10		I	II	III	IV	V	VI
	STPP	-	48,8	49,2	38,0	-	46,8
	Citrato	26,4	-	-	-	31,1	-
	Carbonato	-	5,0	14,0	15,4	14,4	23,0
	Silicato	26,4	14,8	15,0	12,6	17,7	2,4
15	Mananase	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,02
	Protease	0,058	0,072	0,041	0,033	0,052	0,013
	Amilase	0,01	0,03	0,012	0,007	0,016	0,002
	Lipase	0,005	-	-	-	-	-
	PB1	1,6	7,7	12,2	10,6	15,7	-
20	PB4	6,9	-	-	-	-	14,4
	Não iônico	1,5	2,0	1,5	1,65	0,8	6,3
	PAAC	-	-	0,02	0,009	-	-
	MnTACN	-	-	-	-	0,007	-
	TAED	4,3	2,5	-	-	1,3	1,8
25	HEDP	0,7	-	-	0,7	-	0,4
	DETPMP	0,65	-	-	-	-	-
	Parafina	0,4	0,5	0,5	0,55	-	-
	ETA	0,2	0,3	0,3	0,3	-	-
	PA30	3,2	-	-	-	-	-
30	MA/AA	-	-	-	-	4,5	0,55
	Perfume	-	-	0,05	0,05	0,2	0,2
	Sulfato	24,0	13,0	2,3	-	10,7	3,4
	Peso do tablete	25 g	25 g	20 g	30 g	18 g	20 g
35	pH	10,6	10,6	10,7	10,7	10,9	11,2
	Miscelânea e água	até 100 %					

EXEMPLO 37

As seguintes composições detergentes líquidas de lavar louças de densidade 1,40 Kg/litro foram preparadas de acordo com a presente invenção

40		I	II	III	IV
	STPP	17,5	17,5	17,2	16,0
	Carbonato	2,0	-	2,4	-
	Silicato	5,3	6,1	14,6	15,7
45	NaOC1	1,15	1,15	1,15	1,25
	Poligen/carbopol	1,1	1,0	1,1	1,25
	Não iônico	-	-	0,1	-
	NaBz	0,75	0,75	-	-

	Mananase	0,001	0,005	0,01	0,001
	NaOH	-	1,9	-	3,5
	KOH	2,8	3,5	3,0	
	pH	11,0	11,7	10,9	11,0
5	Sulfato, miscelânea e água		até 100 %		

EXEMPLO 38

As seguintes composições líquidas de lavar louças foram preparadas de acordo com a presente invenção

		I	II	III	IV	V
10	C17ES	28,5	27,4	19,2	34,1	34,1
	Óxido Amina	2,6	5,0	2,0	3,0	3,0
	C12 glicose amida	-	-	6,0	-	-
	Betaína	0,9	-	-	2,0	2,0
	Xileno sulfonato	2,0	4,0	-	2,0	-
15	Neodol C11E9	-	-	5,0	-	-
	Amida poliidroxi	-	-	-	6,5	6,5
	de ácido graxo					
	dietileno penta	-	-	0,03	-	-
	acetato de sódio (40 %)					
20	TAED	-	-	-	0,06	0,06
	Sacarose	-	-	-	1,5	1,5
	Etanol	4,0	5,5	5,5	9,1	9,1
	Óxido de Alquil	-	-	-	-	2,3
	difenil dissulfonato					
25	Formiato de Ca	-	-	-	0,5	1,1
	Citrato de amônio	0,06	0,1	-	-	-
	Cloreto de Na	-	1,0	-	-	-
	Cloreto de Mg	3,3	-	0,7	-	-
	Cloreto de Ca	-	-	0,4	-	-
30	Sulfato de Na	-	-	0,06	-	-
	Sulfato de Mg	0,08	-	-	-	-
	Hidróxido de Mg	-	-	-	2,2	2,2
	Hidróxido de Na	-	-	-	1,1	1,1
	Peróxido de hidrogênio	200 ppm	0,16	0,006	-	-
35	Mananase	0,001	0,05	0,001	0,001	0,015
	Protease	0,017	0,005	0,035	0,003	0,002
	Perfume	0,18	0,09	0,09	0,2	0,2
	Água e menores		até 100 %			

EXEMPLO 39

40 As seguintes composições líquidas de limpeza de superfície dura foram preparadas de acordo com a presente invenção

		I	II	III	IV	V
	Mananase	0,001	0,0015	0,0015	0,05	0,01
	Amilase	0,01	0,002	0,005	-	-
45	Protease	0,05	0,01	0,02	-	-
	Peróxido	-	-	-	6,0	6,8
	de hidrogênio					
	Acetil trietil	-	-	-	2,5	-
	citrato					
50	DTPA	-	-	-	0,2	-
	Hidróxi Butila	-	-	-	0,05	-

	tolueno					
	EDTA*	0,05	0,05	0,05		
	Cítrico / Citrato	2,9	2,9	2,9	1,0	
	LAS	0,5	0,5	0,5	-	
5	C12 AS	0,5	0,5	0,5	-	-
	C10AS	-	-	-	-	1,7
	C12 (E) S	0,5	0,5	0,5	-	-
	C12,13 E6,5	7,0	7,0	7,0	-	-
	não iônico					
10	Neodol 23-6,5	-	-	-	12,0	-
	Dobanol 23-3	-	-	-	-	1,5
	Dobanol 91-10	-	-	-	-	1,6
	C25AE1,8S	-	-	-	6,0	
	parafina	-	-	-	6,0	
15	sulfonato de Na					
	Perfume	1,0	1,0	1,0	0,5	0,2
	Propanodiol	-	-	-	1,5	
	tetraetileno	-	-	-	1,0	-
	pentamina					
20	Etoxilado					
	2. Butil octanol	-	-	-	-	0,5
	Hexil carbitol**	1,0	1,0	1,0	-	-
	SCS	1,3	1,3	1,3	-	-
	pH ajustado para	7-12	7-12	7-12	4	-
25	Miscelânea e água		até 100 %			

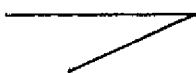
* ácido Na₄ etilenodiamino diacético

** Éter monoexílico de dietileno glicol

EXEMPLO 40

30 As seguintes composições de pulverização para limpeza de
superfícies dura e remoção de mofo doméstico foram preparadas de acordo
com a presente invenção

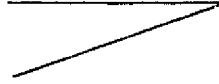
	Mananase	0,01
	Amilase	0,01
	Protease	0,01
35	octil sulfato Na	2,0
	dodecil sulfato Na	4,0
	hidróxido de Na	0,8
	Silicato	0,04
	Butil carbitol*	4,0
40	Perfume	0,35



Água/menores

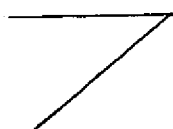
até 100 %

*Éter monobutílico de dietileno glicol



LITERATURA

- Aviv, H. & Leder, P. 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69 1408 a 1412
- Becker, D. M. & Guarante, L. 1991, Methods Enzymol. 194: 182 a 187.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. 1979,
5 Biochemistry 18: 5294 a 5299.
- Gubler, U. & Hoffman, B. J. 1983, Gene 25: 263 a 269.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning: A
Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
10 74: 5463 a 5467.
- Lever, M. (1972) A new reaction for colormetric determination of
carbohydrates, Anal. Biochem. 47, 273 a 279.
- N. C. Carpita e D. M. Gibeaut (1993) The Plant Journal 3: 1 a 30.
- Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjöholm, C.
15 (1990) Cloning of aldB, which encodes alphaacetolactate decarboxylase, an
exoenzyme from Bacillus brevis, J. Bacteriol. 172: 4315 a 4321.



REIVINDICAÇÕES

1. Composição de limpeza, caracterizada pelo fato de que compreende mananase, que consiste em um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos como mostrada nas posições 31-330 de SEQ
5 ID NO:2, em que a dita enzima ou preparação de enzima está presente a um nível de 0,0001% a 2%, preferivelmente de 0,0005% a 0,5%, mais preferivelmente de 0,001% a 0,1% da enzima pura em peso da composição total, dita composição de limpeza compreendendo ainda uma enzima selecionada de celulasas, proteases, lipases, amilases, enzimas que degradam
10 a pectina e xiloglucanases; e ingrediente detergente convencional.

2. Composição de limpeza de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a enzima é uma amilase.

3. Composição de limpeza de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que ainda compreende uma outra enzima
15 selecionada de celulase, protease, lipase, enzima que degrada a pectina e xiloglucanase.

4. Composição de limpeza de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um tensoativo selecionado de tensoativo aniônico, não iônico, catiônico e/ou misturas destes.

20 5. Composição de limpeza de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um agente de branqueamento.

6. Composição de limpeza de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um formador.

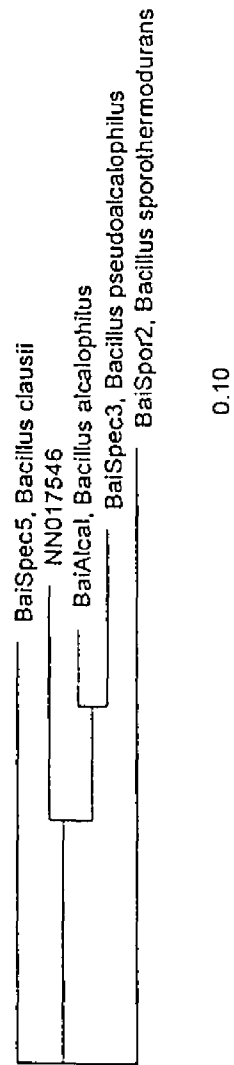
7. Composição de limpeza de acordo com a reivindicação 1, caracterizada
25 caracterizada pelo fato de que compreende um tensoativo catiônico que compreende dois comprimentos de cadeia longa.

8. Processo para tratar tecidos a máquina, caracterizado pelo fato de que compreende tratar o tecido durante um ciclo de lavagem de um processo de máquina de lavar com uma mananase que consiste em um

polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos como mostrada nas posições 31-330 de SEQ ID NO:2, ou com uma composição de limpeza como definida na reivindicação 1.

5 9. Uso de uma mananase isolada que consiste em um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos como mostrada nas posições 31-330 de SEQ ID NO:2, junto com uma enzima selecionada de celulase, protease, lipase, amilase, enzima que degrada a pectina e xiloglucanase, caracterizado pelo fato de que é em uma composição de limpeza para limpar tecido e/ou para remover manchas em tecido.

10 10. Uso de uma mananase isolada que consiste em um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos como mostrada nas posições 31-330 de SEQ ID NO:2, junto com uma enzima selecionada de celulase, protease, lipase, amilase, enzima que degrada a pectina e xiloglucanase, caracterizado pelo fato de que é em uma composição de
15 limpeza para lavagem de louças manual e a máquina.

**Fig. 1**

0.10

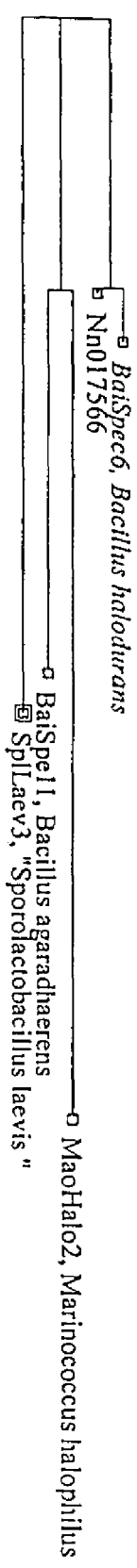
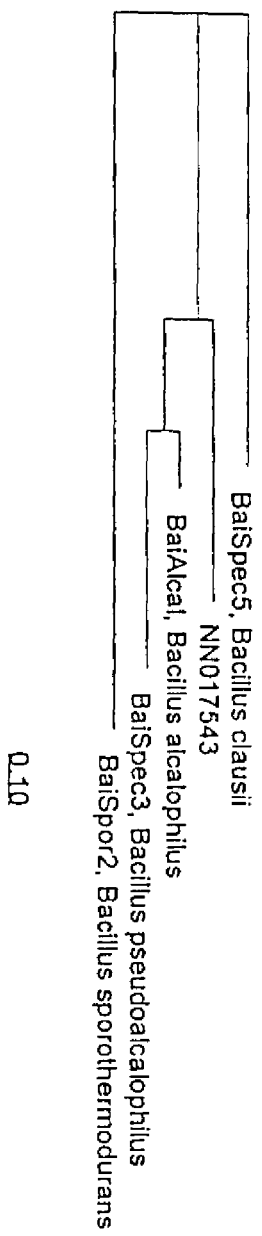


Fig. 2

Fig. 3



RESUMO

"COMPOSIÇÃO DE LIMPEZA, PROCESSO PARA TRATAR TECIDOS A MÁQUINA, E USO DE UMA MANANASE".

As novas mananases que compreendem, por exemplo, uma
5 sequência de aminoácido como mostrado nas posições de 31 a 330 da SEQ
ID NO: 2 ou seus homólogos, podem ser derivadas, por exemplo, do *Bacillus*
sp. 1633 ou podem ser codificadas por moléculas de polinucleotídeos que
compreendam uma sequência de nucleotídeos como mostrado na SEQ ID
NO: 1, do nucleotídeo 91 ao nucleotídeo 990, moléculas de polinucleotídeos
10 que codificam um polipeptídeo que seja pelo menos 65 % idêntico à
sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2, do resíduo de aminoácido 31 ao
resíduo de aminoácido 330 ou suas sequências degeneradas de nucleotídeo.
As mananases são alcalinas e são utilizáveis, por exemplo, em composições
de limpeza, em um fluido de ruptura utilizável para romper uma formação
15 subterrânea, para modificar um material vegetal e para o tratamento de fibras
celulósicas.

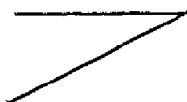
LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> NOVO NORDISK A/S
 <120> NOVAS MANANASES
 <130> 5440-wo
 5 <140>
 <141>
 <160> 34
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 10 <211> 1470
 <212> DNA
 <213> Bacillus sp. I633
 <400> 1

```

ttgaataatg gttttaaaaa aattttttct ataacattat cttactatt agctagctct 60
attctgttcg tttcaggaac ttctacagct aatgcaaatt ccggatttta tgtaagecgt 120
accactctat acgatgccaa tggaaaccca tttgtaatga gagggattaa ccatgggcac 180
gcatggtata aagaccaggc aactactgca attgaaggga ttgcaaatac cgttgctaat 240
acggtccgga ttgtgttata tgatggggga caatgggaca aagatgacat ccatacagta 300
agaaacctta tctcttttagc ggaagataat catttggttg ctgttcttga agttcatgat 360
gctaccggtt atgattccat tgcctcgctc aatcgctgctg ttgattattg gattgaaatg 420
agaagtgcct taattggaaa ggaagatacc gtcattatta atattgcaa tgaatgggtt 480
ggttcgtggg aaggggatgc ttgggctgac ggggtataaac aagcaatccc gcgattgcgt 540
aacgccggtc taaaccatac cttgatggta gatgctgagg ggtggggaca atttccacaa 600
tcgattcatg attatggaag agaagttttt aatgctgacc ctcaacgaaa tacaatgttt 660
tcgattcata tgtatgaata tgcaggtggt aatgcatcgc aagtctgtac taatattgac 720
cgagttctta atcaagacct cgcattagtc attggtgaat ttggacaccg tcatacaaat 780
ggtagcgtcg atgaagcaac gattatgagc tattctgaac aaagaggagt tgggtggttg 840
gcgtggcatg ggaaagggaa cggcccagaa tgggagttat tagaccttc gaatgattgg 900
gctggaaata accttacagc ttggggaaat acaatagtga atgggtccata tggtttaaga 960
gaaacttcga gattaagcac cgtttttaca ggtggaggat ctgatggagg aacttctccg 1020
acaactcttt atgattttga aggtagtatg caaggatgga ctggaagtag cttgagcgga 1080
ggtccttggg ctgtgacaga gtggtcttct aaaggaaagtc attctttaaa agcggatatt 1140
caattgtcgt caaattcaca acattactta catgttatcc aaaatacgtc tttacagcag 1200
aatagtagga tacaagctac tgttaaacaat gcaaattggg gaagtgttgg taatggaatg 1260
actgcgcgtc tttatgtgaa aacaggacat ggttatacat ggtactctgg aagctttgtg 1320
ccgattaacg gttcatctgg aacaacgcta tctctagatt tatcaaagt ccaaaatctt 1380
tctcaagtaa gggaaattgg agttcagttc caatcagcga gtgatagtag tggacaaaca 1440
tcgatttata ttgataatgt gattgtagaa 1470

```



<210> 20

<211> 490

<212> PRT

<213> Bacillus sp. I633

<400> 2

Leu Asn Asn Gly Phe Lys Lys Ile Phe Ser Ile Thr Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Ser Ser Ile Leu Phe Val Ser Gly Thr Ser Thr Ala Asn Ala
 20 25 30

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

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

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

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

Ile His Thr Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Asp Asn His Leu
 100 105 110

Val Ala Val Pro Glu Val His Asp Ala Thr Gly Tyr Asp Ser Ile Ala
 115 120 125

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

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

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

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

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

Val Phe Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
 210 215 220

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

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

Arg His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr Ser
 260 265 270.
 Glu Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly
 275 280 285
 Pro Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ala Gly Asn Asn
 290 295 300
 Leu Thr Ala Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Gly Pro Tyr Gly Leu Arg
 305 310 315 320
 Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Gly Gly Gly Ser Asp Gly
 325 330 335
 Gly Thr Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Met Gln Gly
 340 345 350
 Trp Thr Gly Ser Ser Leu Ser Gly Gly Pro Trp Ala Val Thr Glu Trp
 355 360 365
 Ser Ser Lys Gly Ser His Ser Leu Lys Ala Asp Ile Gln Leu Ser Ser
 370 375 380
 Asn Ser Gln His Tyr Leu His Val Ile Gln Asn Thr Ser Leu Gln Gln
 385 390 395 400
 Asn Ser Arg Ile Gln Ala Thr Val Lys His Ala Asn Trp Gly Ser Val
 405 410 415
 Gly Asn Gly Met Thr Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly His Gly Tyr
 420 425 430
 Thr Trp Tyr Ser Gly Ser Phe Val Pro Ile Asn Gly Ser Ser Gly Thr
 435 440 445
 Thr Leu Ser Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Arg
 450 455 460
 Glu Ile Gly Val Gln Phe Gln Ser Ala Ser Asp Ser Ser Gly Gln Thr
 465 470 475 480
 Ser Ile Tyr Ile Asp Asn Val Ile Val Glu
 485 490

<210> 3
 <211> 1438
 <212> DNA
 <213> Bacillus sp. I633

5 <440> 3

```

gcaaattccg gattttatgt aagcgggtacc actctatacg atgccaatgg aaaccatttt 60
gtaatgagag ggattaacca tgggcacgca tgggtataaag accaggcaac tactgcaatt 120
gaagggattg caaataccgg tgctaatacg gtccggattg tgttatctga tgggggacaa 180
tggaacaaaag atgacatcca tacagtaaga aaccttatct ctttagcgga agataatcat 240
ttgggttgctg ttccctgaagt tcatgatgct accggttatg attccattgc ttcgctcaat 300
cgtgctgttg attattggat tgaaatgaga agtgctttta ttggaaagga agataccgtc 360
attattaata ttgcgaatga atgggtttgg tctgtgggaag gggatgcttg ggctgacggg 420
tataaacaag caatcccggg attgcgtaac gccggtctaa accatacctt gatggtagat 480
gctgccccggg ggggacaatt tccacaatcg attcatgatt atggaagaga agtttttaat 540
gctgaccctc aacgaaatac aatgttttcg attcatatgt atgaatatgc aggtggtaat 600
gcacgcgaag ttcgtactaa tattgaccga gttcttaatc aagacctcgc attagtcatt 660
ggtgaatttg gacaccgtca tacaatggg gacgtcgatg aagcaacgat tatgagctat 720
tctgaacaaa gaggagtggg gtgggttggc tgggtcatgga aagggaaagg cccagaatgg 780
gagtatttag acctttcgaa tgattgggct ggaaataacc ttacagcttg gggaaataca 840
atagtgaatg gtccatatgg ttttaagaga acttcgagat taagcaccgt ttttacagct 900
agcccggaac caacaccaga gccgaccgca aatacaccgg tatcaggcaa tttgaagggt 960
gaattctaca acagcaatcc ttcagatact actaactcaa tcaatcctca gttcaagggt 1020
actaataccg gaagcagtgc aattgatttg tccaaactca cattgagata ttattataca 1080
gtagacggac agaaagatca gaccttctgg tgtgaccatg ctgcaataat cggcagtaac 1140
ggcagctaca acggaattac ttcaaagtga aaaggaacat ttgtaaaaat gagttcctca 1200
acaaataacg cagacacctt ccttgaaata agctttacag gcggaactct tgaaccgggt 1260
gcacatgttc agatacaagg tagatttgca aagaatgact ggagtaacta tacacagtca 1320
aatgactact cattcaagtc tcttcacag tttgttgaat gggatcagggt aacagcatac 1380
ttgaacgggtg ttcttgtatg gggtaaagaa cccggtggca gtgtagtata gcggccgc 1438

```

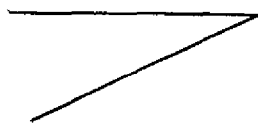
<210> 4

<211> 476

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 4



Ala	Asn	Ser	Gly	Phe	Tyr	Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Asn	1	5	10	15
Gly	Asn	Pro	Phe	Val	Met	Arg	Gly	Ile	Asn	His	Gly	His	Ala	Trp	Tyr	20	25	30	
Lys	Asp	Gln	Ala	Thr	Thr	Ala	Ile	Glu	Gly	Ile	Ala	Asn	Thr	Gly	Ala	35	40	45	
Asn	Thr	Val	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Gly	Gln	Trp	Thr	Lys	Asp	50	55	60	
Asp	Ile	His	Thr	Val	Arg	Asn	Leu	Ile	Ser	Leu	Ala	Glu	Asp	Asn	His	65	70	75	80
Leu	Val	Ala	Val	Pro	Glu	Val	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Tyr	Asp	Ser	Ile	85	90	95	
Ala	Ser	Leu	Asn	Arg	Ala	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Glu	Met	Arg	Ser	Ala	100	105	110	
Leu	Ile	Gly	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Ile	Ile	Asn	Ile	Ala	Asn	Glu	Trp	115	120	125	
Phe	Gly	Ser	Trp	Glu	Gly	Asp	Ala	Trp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	Gln	Ala	130	135	140	
Ile	Pro	Arg	Leu	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Asn	His	Thr	Leu	Met	Val	Asp	145	150	155	160
Ala	Ala	Gly	Trp	Gly	Gln	Phe	Pro	Gln	Ser	Ile	His	Asp	Tyr	Gly	Arg	165	170	175	
Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Asp	Pro	Gln	Arg	Asn	Thr	Met	Phe	Ser	Ile	His	180	185	190	
Met	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Gln	Val	Arg	Thr	Asn	Ile	195	200	205	
Asp	Arg	Val	Leu	Asn	Gln	Asp	Leu	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	Glu	Phe	Gly	210	215	220	
His	Arg	His	Thr	Asn	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Tyr	225	230	235	240
Ser	Glu	Gln	Arg	Gly	Val	Gly	Trp	Leu	Ala	Trp	Ser	Trp	Lys	Gly	Asn	245	250	255	
Gly	Pro	Glu	Trp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Asp	Trp	Ala	Gly	Asn	260	265	270	
Asn	Leu	Thr	Ala	Trp	Gly	Asn	Thr	Ile	Val	Asn	Gly	Pro	Tyr	Gly	Leu	275	280	285	



Arg Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Ala Ser Pro Glu Pro
 290 295 300
 Thr Pro Glu Pro Thr Ala Asn Thr Pro Val Ser Gly Asn Leu Lys Val
 305 310 315 320
 Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Pro Ser Asp Thr Thr Asn Ser Ile Asn Pro
 325 330 335
 Gln Phe Lys Val Thr Asn Thr Gly Ser Ser Ala Ile Asp Leu Ser Lys
 340 345 350
 Leu Thr Leu Arg Tyr Tyr Tyr Thr Val Asp Gly Gln Lys Asp Gln Thr
 355 360 365
 Phe Trp Cys Asp His Ala Ala Ile Ile Gly Ser Asn Gly Ser Tyr Asn
 370 375 380
 Gly Ile Thr Ser Asn Val Lys Gly Thr Phe Val Lys Met Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 Thr Asn Asn Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Ile Ser Phe Thr Gly Gly Thr
 405 410 415
 Leu Glu Pro Gly Ala His Val Gln Ile Gln Gly Arg Phe Ala Lys Asn
 420 425 430
 Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Lys Ser Arg
 435 440 445
 Ser Gln Phe Val Glu Trp Asp Gln Val Thr Ala Tyr Leu Asn Gly Val
 450 455 460
 Leu Val Trp Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Val Val
 465 470 475

<210> 5

<211> 1482

<212> DNA

<213> *Bacillus agaradhaerens*

<400> 5

atgaaaaaaa agttatcaca gatttatcat ttaattattt gcacacttat aataagtgtg 60
 ggaataatgg ggattacaac gtcccatca gcagcaagta caggctttta tgttgatggc 120
 aatacgttat atgacgcaaa tgggcagcca tttgtcatga gaggtattaa ccatggacat 180
 gcttgggtata aagacacggc ttcaacagct attcctgccca ttgcagagca aggcgccaac 240
 acgattcgta ttgtttttatc agatggcggt caatgggaaa aagacgacat tgacaccatt 300
 cgtgaagtca ttgagcttgc ggagcaaaat aaaatgggtg ctgtcgttga agttcatgat 360
 gccacgggtc gcgattcgcg cagtgattta aatcgagccg ttgattattg gatagaaatg 420
 aaagatgcgc ttatcggtaa agaagatacg gttattatta acattgcaaa cgagtgggtat 480
 gggagttggg atggctcagc ttgggcccgat ggctatattg atgtcattcc gaagcttcgc 540
 gatgccggct taacacacac cttaatgggt gatgcagcag gatgggggca atatccgcaa 600
 tctattcatg attacggaca agatgtgttt aatgcagatc cgttaaaaaa tacgatgttc 660
 tccatccata tgtatgagta tgctggtggt gatgctaaca ctgttagatc aaatattgat 720
 agagtcatag atcaagacct tgctctcgta ataggatgaat tcggtcatag acatactgat 780
 ggtgatgttg atgaagatac aatccttagt tattctgaag aaactggcac aggggtggctc 840
 gcttgggtctt ggaaaggcaa cagtaccgaa tgggactatt tagaccttc agaagactgg 900

gctgggtcaac atttaactga ttgggggaat agaattgtcc acggggccga tggcttacag 960
 gaaacctcca aaccatccac cgtatttaca gatgataacg gtggtcaccc cgaaccgccca 1020
 actgctacta ccttgatga ctttgaagga agcacacaag ggtggcatgg aagcaacgcg 1080
 accggtggcc cttgggtccgt aacagaatgg ggtgcttcag gtaactactc tttaaaagcc 1140
 gatgtaaatt taacctcaaa ttcttcacat gaactgtata gtgaacaaaag tcgtaatcta 1200
 cacggatact ctcagctcaa cgcaaccgtt cgccatgccca attggggaaa tcccggtaat 1260
 ggcataaatg caagacttta cgtgaaaacg ggctctgatt atacatggca tagcgggtcct 1320
 ttacacgta tcaatagctc caactcagga acaacgttat cttttgattt aaacaacatc 1380
 gaaaatagtc atcatgttag ggaaataggc gtgcaatttt cagcggcaga taatagcagt 1440
 ggtcaaaactg ctctatacgt tgataacgtt actttaagat ag 1482

<210> 6

<211> 493

<212> PRT

<213> Bacillus agaradhaerens.

5 <400> 6

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

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

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

7

Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Ser Asn Ile Asp
 225 230 235 240
 Arg Val Ile Asp Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His
 245 250 255
 Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr Ser
 260 265 270
 Glu Glu Thr Gly Thr Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser
 275 280 285
 Thr Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Glu Asp Trp Ala Gly Gln His
 290 295 300
 Leu Thr Asp Trp Gly Asn Arg Ile Val His Gly Ala Asp Gly Leu Gln
 305 310 315 320
 Glu Thr Ser Lys Pro Ser Thr Val Phe Thr Asp Asp Asn Gly Gly His
 325 330 335
 Pro Glu Pro Pro Thr Ala Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Thr
 340 345 350
 Gln Gly Trp His Gly Ser Asn Val Thr Gly Gly Pro Trp Ser Val Thr
 355 360 365
 Glu Trp Gly Ala Ser Gly Asn Tyr Ser Leu Lys Ala Asp Val Asn Leu
 370 375 380
 Thr Ser Asn Ser Ser His Glu Leu Tyr Ser Glu Gln Ser Arg Asn Leu
 385 390 395 400
 His Gly Tyr Ser Gln Leu Asn Ala Thr Val Arg His Ala Asn Trp Gly
 405 410 415
 Asn Pro Gly Asn Gly Met Asn Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser
 420 425 430
 Asp Tyr Thr Trp His Ser Gly Pro Phe Thr Arg Ile Asn Ser Ser Asn
 435 440 445
 Ser Gly Thr Thr Leu Ser Phe Asp Leu Asn Asn Ile Glu Asn Ser His
 450 455 460
 His Val Arg Glu Ile Gly Val Gln Phe Ser Ala Ala Asp Asn Ser Ser
 465 470 475 480
 Gly Gln Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr Leu Arg
 485 490



<210> 7

<211> 1407

<212> DNA

<213> *Bacillus agaradhaerens*

5 <400> 7

atgaaaaaaa agttatcaca gatttatcat ttaattatatt gcacacttat aataagtgtg 60

```

ggaataatgg ggattacaac gtcccatca gcagcaagta caggctttta tgttgatggc 120
aatacgttat atgacgcaaa tgggcagcca tttgtcatga gaggtattaa ccatggacat 180
gcttggtata aagacaccgc ttcaacagct attcctgcc a ttgcagagca aggcgccaac 240
acgattcgt a ttgtttttatc agatggcggc caatgggaaa aagacgacat tgacaccatt 300
cgtgaagtca ttgagcttgc ggagcaaaat aaaatgggtg ctgtcgttga agttcatgat 360
gccacgggtc gcgattcgcg cagtgattta aatcgagccg ttgattattg gatagaaatg 420
aaagatgcgc ttatcggtaa agaagatacg gttattatta acattgcaaa cgagtgggtat 480
gggagttggg atggctcagc ttgggcccga ggctatattg atgtcattcc gaagcttcgc 540
gatgccggct taacacacac cttaatgggt gatgcagcag gatgggggca atatccgcaa 600
tctattcatg attacggaca agatgtgttt aatgcagatc cgttaaaaaa tacgatgttc 660
tccatccata tgtatgagta tgctggtggt gatgctaaca ctgttagatc aaatattgat 720
agagtcatag atcaagacct tgctctcgta atagggtgaat tcggtcatag acatactgat 780
ggtgatgttg atgaagatac aatccttagt tattctgaag aaactggcac aggggtggctc 840
gcttggtctt ggaaaggcaa cagtaccgaa tgggactatt tagaccttc agaagactgg 900
gctggtcaac atttaactga ttgggggaat agaattgtcc acggggccga tggcttacag 960
gaaacctcca aaccatccac cgtatttaca gatgataacg gtggtcacc tgaaccgcca 1020
actgctacta ccttgatga ctttgaagga agcacacaag ggtggcatgg aagcaacgtg 1080
accggtggcc cttggtccgt aacagaatgg ggtgcttcag gtaactactc tttaaaagcc 1140
gatgtaaatt taacctcaa ttcttcacat gaactgtata gtgaacaaag tcgtaatcta 1200
cacggatact ctacgtcaa cgcaaccgtt cgccatgcc a attggggaaa tcccggtaat 1260
ggcatgaatg caagacttta cgtgaaaacg ggctctgatt atacatggca tagcggtcct 1320
tttacacgta tcaatagctc caactcagga acaacgttat cttttgattt aaacaacatc 1380
gaaaatatca tcatgttagg gaaatag 1407

```

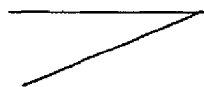
<210> 8

<211> 468

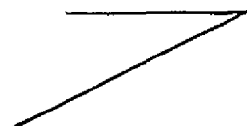
<212> PRT

10 <213> *Bacillus agaradhaerens*

<400> 8



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



Gly Ser Trp Asp Gly Ser Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Val Ile
 165 170 175
 Pro Lys Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala
 180 185 190
 Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Asp
 195 200 205
 Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
 210 215 220
 Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Ser Asn Ile Asp
 225 230 235 240
 Arg Val Ile Asp Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His
 245 250 255
 Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr Ser
 260 265 270
 Glu Glu Thr Gly Thr Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser
 275 280 285
 Thr Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Glu Asp Trp Ala Gly Gln His
 290 295 300
 Leu Thr Asp Trp Gly Asn Arg Ile Val His Gly Ala Asp Gly Leu Gln
 305 310 315 320
 Glu Thr Ser Lys Pro Ser Thr Val Phe Thr Asp Asp Asn Gly Gly His
 325 330 335
 Pro Glu Pro Pro Thr Ala Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Thr
 340 345 350
 Gln Gly Trp His Gly Ser Asn Val Thr Gly Gly Pro Trp Ser Val Thr
 355 360 365
 Glu Trp Gly Ala Ser Gly Asn Tyr Ser Leu Lys Ala Asp Val Asn Leu
 370 375 380
 Thr Ser Asn Ser Ser His Glu Leu Tyr Ser Glu Gln Ser Arg Asn Leu
 385 390 395 400
 His Gly Tyr Ser Gln Leu Asn Ala Thr Val Arg His Ala Asn Trp Gly
 405 410 415
 Asn Pro Gly Asn Gly Met Asn Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser
 420 425 430
 Asp Tyr Thr Trp His Ser Gly Pro Phe Thr Arg Ile Asn Ser Ser Asn
 435 440 445
 Ser Gly Thr Thr Leu Ser Phe Asp Leu Asn Asn Ile Glu Asn Ile Ile
 450 455 460
 Met Leu Gly Lys
 465

<210> 9

<211> 1761

<212> DNA

<213> *Bacillus halodurans*

5 <400> 9

```

atgaaaagta taaagaaatt ggtagtcggt tgcattggcat ttctattaat ttttccatcg 60
acgtcatttg ctttttcttg aagcgtttca gcttcagggtc aagagcttaa aatgacagat 120
caaaacgcat ctcaatatac aaaagagttg tttgcctttt tacgtgatgt aagtggtaaa 180
caagttttat ttggtcaaca acacgcaact gatgagggtat taacacttag aggaacaggt 240
aaccgaattg gttcaacaga atcagaagtg aaaaatgctg ttggtgatta tcctgctggt 300
tttggttggg atacaaacag tctagatggt agagaaaagc cgggtaatga tgaaccgagt 360
caagaacaaa gaatcttaaa tacagcagct tcaatgaagg cagctcacga cttagggtggg 420
attatcacac taagtatgca tcctgataac tttgtaacag gaggggctta tggecagata 480
actggaaatg ttgtacaaga aattcttctt ggtggatcaa agcatgaaga attcaatgca 540
tggttggata acctagcggc tttagctcac gaattaaagg atgacaacgg gaaacacatt 600
ccaattattt tccgtccttt ccatgagcaa acaggttctt ggttctgggt gggagcaagc 660
acaacaactc cagaacagta taaagctatt tacagatata cggttgaata cttacgtgac 720
gtaaaaggag caaacaactt cttatacggg ttttctcttg gtgcagggtc agctggcgat 780
ttaaatcggt atatggaaac ttaccttggg gatgattatg tcgatatctt tggatttgat 840
aactatgaca ataaatcaaa tgctggatca gaagcttggg tacaagggtg tgaaccgat 900
ttagctatgc ttggtgattt agctgaagaa aaaggaaaag ttgctgcgtt taccgagtat 960
ggttacagtg caacagggtat gaatcgtact ggtaacacat tggattggta tactcgttta 1020
cttaatgcaa taaaagaaga tccaaaagca agtaagattt cttacatgct tacatgggca 1080
aactttggtt tcoctaacaa tatgtatggt cttacaaag acattcacgg tgatttaggt 1140
ggagatcatg aactccttcc agatttcac aaattttttg aagatgatta ctacgcttcc 1200
acaggagata tcaagggaag tgtgtatgat acaggaattg aatatactgt agcaccacat 1260
gaacgtttta tgtatgtgct ttcgcttatt actggaacaa cgataacaga tactgtttaca 1320
ttacgagcta aagtattaaa cgatgataac gcagttgtta cgtacagggt tgaaggttct 1380
gacgttgaac atgaaatgac gttagctgac tcgggatact acacagctaa gtattctccg 1440
acggcagaag taaatggttg atcagttgat ttaacagtta cgtactgggtc tggagaagaa 1500
aaagtacaag atgaagtgat tagactttat gtaagggtt cagaaatctc actttacaag 1560
cttacgtttg atgaggatat taatggaatt aagtcgaatg gcacttggcc tgaagatggt 1620
attacatctg acgtttctca tgtcagtttt gacggaaatg ggaattgaa gtttgcagtt 1680
aatggaatgt catccgaaga gtggtggcaa gaacttaaat tagaattaac agatctttct 1740
gatgtgaatt tagccaagta a 1761

```

<210> 10

<211> 586

<212> PRT

<213> *Bacillus halodurans*

10 <400> 10

```

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

```

```

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

```

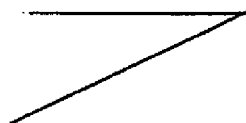
```

Gly Gln Glu Leu Lys Met Thr Asp Gln Asn Ala Ser Gln Tyr Thr Lys
          35             40             45

```

Glu Leu Phe Ala Phe Leu Arg Asp Val Ser Gly Lys Gln Val Leu.Phe
 50 55 60
 Gly Gln Gln His Ala Thr Asp Glu Gly Leu Thr Leu Arg Gly Thr Gly
 65 70 75 80
 Asn Arg Ile Gly Ser Thr Glu Ser Glu Val Lys Asn Ala Val Gly Asp
 85 90 95
 Tyr Pro Ala Val Phe Gly Trp Asp Thr Asn Ser Leu Asp Gly Arg Glu
 100 105 110
 Lys Pro Gly Asn Asp Glu Pro Ser Gln Glu Gln Arg Ile Leu Asn Thr
 115 120 125
 Ala Ala Ser Met Lys Ala Ala His Asp Leu Gly Gly Ile Ile Thr Leu
 130 135 140
 Ser Met His Pro Asp Asn Phe Val Thr Gly Gly Ala Tyr Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Thr Gly Asn Val Val Gln Glu Ile Leu Pro Gly Gly Ser Lys His Glu
 165 170 175
 Glu Phe Asn Ala Trp Leu Asp Asn Leu Ala Ala Leu Ala His Glu Leu
 180 185 190
 Lys Asp Asp Asn Gly Lys His Ile Pro Ile Ile Phe Arg Pro Phe His
 195 200 205
 Glu Gln Thr Gly Ser Trp Phe Trp Trp Gly Ala Ser Thr Thr Thr.Pro
 210 215 220
 Glu Gln Tyr Lys Ala Ile Tyr Arg Tyr Thr Val Glu Tyr Leu Arg Asp
 225 230 235 240
 Val Lys Gly Ala Asn Asn Phe Leu Tyr Gly Phe Ser Pro Gly Ala Gly
 245 250 255
 Pro Ala Gly Asp Leu Asn Arg Tyr Met Glu Thr Tyr Pro Gly Asp Asp
 260 265 270
 Tyr Val Asp Ile Phe Gly Ile Asp Asn Tyr Asp Asn Lys Ser Asn Ala
 275 280 285
 Gly Ser Glu Ala Trp Ile Gln Gly Val Val Thr Asp Leu Ala Met Leu
 290 295 300
 Val Asp Leu Ala Glu Glu Lys Gly Lys Ile Ala Ala Phe Thr Glu.Tyr
 305 310 315 320
 Gly Tyr Ser Ala Thr Gly Met Asn Arg Thr Gly Asn Thr Leu Asp Trp
 325 330 335
 Tyr Thr Arg Leu Leu Asn Ala Ile Lys Glu Asp Pro Lys Ala Ser Lys
 340 345 350

Ile Ser Tyr Met Leu Thr Trp Ala Asn Phe Gly Phe Pro Asn Asn Met
 355 360 365
 Tyr Val Pro Tyr Lys Asp Ile His Gly Asp Leu Gly Gly Asp His Glu
 370 375 380
 Leu Leu Pro Asp Phe Ile Lys Phe Phe Glu Asp Asp Tyr Ser Ala Phe
 385 390 395 400
 Thr Gly Asp Ile Lys Gly Asn Val Tyr Asp Thr Gly Ile Glu Tyr Thr
 405 410 415
 Val Ala Pro His Glu Arg Leu Met Tyr Val Leu Ser Pro Ile Thr Gly
 420 425 430
 Thr Thr Ile Thr Asp Thr Val Thr Leu Arg Ala Lys Val Leu Asn Asp
 435 440 445
 Asp Asn Ala Val Val Thr Tyr Arg Val Glu Gly Ser Asp Val Glu His
 450 455 460
 Glu Met Thr Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Tyr Thr Ala Lys Tyr Ser Pro
 465 470 475 480
 Thr Ala Glu Val Asn Gly Gly Ser Val Asp Leu Thr Val Thr Tyr Trp
 485 490 495
 Ser Gly Glu Glu Lys Val Gln Asp Glu Val Ile Arg Leu Tyr Val Lys
 500 505 510
 Ala Ser Glu Ile Ser Leu Tyr Lys Leu Thr Phe Asp Glu Asp Ile Asn
 515 520 525
 Gly Ile Lys Ser Asn Gly Thr Trp Pro Glu Asp Gly Ile Thr Ser Asp
 530 535 540
 Val Ser His Val Ser Phe Asp Gly Asn Gly Lys Leu Lys Phe Ala Val
 545 550 555 560
 Asn Gly Met Ser Ser Glu Glu Trp Trp Gln Glu Leu Lys Leu Glu Leu
 565 570 575
 Thr Asp Leu Ser Asp Val Asn Leu Ala Lys
 580 585



<210> 11

<211> 995

<212> DNA

<213> Bacillus sp. AAI12

5 <400> 11

```

gtgtataagc ttaccatac gtattttggt gcgttaattt gttctatattt gatctttgct 60
ggggttttta atacttcttc ttcacaagca gaagcccatc acagtggggt ccatgttaat 120
ggtacaacat tatatgatgc aaatggaaac ccttttggtt tgagagggat taatcatgga 180
catgcttggt ttaaacaaga actagaaaca tccatgagag ggattagtca aacaggggca 240
aatacgattc gtgtcgtttt gtctaatggg caaagatggc aaaaagatga tcgaaacatg 300
gtagcttcgg ttatttcttt ggcagagcag catcaaatga ttgccgtttt agaagtccat 360
gatgctactg gtagcaataa tttctccgat ctgcaagctg ctgtggacta ttggattgag 420
atgaaggatg ttttgcaggg gaaagaggac atagtgatca ttaatatcgc caatgaatgg 480
tacgggtgctt gggacggagg cgcattggga cgagggtatc agaatgcgat acgtcagctt 540
cgaaatgcag gcttgtcaca tacatttatg gttgacgctg ccggttatgg ccagtaccct 600
caatcggtag ttgattatgg tcaagaagta ttaaagtctg acccacagag aaacacaatg 660
ttttctgttc atatgtatga atatgcaggg ggagatgcta atacagtaag acgaaacatt 720
gactcgatct taagccagaa cttagctctt gtcattgggtg aattcgggca ttggcattat 780
gacgggtgatg ttgatgagga caccatttta agctattcac agcaaagaaa tgtgggatgg 840

ttggcggtgga gctggcatgg caatagtga ggggtcgaat atcttgattt atcgaatgac 900
tttgctggta atcgactgac atgggtgggt gatcgaatag taaacgggtc gaatgggatt 960
cgtcaaacct ctaaaagaag cagtgtgttt caata 995

```

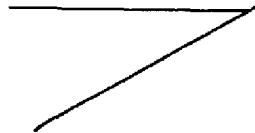
<210> 12

<211> 331

<212> PRT

<213> Bacillus sp. AAI12

10 <400> 12



Val Tyr Lys Leu Thr His Thr Tyr Phe Val Ala Leu Ile Cys Ser Ile
 1 5 10 15
 Leu Ile Phe Ala Gly Val Leu Asn Thr Ser Ser Ser Gln Ala Glu Ala
 20 25 30
 His His Ser Gly Phe His Val Asn Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Asn
 35 40 45
 Gly Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Phe
 50 55 60
 Lys Gln Glu Leu Glu Thr Ser Met Arg Gly Ile Ser Gln Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Asn Thr Ile Arg Val Val Leu Ser Asn Gly Gln Arg Trp Gln Lys Asp
 85 90 95
 Asp Arg Asn Met Val Ala Ser Val Ile Ser Leu Ala Glu Gln His Gln
 100 105 110
 Met Ile Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asn Asn Phe
 115 120 125
 Ser Asp Leu Gln Ala Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Val
 130 135 140
 Leu Gln Gly Lys Glu Asp Ile Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp
 145 150 155 160
 Tyr Gly Ala Trp Asp Gly Gly Ala Trp Ala Arg Gly Tyr Gln Asn Ala
 165 170 175
 Ile Arg Gln Leu Arg Asn Ala Gly Leu Ser His Thr Phe Met Val Asp
 180 185 190
 Ala Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Val Val Asp Tyr Gly Gln
 195 200 205
 Glu Val Leu Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Val His
 210 215 220
 Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Arg Asn Ile
 225 230 235 240
 Asp Ser Ile Leu Ser Gln Asn Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly
 245 250 255
 His Trp His Tyr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr

260	265	270
Ser Gln Gln Arg Asn Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp His Gly Asn		
275	280	285
Ser Glu Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Phe Ala Gly Asn		
290	295	300
Arg Leu Thr Trp Trp Gly Asp Arg Ile Val Asn Gly Pro Asn Gly Ile		
305	310	315
Arg Gln Thr Ser Lys Arg Ser Ser Val Phe Gln		
325	330	

<210> 13

<211> 1464

<212> DNA

<213> Humicola insolens

5 <400> 13

```

atggcaaagg ctctgaagta ctttgccctgg ggccttgctg ccctggcctc gggcgctgtt 60
gcgcctcctt actgtgctcc ccagccgtcg acaacctctc aggagcctac gagcactccg 120
tcgcctgtgc ccggtccgcg gaccttcgaa gccgaggatg ccctcctcac gggcacgagg 180
gttgagtcca gctcgcgcg ctactctggt accggatatg tagcgggctt cgacgagccc 240
agtgaacaaga tcacgttcca cgtggacagc gagaccacac ggctgtacga cctcaccatc 300
cgcgtggcgc ccactctatgg cgagaagcgc accaccgtcg tgctcaataa cggcgcgagg 360
agtgagggtc acttcccggc aggcgattcg ttctcgaca tcgctgcgcg ccaggctcctg 420
ctgaaccagg gcgacaacac catcgacatt gtcaacaact ggggatggta cctgatcgac 480
tccatcacca tcacccccctc cgcgccgcga cccctcacc aaatcaacc ttccccctc 540
aaccctgcgc ccgacgacaa cgcgcgggcg ttgtacgcat acctccgctc catctacggc 600
aagaaaaatc tttccggcca gcaggagctt tcctgggcca actggatcgc ccaacagacg 660
ggcaaaaact ccgcgctggt gtccgtcgat atgatggatt attcccctag tcgggtggaa 720
agaggcactg tcgggtctgc cgtcgaggag gccatcgagc atcacccgcg cggcggcatt 780
gtctcgggtg ttgtggcactg gaacgcgccc acggggctgt acgacacgcc cgagcgccgg 840
tggtggagcg ggtttctacac ggacgcgacc gactttgacg tcgcgcgggc gctggcggat 900
acgacgaatg ccaactacac gctgctgata cgggatatcg acgcgatcgc ggtgcagctc 960
aagaggttgc gggacgcggg cgtgccggtg ctttggcgcc cgtgcacga ggccgagggc 1020
ggttggtttt ggtggggagc gaaggggccg gaggcataca agaagctgtg ggggattctg 1080
tatgaccgac tcacgaacta ccattgggctg aataacctgc tgtgggtgtg gaactcgatc 1140
ctacccgagt ggtatcccgg agacgaaaca gtagacattg tcagcgcgga cgtgtacgcg 1200
cagggtaatg ggcccatgtc gacgcagtat aaccagctca tcgagctggg caaggacaag 1260
aagatgatcg cggcgactga ggtcggggcc gcgcgcgtgc cggacctgtt gcaggcctat 1320
gaggctcact ggttgtggtt cgtgttttgg ggagacagc tcacaaaca ccctcagtgg 1380
aactcgatcg agacctgaa gacgatctac aatagcgact atgttctcac tctcgatgag 1440
attcaggggt ggaggaacgc gcaa

```

<210> 14

<211> 488

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<400> 14

```

Met Ala Lys Ala Leu Lys Tyr Phe Ala Trp Gly Leu Ala Ala Leu Ala
 1              5              10              15

Ser Gly Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Ala Pro Gln Pro Ser Thr Thr
      20              25              30

Ser Gln Glu Pro Thr Ser Thr Pro Ser Pro Val Pro Gly Pro Arg Thr
      35              40              45

Phe Glu Ala Glu Asp Ala Ile Leu Thr Gly Thr Arg Val Glu Ser Ser
      50              55              60

Leu Ala Gly Tyr Ser Gly Thr Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Glu Pro
      65              70              75              80

Ser Asp Lys Ile Thr Phe His Val Asp Ser Glu Thr Thr Arg Leu Tyr
      85              90              95

Asp Leu Thr Ile Arg Val Ala Ala Ile Tyr Gly Glu Lys Arg Thr Thr
      100             105             110

Val Val Leu Asn Asn Gly Ala Ala Ser Glu Val Tyr Phe Pro Ala Gly
      115             120             125

Asp Ser Phe Val Asp Ile Ala Ala Gly Gln Val Leu Leu Asn Gln Gly
      130             135             140

Asp Asn Thr Ile Asp Ile Val Asn Asn Trp Gly Trp Tyr Leu Ile Asp
      145             150             155             160

Ser Ile Thr Ile Thr Pro Ser Ala Pro Arg Pro Pro His Gln Ile Asn
      165             170             175

Pro Ser Pro Val Asn Pro Ala Ala Asp Asp Asn Ala Arg Ala Leu Tyr
      180             185             190

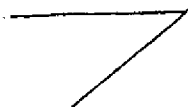
Ala Tyr Leu Arg Ser Ile Tyr Gly Lys Lys Ile Leu Ser Gly Gln Gln
      195             200             205

Glu Leu Ser Trp Ala Asn Trp Ile Ala Gln Gln Thr Gly Lys Thr Pro
      210             215             220

Ala Leu Val Ser Val Asp Met Met Asp Tyr Ser Pro Ser Arg Val Glu
      225             230             235             240

Arg Gly Thr Val Gly Ser Ala Val Glu Glu Ala Ile Glu His His Arg
      245             250             255

```



Arg Gly Gly Ile Val Ser Val Leu Trp His Trp Asn Ala Pro Thr Gly
 260 265 270

Leu Tyr Asp Thr Pro Glu Arg Arg Trp Trp Ser Gly Phe Tyr Thr Asp
 275 280 285

Ala Thr Asp Phe Asp Val Ala Arg Ala Leu Ala Asp Thr Thr Asn Ala
 290 295 300

Asn Tyr Thr Leu Leu Ile Arg Asp Ile Asp Ala Ile Ala Val Gln Leu
 305 310 315 320

Lys Arg Leu Arg Asp Ala Gly Val Pro Val Leu Trp Arg Pro Leu His
 325 330 335

Glu Ala Glu Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly Ala Lys Gly Pro Glu Ala
 340 345 350

Tyr Lys Lys Leu Trp Gly Ile Leu Tyr Asp Arg Leu Thr Asn Tyr His
 355 360 365

Gly Leu Asn Asn Leu Leu Trp Val Trp Asn Ser Ile Leu Pro Glu Trp
 370 375 380

Tyr Pro Gly Asp Glu Thr Val Asp Ile Val Ser Ala Asp Val Tyr Ala
 385 390 395 400

Gln Gly Asn Gly Pro Met Ser Thr Gln Tyr Asn Gln Leu Ile Glu Leu
 405 410 415

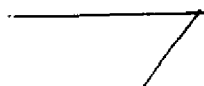
Gly Lys Asp Lys Lys Met Ile Ala Ala Thr Glu Val Gly Ala Ala Pro
 420 425 430

Leu Pro Asp Leu Leu Gln Ala Tyr Glu Ala His Trp Leu Trp Phe Ala
 435 440 445

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

Thr Leu Lys Thr Ile Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Leu Thr Leu Asp Glu
 465 470 475 480

Ile Gln Gly Trp Arg Asn Ala Gln
 485



<210> 15

<211> 1107

<212> DNA

<213> Bacillus sp. AA349

<400> 15

```

atgagaagta tgaagctttt atttgctatg tttatttttag ttttttccctc ttttactttt 60
aacttagtag ttgcgcaagc tagtggacat gggcaaatgc ataaagtacc ttgggcacca 120
caagctgaag cacctggaaa aacggctgaa aatggagtct gggataaagt tcgaaataat 180
cctggaaaag ccaatcctcc agcaggaaaa gtcaatgggt tttatataga tggacaacc 240
ttatatgatg caaatggtaa gccatttgtg atgcgtggaa ttaaccacgg tcattcatgg 300
tacaagcctc acatagaaac cgcgatggag gcaattgctg atactggagc aaactccatt 360
cgtgtagttc tctcagatgg acaacagtgg accaaagatg atgttgacga agtagcaaaa 420
attatatctt tagcagaaaa acattcctta gttgctgctc ttgagggtaca tgatgcactc 480
ggaacagatg atattgaacc attacttaaa acagttgatt actggattga gatcaaagat 540
gctttaatcg gaaaagagga caaagtaatt attaacattt ctaatgaatg gtttggttct 600
tgagcagtg aaggttgggc agatggatat aaaaaagcaa ttcctttact aagagaggcg 660
ggtctaaaac atacacttat ggttgacgca gctgggtggg gacaatttcc tagatctatt 720
catgaaaaag gattagaagt ttttaactca gaccattaa agaatacaat gttttccatt 780
catatgtatg aatgggcagc gggtaatcct caacaagtaa aagacaatat tgacggtggt 840
cttgaagaaga atttagctgt agtaattggt gagttcggtc atcatcacta cggagagat 900
gttgctgttg atacaatctt aagtcattct gagaagtatg atgtaggttg gcttgcttgg 960
tcttggcacg gaaatagtgg tgggtgtagg tatcttgact tagcaacaga tttctcaggg 1020
acacaactaa ctgaatgggg agaaagaatt gtacacggtc cgaatgggtt aaaagaaact 1080
tctgaaatcg ttagtgtata caaaaaa 1107

```

<210> 16

5 <211> 369

<212> PRT

<213> Bacillus sp. AA349

<400> 16



Met Arg Ser Met Lys Leu Leu Phe Ala Met Phe Ile Leu Val Phe Ser
 1 5 10
 Ser Phe Thr Phe Asn Leu Val Val Ala Gln Ala Ser Gly His Gly Gln
 20 25 30
 Met His Lys Val Pro Trp Ala Pro Gln Ala Glu Ala Pro Gly Lys Thr
 35 40 45
 Ala Glu Asn Gly Val Trp Asp Lys Val Arg Asn Asn Pro Gly Lys Ala
 50 55 60
 Asn Pro Pro Ala Gly Lys Val Asn Gly Phe Tyr Ile Asp Gly Thr Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Asp Ala Asn Gly Lys Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His
 85 90 95
 Gly His Ser Trp Tyr Lys Pro His Ile Glu Thr Ala Met Glu Ala Ile
 100 105 110
 Ala Asp Thr Gly Ala Asn Ser Ile Arg Val Val Leu Ser Asp Gly Gln
 115 120 125
 Gln Trp Thr Lys Asp Asp Val Asp Glu Val Ala Lys Ile Ile Ser Leu
 130 135 140
 Ala Glu Lys His Ser Leu Val Ala Ala Leu Glu Val His Asp Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Thr Asp Asp Ile Glu Pro Leu Leu Lys Thr Val Asp Tyr Trp Ile
 165 170 175
 Glu Ile Lys Asp Ala Leu Ile Gly Lys Glu Asp Lys Val Ile Ile Asn
 180 185 190
 Ile Ser Asn Glu Trp Phe Gly Ser Trp Ser Ser Glu Gly Trp Ala Asp
 195 200 205
 Gly Tyr Lys Lys Ala Ile Pro Leu Leu Arg Glu Ala Gly Leu Lys His
 210 215 220
 Thr Leu Met Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Arg Ser Ile
 225 230 235 240
 His Glu Lys Gly Leu Glu Val Phe Asn Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr
 245 250 255
 Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Trp Ala Ala Gly Asn Pro Gln Gln
 260 265 270
 Val Lys Asp Asn Ile Asp Gly Val Leu Glu Lys Asn Leu Ala Val Val
 275 280 285
 Ile Gly Glu Phe Gly His His His Tyr Gly Arg Asp Val Ala Val Asp
 290 295 300

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

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

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

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

Lys

<210> 17

<211> 915

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

5 <400> 17

```
atctcaacac tcagaaatgc cggatttcgc aatacaatcg ttgtggatgc atcgggggtgg 60
ggacaaaatt catcgccaat taaagcttat ggcaacgaag tgttaaacca tgatccgcag 120
cgcaatgtta tgttctccat acacatgtac ggttcctgga ataatcagtc gcgaatcggc 180
agcgaattgc aggccatcaa agaccttggg cttgctgtca tgattgggtga attcggatac 240
aactacaaca acggcaataa caacttgggg agtcagggtta acgcccagga aatcatgaat 300
caggcgcaag caaaaggaat cggctacatg ccgtgggtcgt ggactggcaa tgacgcggct 360
aactcttggg tggatatgac aacaaacgat tggcaaacac ttacatcatg ggggaatcta 420
gttgtaaatg gaaccaacgg cattcgagct acgtctgtcc cagcaactgt atttaataca 480
caacaacaa tttatgattt tgaaggcggc aatgcccgag gctgggtcagg ttccggtttg 540
agcggggggc cttgggtctgt taatgaatgg gggcgagcg gtagttatc tctcaaagcg 600
aatatatctc taggcgccac tcaaaaagct ttgcaaacca cagcgcccca taatttcagc 660
ggccggtcta cattatccgt aagagtaaag catgcagcat ggggaaatca cggcagcggg 720
atgcaagcca agttatatgt gaaaacaggg gccggttacg cctgggtatga tggcggcact 780
gtaaacatca acagctcggg caacacattg acgctaaacc tggcaggcat tcctaactcg 840
aacgacgtca gagaactcgg aattgaattt ataacacctg caaattcgag tggttctttc 900
gcaatttatg ttgac 915
```

<210> 18

<211> 305

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

10 <400> 18



Ile Ser Thr Leu Arg Asn Ala Gly Ile Arg Asn Thr Ile Val Val Asp
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Trp Gly Gln Asn Ser Ser Pro Ile Lys Ala Tyr Gly Asn
 20 25 30
 Glu Val Leu Asn His Asp Pro Gln Arg Asn Val Met Phe Ser Ile His
 35 40 45
 Met Tyr Gly Ser Trp Asn Asn Gln Ser Arg Ile Gly Ser Glu Leu Gln
 50 55 60
 Ala Ile Lys Asp Leu Gly Leu Ala Val Met Ile Gly Glu Phe Gly Tyr
 65 70 75 80
 Asn Tyr Asn Asn Gly Asn Asn Asn Leu Gly Ser Gln Val Asn Ala Gln
 85 90 95
 Glu Ile Met Asn Gln Ala Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Met Pro Trp
 100 105 110
 Ser Trp Thr Gly Asn Asp Ala Ala Asn Ser Trp Leu Asp Met Thr Thr
 115 120 125
 Asn Asp Trp Gln Thr Leu Thr Ser Trp Gly Asn Leu Val Val Asn Gly
 130 135 140
 Thr Asn Gly Ile Arg Ala Thr Ser Val Pro Ala Thr Val Phe Asn Thr
 145 150 155 160
 Gln Thr Thr Ile Tyr Asp Phe Glu Gly Gly Asn Ala Gln Gly Trp Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Leu Ser Gly Gly Pro Trp Ser Val Asn Glu Trp Ala Ala
 180 185 190
 Ser Gly Ser Tyr Ser Leu Lys Ala Asn Ile Ser Leu Gly Ala Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ala Leu Gln Thr Thr Ala Ser His Asn Phe Ser Gly Arg Ser Thr
 210 215 220
 Leu Ser Val Arg Val Lys His Ala Ala Trp Gly Asn His Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Met Gln Ala Lys Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ala Gly Tyr Ala Trp Tyr
 245 250 255
 Asp Gly Gly Thr Val Asn Ile Asn Ser Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu
 260 265 270
 Asn Leu Ala Gly Ile Pro Asn Leu Asn Asp Val Arg Glu Leu Gly Ile
 275 280 285
 Glu Phe Ile Thr Pro Ala Asn Ser Ser Gly Ser Phe Ala Ile Tyr Val
 290 295 300
 Asp
 305

<210> 19
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Bacillus clausii

5 <400> 19

atctctcagg gcttggtagg agtcattatt ctcttatata tggcatttag tcaagagaga 60
 ggattggcgc aaactggatt tcaagtaaca gggacccagt tgcttgatgg agagggcaat 120
 ccgtatgtga tgcgtggagt caatcacgga cattcatggt tcaaacaaga ccttgatata 180
 gcaataccag ctattgcagc gactggcget aatacgggtga gaatcgtttt atcgatggc 240
 caacaatggg agcgagatac cgtagcggaa gttgaaagag tgcttgacgt taccgaagag 300

gaaggcttga cggctgtact tgaagttcat gatgcgacgg gaagtgatga tccaaacgat 360
 ttgtttactg cagtggagta ttggtcagag agaggat 397

<210> 20
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Bacillus clausii

10 <400> 20

Ile Ser Gln Gly Leu Val Gly Val Ile Ile Leu Leu Tyr Met Ala Phe
 1 5 10 15

Ser Gln Glu Arg Gly Leu Ala Gln Thr Gly Phe Gln Val Thr Gly Thr
 20 25 30

Gln Leu Leu Asp Gly Glu Gly Asn Pro Tyr Val Met Arg Gly Val Asn
 35 40 45

His Gly His Ser Trp Phe Lys Gln Asp Leu Asp Thr Ala Ile Pro Ala
 50 55 60

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

Gln Gln Trp Glu Arg Asp Thr Val Ala Glu Val Glu Arg Val Leu Ala
 85 90 95

Val Thr Glu Glu Glu Gly Leu Thr Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala
 100 105 110

Thr Gly Ser Asp Asp Pro Asn Asp Leu Phe Thr Ala Val Glu Tyr Trp
 115 120 125

Ser Glu Arg Gly
 130

<210> 21

<211> 960

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

5 <400> 21

```

atgaatcgta agcgggttaca atggggttggg gcactagtgg tgggtgttggg tttgtttgta 60
tacagtagcg gtttagcatc tgcacaaagc ggctttcacg taaaagggtac agagttgttg 120
gacaaaaatg gcgateccta cgttatgcgt ggcgtcaacc atggacattc ttggttttaa 180
caagatttag aggaggcaat ccctgccata gcagaaacag gggcgaacac agtgagaatc 240
gtcttatcca atggacagca atgggaaaaa gatgatgcct ctgagcttgc ccgtgtgctt 300
gctgccacag aaacatatgg gttgacaacc gtgctggaag tccacgatgc tacaggaagt 360
gataatcccg atgatttaga taaagcagtc gattactgga tcgaaatggc tgatgttcta 420
aaggggacag aagaccgggt aatcattaac attgccaatg aatggtatgg ggcgtggagg 480
agtgaacgtt gggcagaggc atacgcacaa gcgatccgc gcttgccgag tgctggcctc 540
gcccatagct taatagttga tgcggcaggt tggggacagt accctgcctc tatccatgag 600
cggggagccg acgtatttgc ctccgatcca ttaaaaaaca caatgttttc catccatag 660
tacgaatatg caggagcggg tagggcgaca gtttctgaaa acatcgacgg tgtacttgct 720
gaaaatcttg ctgtggtaat cgggtgaattt ggccataggc atcatgatgg cgatgtcgat 780
gaagatgcga ttttggccta tacagcagag cggcaagtgg gctggcttgc ctgggtcatgg 840
tatggcaata gcgggggtgt tgaataactg gatttaactg aaggcccatc aggtccatta 900

```

acgagttggg gcgaacggat tgtctatggg gaaatgggt taaaagtaat tgatcacttg

960

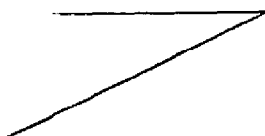
<210> 22

<211> 320

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 22



Met Asn Arg Lys Arg Leu Gln Trp Val Gly Ala Leu Val Val Val Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Phe Val Tyr Ser Ser Gly Leu Ala Ser Ala Gln Ser Gly Phe
 20 25 30
 His Val Lys Gly Thr Glu Leu Leu Asp Lys Asn Gly Asp Pro Tyr Val
 35 40 45
 Met Arg Gly Val Asn His Gly His Ser Trp Phe Lys Gln Asp Leu Glu
 50 55 60
 Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Thr Gly Ala Asn Thr Val Arg Ile
 65 70 75 80
 Val Leu Ser Asn Gly Gln Gln Trp Glu Lys Asp Asp Ala Ser Glu Leu
 85 90 95
 Ala Arg Val Leu Ala Ala Thr Glu Thr Tyr Gly Leu Thr Thr Val Leu
 100 105 110
 Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp Asn Pro Asp Asp Leu Asp Lys
 115 120 125
 Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Ala Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu
 130 135 140
 Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Ala Trp Arg
 145 150 155 160
 Ser Asp Val Trp Ala Glu Ala Tyr Ala Gln Ala Ile Pro Arg Leu Arg
 165 170 175
 Ser Ala Gly Leu Ala His Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly
 180 185 190
 Gln Tyr Pro Ala Ser Ile His Glu Arg Gly Ala Asp Val Phe Ala Ser
 195 200 205
 Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala
 210 215 220
 Gly Ala Asp Arg Ala Thr Val Ser Glu Asn Ile Asp Gly Val Leu Ala
 225 230 235 240
 Glu Asn Leu Ala Val Val Ile Gly Glu Phe Gly His Arg His His Asp
 245 250 255
 Gly Asp Val Asp Glu Asp Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ala Glu Arg Gln
 260 265 270



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

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

Glu Arg Ile Val Tyr Gly Glu Met Gly Leu Lys Val Ile Asp His Leu
 305 310 315 320

<210> 23

<211> 564

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

5 <400> 23

```

atgaatcgta agcgggttaca atggggttggg gcactagtgg cgggtgttggt ttgttttcta 60
tacagtagcg gtttagcatc tgcacaaagc ggctttcacg taaaagggtac agagttgttg 120
gacaaaaatg gcgatcctta cgttatgcgt ggcgtcaacc atggacattc ttggtttaaa 180
caagatttag aggaggcaat ccctgccata gcagaaacag gggcggaacac agtgagaatc 240
gtcttatcca atggacagca atgggaaaaa gatgatgcct ctgagcttgc ccgtgtgctt 300
gctgccacag aaacatatgg gttgacaacc gtgctggaag tccacgatgc tacaggaagt 360
gataatcccc atgatttaga taaagcagtc gattactgga tcgaaatggc tgatgttcta 420
aaggggacag aagaccgggt aatcattaac attgccaatg aatggtatgg ggcgtggagg 480
agtgaacctt gggcaaaagc atacgcacaa gcgatccgcg gcttgcgcag tgctggcctc 540
gcccatacgt taataattga tgcc                                     564

```

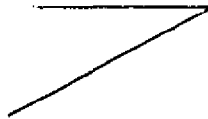
<210> 24

<211> 188

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 24



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

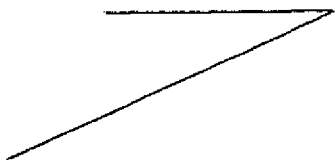
<210> 25

<211> 2445

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

5 <400> 25

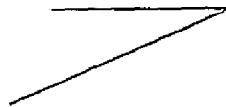


```

atgaacaaac aaccgttaaa gactgcattt attatgttgt tatgtagcgt gtttatgttt 60
caaagcctac cttactatgt gaacgctatc aatgaaggcg agaga gaagc ttttgcattc 120
gcagggagat atgatgctga acaggcgact acgacaggaa atgccgtatt tadgaccgag 180
cctgttgagg acggcgagta cgcgggtcgg ggctacattt ccttcctttc tgaagattcc 240
tcgccacett cttcatcgac aacctttcac attcaggccg ataaaacgga gctctatcat 300
ttatctatcg gatactatgc tccatacggg aacaagggaa ccacaattct ggtgaacggt 360
gcaggtaacg gagagtttat gttgccagcg cccgaggacg gggcagcttc cgcggaagt 420
gaaattagca aaatcctgct cgaagaaggg aataatacga ttacattcac aagaggctgg 480
ggttattacg gcattgaata tattcgggtc gagccggtta atccaacgtt accgactata 540
tttattgaag cagaagaaga ttacgaagcg actggaaatg ttagcgttac caatgaaatc 600
gaagggttatt ccggagcagg ctattttgtt aaccaagagg ggacaattca ttggaatgta 660
acctcacagg aaacctctat atatgaagta atcgttgcct atgcagctcc ttatggcgac 720
aaacaaacaa atctgacagt gaatggacag ggtaccgtca atcttgactt gaaagagaca 780
gaagtcttcg tggagttgaa tgtcggcatc gtaagtctca atgaaggcga aaacacacta 840
acactccata gtggttgggg atggtacaat atcgattata tcaagcttgt acctgtggtc 900
agttcggatc cgaaccgca tcaggtcgaa aaaacactgg tgaatccgga cgctcacct 960
gaggcaagag cgctaattaa ttatctcgta gaccagtacg ggaacaaaat tctatcaggt 1020
caaaccgagt tgaaagacgc caggtggatc catgaacagg tgggcaaata tcctgcygtt 1080
atggcagttg attttatgga ctacagcccg tccgcgtag tgcattggcg aactggaact 1140
gcgggtgagg aagcgattga gtgggcagag atgggtggga tcattacctt ccactggcat 1200
tggaacgcgc caaaggacct gcttaatgta cccggcaatg agtgggtggtc cggtttttat 1260
acctgtgcca caacgtttga tgtggagtac gcttttagaga accgggaatc tgaggatttc 1320
caattgttga ttagcgacat ggatgtgatc gccgagcaat tgaagcggct gcaggcagag 1380
aacatccctg tgttatggag accgcttcac gaggcggaag gcggtggtt ctggtggggc 1440
gccaaaggtc cagaggcggc aatagagctc tacaggctga tgtacgatcg ttacaccaat 1500
caccataaac taaacaattt gatatggatg tgggaattcgg aagcggaaga atggtatccg 1560
ggcgatgatg tcgtggacat gatcagtacc gatatttata atcctgtcgg agatttcagt 1620
cccagcatca acaagtatga gcactctaaag gaattggtac aggataagaa gctggttgcc 1680
ttgctgaaa ccggcattat tccggatccc gatcagcttc agctgttcaa tgcgaactgg 1740
agttgggttc ccacctggac tggagactat atcagggacg gcactctcaa ccctatagaa 1800
cacctgcaaa aggtgtttca tcatgactac gtcatcaccc tggatgaatt gccggagaac 1860
ctgtcccgtt acggattatc tgaaggagtc tgggaagagcg acgccgatct atccgtaaaa 1920
acgaggacga cctccgaaat tacagtgaac tgggtcaaat ccattcaata tgattccgtt 1980
aatggctata aattaattaa agatgggtgta gagaccgttt cagttgaagg cggcgtgcaa 2040
gagtatacct tcacaaattt attgccgggc acgcagtata cgataaaagt agaggcactg 2100
gaccaggatg accgatggac cgcgcacgga cgggtcgccg ttgtatctac attatccaac 2160
gctccgatat cctatcctcc ggctgtcact cctgatgagc cgaatgaaga actgtcggag 2220
ggagagtata cgctcttggc agatgactta tccagccagg atggtgttct ggaagtaagt 2280

cttgagccga cagttacgaa gctcattatt ccttctgcac tagccggcac attagacgga 2340
gacttgagaa tcggttatgg ggacgtctgg atcgcatcc cacacgaaca gcttgggggt 2400
gacgagcagc aatccggcag cgcgtatgag ttagtgcctg agatc 2445

```



<210> 26
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp.
 <400> 26

```

Met Asn Lys Gln Pro Leu Lys Thr Ala Phe Ile Met Leu Leu Cys Ser
 1                               5 10 15

Val Phe Met Phe Gln Ser Leu Pro Tyr Tyr Val Asn Ala Ile Asn Glu
      20 25 30

Gly Glu Arg Glu Ala Phe Ala Ser Ala Gly Arg Tyr Asp Ala Glu Gln
      35 40 45

Ala Thr Thr Thr Gly Asn Ala Val Phe Thr Thr Glu Pro Val Glu Asp
      50 55 60

Gly Glu Tyr Ala Gly Pro Gly Tyr Ile Ser Phe Phe Ser Glu Asp Ser
      65 70 75 80

Ser Pro Pro Ser Ser Ser Thr Thr Phe His Ile Gln Ala Asp Lys Thr
      85 90 95

Glu Leu Tyr His Leu Ser Ile Gly Tyr Tyr Ala Pro Tyr Gly Asn Lys
      100 105 110

Gly Thr Thr Ile Leu Val Asn Gly Ala Gly Asn Gly Glu Phe Met Leu
      115 120 125

Pro Ala Pro Glu Asp Gly Ala Val Ser Ala Glu Val Glu Ile Ser Lys
      130 135 140

Ile Leu Leu Glu Glu Gly Asn Asn Thr Ile Thr Phe Thr Arg Gly Trp
      145 150 155 160

Gly Tyr Tyr Gly Ile Glu Tyr Ile Arg Val Glu Pro Val Asn Pro Thr
      165 170 175

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

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

Leu Phe Asn Gln Glu Gly Thr Ile His Trp Asn Val Thr Ser Pro Glu
      210 215 220

Thr Ser Ile Tyr Glu Val Ile Val Ala Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Asp
      225 230 235 240

Lys Gln Thr Asn Leu Thr Val Asn Gly Gln Gly Thr Val Asn Leu Asp
      245 250 255

Leu Lys Glu Thr Glu Val Phe Val Glu Leu Asn Val Gly Ile Val Ser

```

260	265	270
Leu Asn Glu Gly Glu Asn Thr	Leu Thr Leu His Ser	Gly Trp Gly Trp
275	280	285
Tyr Asn Ile Asp Tyr Ile Lys	Leu Val Pro Val Val	Ser Ser Asp Pro
290	295	300
Glu Pro His Gln Val Glu Lys Thr	Leu Val Asn Pro Asp Ala Ser	Pro
305	310	315
Glu Ala Arg Ala Leu Ile Asn Tyr	Leu Val Asp Gln Tyr Gly Asn Lys	
325	330	335
Ile Leu Ser Gly Gln Thr Glu	Leu Lys Asp Ala Arg Trp	Ile His Glu
340	345	350
Gln Val Gly Lys Tyr Pro Ala	Val Met Ala Val Asp Phe Met Asp Tyr	
355	360	365
Ser Pro Ser Arg Val Val His	Gly Ala Thr Gly Thr Ala Val Glu Glu	
370	375	380
Ala Ile Glu Trp Ala Glu Met Gly	Gly Ile Ile Thr Phe His Trp His	
385	390	395
Trp Asn Ala Pro Lys Asp Leu	Leu Asn Val Pro Gly Asn Glu Trp Trp	
405	410	415
Ser Gly Phe Tyr Thr Arg Ala	Thr Thr Phe Asp Val Glu Tyr Ala Leu	
420	425	430
Glu Asn Arg Glu Ser Glu Asp	Phe Gln Leu Leu Ile Ser Asp Met Asp	
435	440	445
Val Ile Ala Glu Gln Leu Lys	Arg Leu Gln Ala Glu Asn Ile Pro Val	
450	455	460
Leu Trp Arg Pro Leu His Glu	Ala Glu Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly	
465	470	475
Ala Lys Gly Pro Glu Ala Ala	Ile Glu Leu Tyr Arg Leu Met Tyr Asp	
485	490	495
Arg Tyr Thr Asn His His Lys	Leu Asn Asn Leu Ile Trp Met Trp Asn	
500	505	510
Ser Glu Ala Glu Glu Trp Tyr	Pro Gly Asp Asp Val Val Asp Met Ile	
515	520	525
Ser Thr Asp Ile Tyr Asn Pro	Val Gly Asp Phe Ser Pro Ser Ile Asn	
530	535	540
Lys Tyr Glu His Leu Lys Glu	Leu Val Gln Asp Lys Lys Leu Val Ala	
545	550	555
Leu Pro Glu Thr Gly Ile Ile	Pro Asp Pro Asp Gln Leu Gln Leu Phe	
565	570	575
Asn Ala Asn Trp Ser Trp Phe	Ala Thr Trp Thr Gly Asp Tyr Ile Arg	

580					585					590						
Asp	Gly	Ile	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	His	Leu	Gln	Lys	Val	Phe	His	His	
595					600					605						
Asp	Tyr	Val	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Pro	Glu	Asn	Leu	Ser	Arg	Tyr	
610					615					620						
Gly	Leu	Ser	Glu	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Ser	Val	Lys	
625					630					635					640	
Thr	Arg	Thr	Thr	Ser	Glu	Ile	Thr	Val	Asn	Trp	Ser	Asn	Ala	Ile	Gln	
645					650					655						
Tyr	Asp	Ser	Val	Asn	Gly	Tyr	Lys	Leu	Ile	Lys	Asp	Gly	Val	Glu	Thr	
660					665					670						
Val	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	Val	Gln	Glu	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Leu	
675					680					685						
Pro	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Ile	Lys	Val	Glu	Ala	Leu	Asp	Gln	Asp	Asp	
690					695					700						
Arg	Trp	Thr	Ala	Asp	Gly	Pro	Val	Ala	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Ser	Asn	
705					710					715					720	
Ala	Pro	Ile	Ser	Tyr	Pro	Pro	Ala	Val	Thr	Pro	Asp	Glu	Pro	Asn	Glu	
725					730					735						
Glu	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Leu	Ser	Ser	
740					745					750						
Gln	Asp	Gly	Val	Leu	Glu	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	
755					760					765						
Ile	Ile	Pro	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Thr	Leu	Asp	Gly	Asp	Leu	Arg	Ile	
770					775					780						
Gly	Tyr	Gly	Asp	Val	Trp	Ile	Val	Ile	Pro	His	Glu	Gln	Leu	Gly	Gly	
785					790					795					800	
Asp	Glu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Ile		
805					810					815						

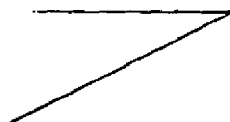
<210> 27

<211> 1488

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

<400> 27



atgaggaatg aaaaaatcag gccatttact aaaataaagg caagtgttgt tactagtgtt 60
 ttactattaa ctatttccct aattttcact ataggaaata tagcaaatgc tcaatctgag 120
 gtaagaatat ttgaagctga agatgctatt ttaaatgggc tgaccattaa aaattttgaa 180
 ccagggtttt ctggtaccgg atatgtagggt gactttgaaa atagctctca gagtgtgacg 240
 tttcaaatg aggcctcctaa agccggttta tacaacttaa atattggata tggcgcgatt 300
 tatggaagtg gaaaagtagc taatgttatt gtaaattggag agaagctaag tacttttaca 360
 atgggaagtg gcttttgtaa agcgtcagca ggaaagggtat tacttaattc aggcctaaat 420
 actatctcga ttactcctaa ttggacatgg tttaccattg attatattga agttatacat 480

gcaccggaac cggaaaacca taatgtagaa aagacgttaa ttaacccaaa tgcaacggat 540
 gaagccaaag ctttaataag ctatctagtt gataactttg gtgagaaaat tcttgaggag 600
 caacatgatt atccaaatac acgaccacga gatttagaat atatttatga aactactggg 660
 aagtatctcg ctgttttagg ttttagacttt attgataaca gtccttctag agttgagcgc 720
 ggagcctctg ctgatgaaac accagtagct attgactggg ggaataaagg gggaattgtt 780
 actttcacct ggcattggaa tgctcccaaa gatttattag atgaaccagg aaatgaatgg 840
 tggagtgggt tttatacgag agcaacaact tttgacgtag aatatgcttt aaaacatccg 900
 aagtcggagg actacatgct tctaatacgt gatattgatg taatagctgg tgaactaaag 960
 aaattgcagg aagcaaatgt tcctgtttta tggaggccac ttcattgaggc tgaaggcggg 1020
 tggttctggt ggggggcaaa aggtcctgaa tcaaccaagg agctatggag attaatgtat 1080
 gatagaatga cgaactacca taacttaaat aatttaatat gggatatggaa ttccattgaa 1140
 gaggattggg atcctggaga tgagtatgtc gatattgtaa gcttcgattc atatccagg 1200
 gaatataact atagtccaat gagcctgag tatgaagcac ttaaagagtt gtctagtaac 1260
 aagaaactta tagcaatagc agaaaatgga ccaataccag atcctgattt actacaactt 1320
 taccatgcta actatagttg gtttgctaca tggaatggag atataattaag aaatcaaat 1380
 agcgaagagc acctaagaaa agtatataat catgattatg tgattaccct aaataaatta 1440
 cctaacccta aaacatatag gggaagatgc acttatacag acactatc 1488

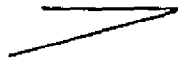
<210> 28

<211> 496

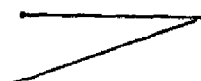
<212> PRT

<213> Bacillus sp.

5 <400> 28



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



Phe Gly Glu Lys Ile Leu Ala Gly Gln His Asp Tyr Pro Asn Thr Arg
 195 200 205
 Pro Arg Asp Leu Glu Tyr Ile Tyr Glu Thr Thr Gly Lys Tyr Pro Ala
 210 215 220
 Val Leu Gly Leu Asp Phe Ile Asp Asn Ser Pro Ser Arg Val Glu Arg
 225 230 235 240
 Gly Ala Ser Ala Asp Glu Thr Pro Val Ala Ile Asp Trp Trp Asn Lys
 245 250 255
 Gly Gly Ile Val Thr Phe Thr Trp His Trp Asn Ala Pro Lys Asp Leu
 260 265 270
 Leu Asp Glu Pro Gly Asn Glu Trp Trp Ser Gly Phe Tyr Thr Arg Ala
 275 280 285
 Thr Thr Phe Asp Val Glu Tyr Ala Leu Lys His Pro Lys Ser Glu Asp
 290 295 300
 Tyr Met Leu Leu Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Ala Gly Glu Leu Lys
 305 310 315 320
 Lys Leu Gln Glu Ala Asn Val Pro Val Leu Trp Arg Pro Leu His Glu
 325 330 335
 Ala Glu Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly Ala Lys Gly Pro Glu Ser Thr
 340 345 350
 Lys Glu Leu Trp Arg Leu Met Tyr Asp Arg Met Thr Asn Tyr His Asn
 355 360 365
 Leu Asn Asn Leu Ile Trp Val Trp Asn Ser Ile Glu Glu Asp Trp Tyr
 370 375 380
 Pro Gly Asp Glu Tyr Val Asp Ile Val Ser Phe Asp Ser Tyr Pro Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Asn Tyr Ser Pro Met Ser Arg Glu Tyr Glu Ala Leu Lys Glu
 405 410 415
 Leu Ser Ser Asn Lys Lys Leu Ile Ala Ile Ala Glu Asn Gly Pro Ile
 420 425 430
 Pro Asp Pro Asp Leu Leu Gln Leu Tyr His Ala Asn Tyr Ser Trp Phe
 435 440 445
 Ala Thr Trp Asn Gly Asp Ile Leu Arg Asn Gln Asn Ser Glu Glu His
 450 455 460
 Leu Arg Lys Val Tyr Asn His Asp Tyr Val Ile Thr Leu Asn Lys Leu
 465 470 475 480
 Pro Asn Leu Lys Thr Tyr Arg Gly Arg Cys Thr Tyr Thr Asp Thr Ile
 485 490 495

<210> 29

<211> 1086

<212> DNA

<213> *Bacillus licheniformis*

5 <400> 29

```

atgtacaaaa aatttggaat ctctttattg cttgctttat taatcgtttc agctttctcg 60
cagacggcat ctgctcatat agtgaatccg gtgaacccaa atgcccagtc gacaacgaag 120
gagctgatga attggcttgc tcatctgcg aaccgatcgg aaaatcggt actgtcaggt 180
gcattcggcg gatattctaa tgcgacgttt tctatgaaag aagccaatcg aatcaaagat 240
gctacagggc agtcacctgt cgtgtatget tgtgattatt cgagaggatg gctggagaca 300
gtccatattg ctgatgcgat cgattatagc tgtaacagcg atctaattct tcattggaag 360
agcggaggca tacctcagat cagcatgcat ctctctaacc ctgcgtttca atccggcaat 420
tacaaaacaa agatctcaaa cagtcagtat gaaaaaatct tagactcatc aaccacagaa 480
ggcaaacgat tggatgctgt actgagcaag gttgcagatg gccttcagca gttaaaaaat 540
gaaggcgctt cagttctttt cagacctctt cagcaaatga acggagaatg gttctggtgg 600
gggcttaccg gctataacca aaaggatagc gagcgaatat cactatacaa acagctttac 660
caaaaaatct atcattatat gaccgataca agaggattgg acaacttgat ttgggtttat 720
gcaccagacg ccaaccgcga ctttaagaca gacttttata ctggggattc atatgttgat 780
attgtcggat tagacgcgta tttctcagat gcttattcga tcaaaggata tgacgagtta 840
acggcgctta ataagccatt tgcctttaca gaagtcggtc cgcaaacaac aaacggcagc 900
ctggattatt ctcaatttat caatgcagtt aaacaaaaat atccgaaaac catttatttc 960
ttagcttggg atgagggttg gagccctgcg gctaatacagg gtgcctttaa tctctataat 1020
gacagttgga cgctgaataa gggagagcta tgggaaggca gctcacttac accggcagcc 1080
gaataa                                     1086

```

<210> 30

<211> 361

<212> PRT

<213> *Bacillus licheniformis*

<400> 30

```

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

Ser Ala Phe Ser Gln Thr Ala Ser Ala His Thr Val Asn Pro Val Asn
      20             25             30

Gln Asn Ala Gln Ser Thr Thr Lys Glu Leu Met Asn Trp Leu Ala His
      35             40             45

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

Tyr Ser Asn Ala Thr Phe Ser Met Lys Glu Ala Asn Arg Ile Lys Asp
      65             70             75             80

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

```

Trp	Leu	Glu	Thr	Ala	His	Ile	Ala	Asp	Ala	Ile	Asp	Tyr	Ser	Cys	Asn
			100					105					110		
Ser	Asp	Leu	Ile	Ser	His	Trp	Lys	Ser	Gly	Gly	Ile	Pro	Gln	Ile	Ser
		115					120					125			
Met	His	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Phe	Gln	Ser	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Lys
	130					135					140				
Ile	Ser	Asn	Ser	Gln	Tyr	Glu	Lys	Ile	Leu	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Glu
145					150					155					160
Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ser	Lys	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Gln
				165					170					175	
Gln	Leu	Lys	Asn	Glu	Gly	Val	Pro	Val	Leu	Phe	Arg	Pro	Leu	His	Glu
			180					185					190		
Met	Asn	Gly	Glu	Trp	Phe	Trp	Trp	Gly	Leu	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys
		195					200					205			
Asp	Ser	Glu	Arg	Ile	Ser	Leu	Tyr	Lys	Gln	Leu	Tyr	Gln	Lys	Ile	Tyr
		210				215					220				
His	Tyr	Met	Thr	Asp	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Asn	Leu	Ile	Trp	Val	Tyr
225					230					235					240
Ala	Pro	Asp	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Lys	Thr	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Asp
				245					250					255	
Ser	Tyr	Val	Asp	Ile	Val	Gly	Leu	Asp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ala	Tyr
			260					265					270		
Ser	Ile	Lys	Gly	Tyr	Asp	Glu	Leu	Thr	Ala	Leu	Asn	Lys	Pro	Phe	Ala
		275					280					285			
Phe	Thr	Glu	Val	Gly	Pro	Gln	Thr	Thr	Asn	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr	Ser
		290				295					300				
Gln	Phe	Ile	Asn	Ala	Val	Lys	Gln	Lys	Tyr	Pro	Lys	Thr	Ile	Tyr	Phe
305				310						315					320
Leu	Ala	Trp	Asp	Glu	Gly	Trp	Ser	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln	Gly	Ala	Phe
				325					330					335	
Asn	Leu	Tyr	Asn	Asp	Ser	Trp	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Leu	Trp	Glu
			340					345					350		
Gly	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro	Ala	Ala	Glu							
			355					360							

<210> 31

<211> 3041

<212> DNA

<213> Caldocellulosiruptor sp.

<400> 31

```

tcaggcttga tgttgagttc aacgagaaca atggatggga ccagggcgac cttggtgcat 480
ggataggtgg tgttgctgaa gggcagtttg actttacaaa ctacaagtct gttgagtttg 540
aaatgtttgt tccatacgac gagtttgcaa aagcaaaagg tggctttgct tacaaggttg 600
tattgaatga tggatggaaa gaacttgaa gcgaatttag cattacagta aatgctggca 660
aaaaggtgaa gataaacggc aaggactata tggtcattca caaggcggtt gcaattccag 720
atgatttttag aacccaaaaag cgtgcacagc ttgtgttcca atttgcaggt caaaactgca 780
actacaaagg acctatctac cttgacaata taagagtaag acctgaggat gcgtcaaacc 840
tctcaaaaga agactatgga agtagcgaag aagaggaaat ttctgaggac tttttcacag 900
gggttacccct tgtgtatcca caggaaggca aaaactttgt gtacaatttt gaaaaagaca 960
caatgggatt ttataaatac tcgggtgatg gatttgc aaaacaaaag tcaatggaat 1020
tttcacagga cttgaagaca tcaacaaatg caggcagcct caaactcaat gctaatttcc 1080
agggctactgc gtttgaagaa atgaacattg ctgtaaaagt cacagacaaa gaaggaaaac 1140
tttttgacct tggcaaatat tccgcacttg agtatacaat ctacattcca aatccagaca 1200
aagttgcggg gaaaatcatg tctgcaagtg ctgtggacag tccatggaag ataatacaag 1260
actttacact tcttaactac aaagataaga caacatggaa agagataaac ggaaagactt 1320
atgoggtcat aaagtgcagg gataatcttt acaatgtaaa agaaaaagca ggtgtattgg 1380
ttttgaggat tgcggggtct tatgtaaagt atacaggccc catctacatt gataacgtaa 1440
cattaattgc tggaaagaag gttgcaccaa aggtggagag aatatcactt ccaaaccaca 1500
agacatacta taaagttaag attgaagctg agagtgcagg tgatggctgg gcttacagcg 1560
ttgagaaaga aaatgcaaag ttttctggga aaggctatgt acttttgttt gggaacaaca 1620
tgggcaatac cttttataac atcaagggtc cgaagacagg acattacatc ttcactcttg 1680
caatctcaac ccttgggctt gtaaaggatg gtagcattga tatctggata gacgggtgatt 1740
tgaaagggtg ggcaaagggt ccaaacgtaa agggcaagt ccagggaagt gttgtcagaa 1800
aaaagattta tttaacagcg ggtgagcaca caatatcact gcaaaaatct ggccgataca 1860
caattgcagt tgactatttt gtgatagaag agcttgttgc ggcaaatata tcaaagcttt 1920
cggttttcttc aaagttagtg accccaaatc cacaccccaa tgcccaaagg ctcataaatt 1980
atttgtcaag catttacggt gaaaagattt tgtctggtca gcagagcagc ggtgaaggca 2040
aagagggttca gatgattttt gatgtcaca agagatatcc agctgttaga agctttgatt 2100
tcatggacta ctcaccaagc agagtgcagc atggtacaaa aggtacagat gttgatgagg 2160
caataaagtg gtggaagagc ggcggcatag ttgcattttg ctggcactgg aacgcaccaa 2220
caggctcttat tgaccagcgg ggcaaagagt ggtggagagg tttttacaca gaggtacaa 2280
catttgacct caagaaagcc atggacaatc caaattctga agaataataa ctcattttga 2340
gagatataga cgctattgct gagcagctca aaaaattgca ggctgaagggt gtgccagttc 2400
ttttcagacc gcttcacgag gctcttgccg gctggttctg gtgggggtgca aaagggtccag 2460
agccgtatat aaagcttttg aagctcatgt ttgacaggct tgtaaaactat cacaaaatca 2520
acaacctaat atgggtatgg aacggtcagg atgctgcctg gtatccgggt gaccagtatg 2580
ttgatataat tgcagaagat atatatgagg aaaaagctca gtactacca tatacagaga 2640
ggttcgtgaa agctctcaag tacacaaatg caaacaagat gatagcactt tctgagtgcg 2700
gaactattcc tgaccgggt gtgctaaaac aagaagggtt ttcgtggctg tggttttctg 2760
tatgggcagg aagctatgtc atgacaggca gcaagtacaa cgatgaatgg aacgcacaatc 2820
acatgctaag aaagatttac aacaatgact atgtaataac aaaagatgaa ctacctgata 2880
taaagagcat tccactcaaa tagaatgaga tatatttttg aatatccaaa atcaactgtc 2940
agcctgtgag aggagagaag ttcaaaaaag acctcctccc tttttgggtc ttgcaaaata 3000
atcaattttt gggtttgaca tctcaaacat gtaattaaa a 3041

```

<210> 32

<211> 903

<212> PRT

<213> Caldocellulosiruptor sp.

5 <400> 32

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

Leu Leu Gly Leu Leu Pro Thr Gly Ile Phe Gly Ala Val Glu Thr Ser
 20 25 30

Val Gln Ser Tyr Val Phe Asp Phe Glu Asp Gly Thr Thr Met Thr Phe
 35 40 45

Gly Glu Ala Trp Gly Asp Ser Leu Lys Cys Ile Lys Lys Val Ser Val
 50 55 60

Ser Thr Asp Leu Gln Arg Pro Gly Asn Lys Tyr Ala Leu Arg Leu Asp
 65 70 75 80

Val Glu Phe Asn Glu Asn Asn Gly Trp Asp Gln Gly Asp Leu Gly Ala
 85 90 95

Trp Ile Gly Gly Val Val Glu Gly Gln Phe Asp Phe Thr Asn Tyr Lys
 100 105 110

Ser Val Glu Phe Glu Met Phe Val Pro Tyr Asp Glu Phe Ala Lys Ala
 115 120 125

Lys Gly Gly Phe Ala Tyr Lys Val Val Leu Asn Asp Gly Trp Lys Glu
 130 135 140

Leu Gly Ser Glu Phe Ser Ile Thr Val Asn Ala Gly Lys Lys Val Lys
 145 150 155 160

Ile Asn Gly Lys Asp Tyr Met Val Ile His Lys Ala Phe Ala Ile Pro
 165 170 175

Asp Asp Phe Arg Thr Lys Lys Arg Ala Gln Leu Val Phe Gln Phe Ala
 180 185 190

Gly Gln Asn Cys Asn Tyr Lys Gly Pro Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Arg
 195 200 205

Val Arg Pro Glu Asp Ala Ser Asn Leu Ser Lys Glu Asp Tyr Gly Ser
 210 215 220

Ser Glu Glu Glu Glu Ile Ser Glu Asp Phe Phe Thr Gly Val Thr Leu
 225 230 235 240

Val Tyr Pro Gln Glu Gly Lys Asn Phe Val Tyr Asn Phe Glu Lys Asp
 245 250 255

Thr Met Gly Phe Tyr Lys Tyr Ser Gly Asp Gly Phe Ala Lys Lys Thr
 260 265 270
 Lys Ser Met Glu Phe Ser Gln Asp Leu Lys Thr Ser Thr Asn Ala Gly
 275 280 285
 Ser Leu Lys Leu Asn Ala Asn Phe Gln Gly Thr Ala Phe Glu Glu Met
 290 295 300
 Asn Ile Ala Val Lys Leu Thr Asp Lys Glu Gly Lys Leu Phe Asp Leu
 305 310 315 320
 Gly Lys Tyr Ser Ala Leu Glu Tyr Thr Ile Tyr Ile Pro Asn Pro Asp
 325 330 335
 Lys Val Ala Gly Lys Ile Met Ser Ala Ser Ala Val Asp Ser Pro Trp
 340 345 350
 Lys Ile Ile Lys Asp Phe Thr Leu Leu Asn Tyr Lys Asp Lys Thr Thr
 355 360 365
 Trp Lys Glu Ile Asn Gly Lys Thr Tyr Ala Val Ile Lys Cys Lys Asp
 370 375 380
 Asn Leu Tyr Asn Val Lys Glu Lys Ala Gly Val Leu Val Leu Arg Ile
 385 390 395 400
 Ala Gly Ser Tyr Val Lys Tyr Thr Gly Pro Ile Tyr Ile Asp Asn Val
 405 410 415
 Thr Leu Ile Ala Gly Lys Lys Val Ala Pro Lys Val Glu Arg Ile Ser
 420 425 430
 Leu Pro Asn Pro Lys Thr Tyr Tyr Lys Val Lys Ile Glu Ala Glu Ser
 435 440 445
 Ala Ser Asp Gly Trp Ala Tyr Ser Val Glu Lys Glu Asn Ala Lys Phe
 450 455 460
 Ser Gly Lys Gly Tyr Val Leu Leu Phe Gly Asn Asn Met Gly Asn Thr
 465 470 475 480
 Leu Tyr Asn Ile Lys Val Pro Lys Thr Gly His Tyr Ile Phe Thr Leu
 485 490 495
 Ala Ile Ser Thr Leu Gly Leu Val Lys Asp Gly Ser Ile Asp Ile Trp
 500 505 510
 Ile Asp Gly Asp Leu Lys Gly Gly Ala Lys Val Pro Asn Val Lys Gly
 515 520 525
 Lys Phe Gln Glu Val Val Val Arg Lys Lys Ile Tyr Leu Thr Ala Gly
 530 535 540
 Glu His Thr Ile Ser Leu Gln Lys Ser Gly Gly Tyr Thr Ile Ala Val
 545 550 555 560
 Asp Tyr Phe Val Ile Glu Glu Leu Val Ala Ala Asn Lys Ser Lys Leu
 565 570 575

Ser Val Ser Ser Lys Leu Val Thr Pro Asn Pro His Pro Asn Ala Gln
 580 585 590

Arg Leu Ile Asn Tyr Leu Ser Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Ile Leu Ser
 595 600 605

Gly Gln Gln Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Val Gln Met Ile Phe Asp
 610 615 620

Val Thr Lys Arg Tyr Pro Ala Val Arg Ser Phe Asp Phe Met Asp Tyr
 625 630 635 640

Ser Pro Ser Arg Val Gln His Gly Thr Lys Gly Thr Asp Val Asp Glu
 645 650 655

Ala Ile Lys Trp Trp Lys Ser Gly Gly Ile Val Ala Phe Cys Trp His
 660 665 670

Trp Asn Ala Pro Thr Gly Leu Ile Asp Gln Pro Gly Lys Glu Trp Trp
 675 680 685

Arg Gly Phe Tyr Thr Glu Ala Thr Thr Phe Asp Leu Lys Lys Ala Met
 690 695 700

Asp Asn Pro Asn Ser Glu Glu Tyr Lys Leu Ile Leu Arg Asp Ile Asp
 705 710 715 720

Ala Ile Ala Glu Gln Leu Lys Lys Leu Gln Ala Glu Gly Val Pro Val
 725 730 735

Leu Phe Arg Pro Leu His Glu Ala Ser Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly
 740 745 750

Ala Lys Gly Pro Glu Pro Tyr Ile Lys Leu Trp Lys Leu Met Phe Asp
 755 760 765

Arg Leu Val Asn Tyr His Lys Ile Asn Asn Leu Ile Trp Val Trp Asn
 770 775 780

Gly Gln Asp Ala Ala Trp Tyr Pro Gly Asp Gln Tyr Val Asp Ile Ile
 785 790 795 800

Ala Glu Asp Ile Tyr Glu Glu Lys Ala Gln Tyr Ser Pro Tyr Thr Glu
 805 810 815

Arg Phe Val Lys Ala Leu Lys Tyr Thr Asn Ala Asn Lys Met Ile Ala
 820 825 830

Leu Ser Glu Cys Gly Thr Ile Pro Asp Pro Ala Val Leu Lys Gln Glu
 835 840 845

Gly Val Ser Trp Leu Trp Phe Ser Val Trp Ala Gly Ser Tyr Val Met
850 855 860

Thr Gly Ser Lys Tyr Asn Asp Glu Trp Asn Asp Asn His Met Leu Arg
865 870 875 880

Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Tyr Val Ile Thr Lys Asp Glu Leu Pro Asp
885 890 895

Ile Lys Ser Ile Pro Leu Lys
900

<210> 33

<211> 1450

<212> RNA

<213> Bacillus sp. I633

5 <400> 33

gcucccugau guuagcggcg gacgggugag uaacacgugg gcaaccugcc cuguagacug 60
ggauaacauc gagaaauccg ugcuaauacc ggauaauga uggaauugca uauuucuaau 120
uuaaaagaug gcuccggcua ucacuacagg augggcccg cgcgcauuag cuaguuggua 180
agguaacggc uuaccaaggc gacgaugcgu agccgaccug agagggugau cggccacacu 240
gggacugaga cacggccccag acuccuacgg gaggcagcag uagggaau cuccgcaaugg 300
acgaaagucu gacggagcaa cgcgcgcuga gcgaugaagg ccuucggguu guaaagcucu 360
guuguuaggg aagaacaagu gccauucaa uaggguggca ccuugacggg accuaaccag 420
aaagccacgg cuaacuacgu gccagcagcc gcgguaauac guagguggca agcguugucc 480
ggaauuauug ggcguaaaagc gcgcgcaggg gguuucuaa gucugaugug aaagcccccg 540

gcuaaaccgg ggagggucau uggaacucgg gagacuugag uacagaagag gagaguggaa 600
uuccacgugu agcggugaaa ugcguagaua uguggaggaa caccaguggc gaaggcgacu 660
cucuggucug uaacugacgc ugaggcgga aagcguggg agcaaaccag auuagauacc 720
cugguagucc acgcccguaaa cgaugagugc uagguguuag ggguuucgau gcccuuagug 780
ccgaaguuaa cacaguaagc acuccgccug gggaguacgg ccgcaaggcu gaaacucaaa 840
ggaauugacg gggggcccgca caagcggugg agcauguggu uuaauucgaa gcaacgcgaa 900
gaaccuuacc agguucuugac auccuuugac aaccuagag auaggcggu ccccuucggg 960
ggacaaagug acagguggug caugguuguc gucagcucgu gucgugagau guuggguuaa 1020
gucccgcaac gagcgcaacc cuugaucuaa guugccagca uuuauguagg cacucuaagg 1080
ugacugccgg ugacaaaccg gaggaaggug gggauagcgu caaaucauca ugccccuau 1140
gaccugggcu acacacgugc uacaauggau gguacaaagg gcagcaaac cgcgaggucg 1200
agccaaucce auaaaaccu ucucaguucg gauuguaggc ugcaacucgc cuacaugaag 1260
ccggaauccg uaguaaucgc ggaucagcau gccgcgguga auacguuccc gggccuugua 1320
cacaccgcc gucacaccac gagaguugu aacaccgaa gucggugggg uaacguuuug 1380
gagccagccg ccuaaggugg gacagaugau uggggugaag ucguaacaag guagccguau 1440
cggaaggugc 1450

<210> 34

<211> 1508

<212> RNA

<213> Bacillus sp. AAI12

10 <400> 34

```

gacgaacgcu ggcggcgugc cuaauacaug caagucgagc ggacauuag gagcuugcuc 60
cuaaauguaa gcggcgagc ggugaguaac acgugggcaa ccugccugc agacugggau 120
aacaucgaga aaucggugcu aaauaccggau aaucuuaggg auugcauaau ccucuuuguaa 180
aagaugggcuc cggcuaucau uacggggaugg gcccgcggcg cauagcuag uugguaaggu 240
aacggcuuac caaggcgagc augcguaagg gaccugagag ggugaucggc cacacuggga 300
cugagacacg gccagacuc cuacgggagg cagcaguagg gaaucuuccg caauggacga 360
aagucugacg gagcaacgcc gcgugaguga ugaaggguuu cggcucguaa agcucugug 420
uuagggaaga acaagugccg uucaauagg gcggcacuu gacgguaccu aaccagaaag 480
ccacggcuua cuacgugcca gcagccgcgg uauuacguag guggcaagcg uuguccgga 540
uuauugggcg uaaagcgcg gcagggcguc uuuaagucg gaugugaaau cucggggcuc 600
aaccgccgagc ggucauugga aacugggaga cuugaguaca gaagaggaga guggaaaucc 660
acguguaagc gugaaaugcg uagauaugug gaggaacacc aguggcgaag gcgacucucu 720
ggucuguaac ugacgcugag gcgcgaaagc guggggagca aacaggauua gauaccucgg 780
uaguccacgc cguaaacgau gagugcuagg uguuaggggu uucgaugccc uuagugccga 840
aguuaacaca uuaagcacuc cgccugggga guacgacggc aagguugaaa cucaaaggaa 900
uugacggggg cccgcacaag caguggagca ugugguuuua uucgaagcaa cgcgaagaac 960
cuuaccaggu cuugacaucc uuauagaccuc ccuagagaua gggauuuccc uucggggaca 1020
uaagugacag guggugcaug guugucguca gcucgugucg ugagaugug gguuaagucc 1080
cgcaacgagc gcaaccuug aucuuaguu ccagcauuua guugggcacu cuaagguag 1140
ugccggugau aaaccggagg aaggugggga ugacgucaaa ucaucaugcc ccuuauagacc 1200
ugggcuacac acgugcuaca auggauggua caaagagcag caaaaccgcg aggucgagcc 1260
aaucucauaa agccauucuc aguucggauu guaggcugca acucgccuac augaagccgg 1320
aaugcuagu aaucgcggau cagcaugccg cggugaauac guucccgggc cuuguaacaca 1380
ccgcccguca caccacgaga guuuguaaca cccgaagucg guggaguaac ccuacggga 1440
gcuagccgcc uaagguggga cagaugauug gggugaaguc guaacaaggu agccguaucg 1500
gaaggugc 1508

```

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



278A26764821D35B

Campo 2



68747041657087CA

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 071168d003.txt
- Data de Geração do Código: 04-03-2016
- Hora de Geração do Código: 15:07:58
- Código de Controle:
 - Campo 1: 278A26764821D35B
 - Campo 2: 68747041657087CA