

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Januar 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/002711 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: **C12N** 51, 40593 Düsseldorf (DE). **MAURER, Karl-Heinz** [DE/DE]; Dechenstr. 5, 40699 Erkrath (DE). **ECK, Jürgen** [DE/DE]; Siegfriedstrasse 138, 64646 Heppenheim (DE). **LORENZ, Patrick** [DE/DE]; Beethovenstrasse 19, 69493 Hirschberg (DE). **ZINKE, Holger** [DE/DE]; Darmstädter Str. 36, 64673 Zwingenberg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06842
- (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Juni 2002 (20.06.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 31 441.8 29. Juni 2001 (29.06.2001) DE
- (31) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, CA, CN, CZ, DZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, PL, RO, RU, SG, SI, SK, UA, US, ZA.
- (32) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN** [DE/DE]; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).
- (72) Erfinder; und
- (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BREVES, Roland** [DE/DE]; Dr. Redlich-Str. 17, 40882 Ratingen (DE). **KOTTWITZ, Beatrix** [DE/DE]; Urdenbacher Allee
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: A NOVEL GROUP OF \$G(A)\$-AMYLASES AND A METHOD FOR IDENTIFICATION AND PRODUCTION OF NOVEL \$G(A)\$-AMYLASES

(54) Bezeichnung: EINE NEUE GRUPPE VON \$G(A)\$-AMYLASEN SOWIE EIN VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND GEWINNUNG NEUER \$G(A)\$-AMYLASEN

(57) Abstract: The invention relates to a novel group of α -amylases, belonging to a common sequence region and proteins sufficiently similar to said α -amylases with amylolytic function, methods for production thereof and diverse possible applications for said amylolytic proteins, in particular in washing and cleaning agents. The invention further relates to a PCR-based method for identification and production of novel α -amylases from isolated genomic DNA, in particular from DNA isolated from collections of micro-organisms and particular primer oligonucleotides and application thereof in said method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Gruppe von α -Amylasen, die einem gemeinsamen Sequenzraum angehören, sowie zu diesen α -Amylasen hinreichend ähnliche Proteine mit amyolytischer Funktion, Verfahren zu deren Herstellung und diverse Einsatzmöglichkeiten für diese amyolytischen Proteine, insbesondere in Wasch- und Reinigungsmitteln. Sie betrifft auch ein PCR-basiertes Verfahren zur Identifizierung und Gewinnung neuer α -Amylasen aus isolierter genomischer DNA, insbesondere aus isolierter DNA von Sammlungen von Mikroorganismen sowie bestimmte Primer-Oligonukleotide und deren Anwendung in einem solchen Verfahren.



WO 03/002711 A2

Eine neue Gruppe von α -Amylasen sowie ein Verfahren zur Identifizierung und Gewinnung neuer α -Amylasen

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Gruppe von α -Amylasen, die einem gemeinsamen Sequenzraum angehören, sowie zu diesen α -Amylasen hinreichend ähnliche Proteine mit amylolytischer Funktion, Verfahren zu deren Herstellung und diverse Einsatzmöglichkeiten für diese amylolytischen Proteine, insbesondere in Wasch- und Reinigungsmitteln. Sie betrifft auch ein PCR-basiertes Verfahren zur Identifizierung und Gewinnung neuer α -Amylasen aus isolierter genomischer DNA, insbesondere aus isolierter DNA von Sammlungen von Mikroorganismen sowie bestimmte Primer-Oligonukleotide und deren Anwendung in einem solchen Verfahren.

α -Amylasen (E.C. 3.2.1.1) hydrolysieren im Polymerinneren gelegene α -1,4-glycosidische Bindungen von Stärke und stärkeähnlichen Polymeren, wie beispielsweise Amylose, Amylopektin oder Glykogen, unter Bildung von Dextrinen und β -1,6-verzweigten Oligosacchariden. Sie gehören zu den wichtigsten industriell genutzten Enzymen überhaupt. Dies aus zwei Gründen: Zum einen werden sie zumeist wie viele substratabbauende Enzyme von Mikroorganismen in das umgebende Medium abgegeben, so daß sie durch Fermentation und Aufreinigung aus dem Kulturmedium mit vergleichsweise geringem Aufwand in industriellem Maßstab gewonnen werden können. Zum anderen werden Amylasen für ein breites Anwendungsspektrum benötigt.

An erster Stelle der technischen Verwendungen von α -Amylase steht die Herstellung von Glucosesirup. Andere Verwendungen sind beispielsweise die als aktive Komponenten in Wasch- und Reinigungsmitteln, zur Behandlung von Rohmaterialien in der Textilherstellung, zur Herstellung von Klebstoffen oder zur Herstellung von zuckerhaltigen Lebensmitteln oder Lebensmittelbestandteilen.

Ein Beispiel für eine technisch besonders intensiv eingesetzte Amylase ist die α -Amylase aus *Bacillus licheniformis*, die von der Firma Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark, unter dem Handelsnamen Termamyl® angeboten wird. Die aus *B. subtilis*, beziehungsweise *B. amyloliquefaciens* gewonnene und in der US-Anmeldung US 1 227 374 offenbarte Amylase wird von derselben Firma unter dem Namen BAN® vertrieben.

Dieses Amylase-Molekül, beziehungsweise dessen nahen Verwandte, sind in zahlreichen Erfindungen weiterentwickelt worden, denen die Aufgabe zugrunde gelegen hat, mithilfe diverser molekularbiologischer Modifikationen ihre enzymatischen Eigenschaften auf spezifische Anwendungen hin zu optimieren. Solche Optimierungen können beispielsweise die Substratspezifitäten, die Stabilität des Enzyms unter verschiedenen Reaktionsbedingungen oder die enzymatische Aktivität selbst betreffen. Beispielhaft für solche Optimierungen seien folgende Anmeldungen genannt: EP 0410498 für das Schlichten von Textilien und WO 96/02633 zur Stärkeverflüssigung.

Da Entwicklungen, die lediglich in Optimierungen von nur wenigen bekannten Ausgangsenzymen bestehen, möglicherweise in den erzielbaren Ergebnissen beschränkt sind, findet parallel dazu eine intensive Suche nach vergleichbaren Enzymen aus anderen natürlichen Quellen statt. Identifiziert wurden stärke-spaltende Enzyme beispielsweise aus *Pimelobacter*, *Pseudomonas* und *Thermus* für die Lebensmittelherstellung, Kosmetik und Pharmaka (EP 0 636 693), ebensolche aus *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* und *Micrococcus* (EP 0 628 630), aus *Pyrococcus* (WO 94/19454) und *Sulfolobus* zur Stärkeverflüssigung bei hohen Temperaturen, beziehungsweise stark sauren Reaktionsbedingungen (EP 0 727 485 und WO 96/02633). Für den Einsatz bei alkalischen pH-Werten sind Amylasen aus *Bacillus* sp. (WO 95/26397 und WO 97/00324) gefunden worden. Wegen ihrer geringen Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien eignen sich andere Amylasen aus verschiedenen *Bacilli* (EP 0 670 367) zur Verwendung in Wasch- oder Reinigungsmitteln.

Weitere Optimierungen der aus natürlichen Quellen isolierten Enzyme für das jeweilige Anwendungsgebiet können beispielsweise über molekularbiologische Methoden (etwa gemäß US 5171673 oder WO 99/20768) oder über chemische Modifikationen vorgenommen werden (DE 4013142). In der Patentanmeldung WO 99/43793, beispielsweise, wird eine Weiterentwicklung der bekannten Novamyl®- α -Amylase

beschrieben. Darin werden Sequenzähnlichkeiten zwischen Novamyl® und bekannten Cyclodextringlucanotransferasen (CGTasen) ausgenutzt, um mithilfe molekularbiologischer Techniken eine Schar verwandter Moleküle zu konstruieren. Bei diesen handelt es sich um α -Amylasen mit zusätzlichen CGTase-spezifischen Consensus-Sequenzen (Boxen) und Funktionen oder, umgekehrt, um CGTasen mit zusätzlichen für α -Amylasen typischen Bereichen und Funktionen oder um Chimären beider Moleküle. Der Sinn dieser Entwicklung besteht darin, Novamyl® für diese Anwendungen zu optimieren.

Die Anmeldung WO 99/57250, beispielsweise, gibt eine Lehre an die Hand, für die Verwendung in Wasch- und Reinigungsmitteln geeignete Enzyme über einen chemischen Linker mit einer Bindungsdomäne zu verknüpfen, welche die effektive Enzymkonzentration auf dem Reinigungsgut erhöht.

Eine moderne Richtung der Enzymentwicklung besteht darin, Elemente aus bekannten, miteinander verwandten Proteinen über statistische Verfahren zu neuen Enzymen zu kombinieren, die bislang nicht erreichte Eigenschaften aufweisen. Solche Verfahren werden auch unter dem Oberbegriff Directed Evolution zusammengefaßt. Dazu gehören beispielsweise folgende Verfahren: Die StEP-Methode (Zhao et al. (1998), *Nat. Biotechnol.*, Band 16, S. 258-261), Random priming recombination (Shao et al., (1998), *Nucleic Acids Res.*, Band 26, S. 681-683), DNA-Shuffling (Stemmer, W.P.C. (1994), *Nature*, Band 370, S. 389-391) oder RACHITT (Coco, W.M. et al. (2001), *Nat. Biotechnol.*, Band 19, S. 354-359).

Voraussetzung zur Rekombination über derartige Verfahren ist, daß auf den eingesetzten Nukleinsäuren jeweils genügend lange Bereiche vorhanden sind, um unter den jeweiligen Bedingungen eine Hybridisierung zu erreichen. Für eine erfolgreiche Hybridisierung sind bei den Ausgangssequenzen Identitäten von mehr als 45% auf Aminosäure-Ebene zueinander als praktikabel anzusehen, zur Forcierung der homologen Neukombination von mehr 50%. Wenigstens zwei verschiedene, zueinander homologe Sequenzen definieren bereits einen Sequenzraum. Dieser enthält alle über Rekombination aus den Ausgangssequenzen theoretisch ableitbaren neuen Sequenzen. Sie können hierfür auch Homologiewerte von weniger als 45% aufweisen, sofern die von ihnen abgeleiteten Nukleinsäuren nach einer der im Stand der Technik etablierten Methoden zur Rekombination gebracht werden können.

Trotz all dieser Entwicklungen besteht aber unverändert die Aufgabe, neben den wenigen natürlichen amylytischen Enzymen, die unverändert oder in Gestalt von Weiterentwicklungen tatsächlich industriell genutzt werden, weitere aufzufinden, die *a priori* ein breites Anwendungsspektrum aufweisen und als Ausgangspunkt für anwendungsspezifische Weiterentwicklungen, insbesondere für statistische Rekombinationsverfahren dienen können.

Die genetische Vielfalt der gram-positiven Bakterien-Ordnung der Actinomycetales, insbesondere der Gattung *Streptomyces* ist bislang kaum auf amylytische Proteine hin untersucht worden, die für technische Zwecke geeignet sind. Lediglich zwei japanische Patentanmeldungen sind in diesem Zusammenhang zu betrachten. In der Anmeldung JP-A 62-143999 wird eine für die Verwendung in Wasch- oder Reinigungsmitteln geeignete α -Amylase aus einem Vertreter der Gattung *Streptomyces* offenbart. Dieser Organismus *Streptomyces* sp. KSM-9 oder FERM P-7620 stammt aus einem natürlichen Habitat und wächst im alkalischen Medium. Das amylytische Enzym wird in dieser Schrift lediglich über enzymatischen Parameter und seine Eignung für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln beschrieben, nicht jedoch über seine DNA- oder Aminosäuresequenz.

Das Enzym, das in der Anmeldung JP-A 2000-60546 offenbart wird und aus *Streptomyces* sp. TOTO-9805 oder FERM BP-6359 stammt, weist ähnliche enzymatische Eigenschaften wie das Enzym aus *Streptomyces* sp. KSM-9 auf. Es wird in dieser Anmeldung aber auch lediglich über enzymatische Parameter und nicht über die Aminosäure- oder Nukleotidsequenz charakterisiert. Hierdurch stehen beide Amylasen weder für eine heterologe Expression und Gewinnung noch für eine anwendungsspezifische Auswahl und Optimierung zur Verfügung. Denn sowohl klassische Mutageneseverfahren als auch Methoden der gerichteten Evolution (EP-PCR, Sequence-Shuffling, Family-Shuffling) beruhen auf den zugehörigen Nukleinsäuresequenzen.

Der vorliegenden Erfindung hat somit primär die Aufgabe zugrunde gelegen, natürliche, bislang noch nicht beschriebene α -Amylasen zu identifizieren, welche selbst für technische Einsatzmöglichkeiten geeignet sind oder als Grundlage für anwendungsspezifische Weiterentwicklungen dienen können.

Vorzugsweise sollte die Lösung dieser Aufgabe mit dem Auffinden mehrerer α -Amylasen oder von Teilsequenzen mehrerer α -Amylasen als erreicht angesehen werden, die miteinander verwandt sind und homologisiert werden können. Denn aus einer solchen Homologisierung kann ein Sequenzraum abgeleitet werden, welcher seinerseits als Ausgangspunkt für die Erzeugung weiterer Enzyme dienen kann. Besonders vorteilhaft sollte das Auffinden möglichst diverser α -Amylase-Sequenzen sein, weil dadurch ein entsprechend breiter Sequenzraum mit entsprechend vielen Variationsmöglichkeiten eröffnet wird; andererseits sollte die Homologie der erhaltenen Sequenzen zueinander aber noch hoch genug sein, um über bekannte Methoden eine Rekombination zu ermöglichen. Vorzugsweise sollten wenigstens einige Sequenzen zueinander Homologiewerte von jeweils 50 bis 60% Identität auf Aminosäure-Ebene aufweisen.

Eine Teilaufgabe bestand darin, die für derartige α -Amylasen codierenden Nukleinsäuren zu erhalten, da diese sowohl für die biotechnologische Herstellung als auch für die Weiterentwicklung dieser Enzyme unerlässlich sind.

Eine weitere Teilaufgabe bestand darin, die Organismen aufzufinden, welche die betreffenden α -Amylasen natürlicherweise produzieren.

Eine weitere Teilaufgabe bestand darin, ein Verfahren zu finden, nach welchem ein derartiger Pool an α -Amylasen bereitgestellt werden kann.

Als weitere Teilaufgabe sollten die erhaltenen α -Amylasen, α -Amylasefragmente oder α -Amylasegene oder deren Fragmente zur Auffindung oder Entwicklung neuer Enzyme genutzt werden können.

Eine weitere Teilaufgabe bestand darin, die biotechnologische Produktion der gefundenen oder ableitbaren α -Amylasen zu ermöglichen.

Eine weitere Teilaufgabe bestand darin, technische Einsatzmöglichkeiten für die gefundenen α -Amylasen zu definieren.

Die Lösung der ersten Aufgabe und damit den ersten Erfindungsgegenstand stellen amylolytische Proteine dar, deren Aminosäuresequenzen einen Teil enthalten, der mit

der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% beschrieben wird, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht. Hierzu gehören amylolytische Proteine mit den im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 34 bis 262 angegebenen Aminosäuresequenzen, vorzugsweise die in den Beispielen behandelten Enzyme, insbesondere die aus den Spezies *Streptomyces sp.* B327* und B400B erhaltenen Enzyme sowie Enzyme, die zu diesen hinreichende Ähnlichkeit aufweisen oder mit an sich bekannten Methoden von diesen abgeleitet werden können. Bevorzugte Vertreter lassen sich aus natürlichen Organismen, insbesondere denen der Ordnung Actinomycetales isolieren.

Aus diesen Sequenzen läßt sich über Homologisierung ein Sequenzraum ableiten, welcher seinerseits als Ausgangspunkt für die Erzeugung weiterer Enzyme dienen kann.

Den zweiten Erfindungsgegenstand bilden Nukleinsäuren, die für amylolytische Proteine codieren, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% beschrieben wird, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht. Hierzu gehören entsprechend bevorzugt die Nukleinsäuren, die für die jeweiligen Proteine des ersten Erfindungsgegenstands codieren, aber auch bestimmte Oligonukleotide, die in Verfahren zum Auffinden derartiger Gene oder Genfragmente (siehe unten) eingesetzt werden können.

Den dritten Erfindungsgegenstand bilden die natürlichen Organismen, die für die Proteine oder Proteinfragmente des ersten Erfindungsgegenstands codierende Nukleinsäuren enthalten. Besonders bevorzugte Ausführungsformen hiervon sind die Stämme *Streptomyces sp.* 327* oder *Streptomyces sp.* B400B, die unter den Bezeichnungen DSM 13990 und DSM 13991 hinterlegt worden sind.

Den vierten Erfindungsgegenstand bilden PCR-basierte Verfahren zur Identifizierung und/oder Gewinnung neuer Amylasen aus einer Sammlung von Organismen oder Nukleinsäuren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß PCR-Primer verwendet werden, die jeweils eine variable 3'-Region aufweisen und eine 5'-Region mit hoher Homologie zu Bereichen aus bekannten Amylasen. Derartige Verfahren können auf verschiedene Arten ausgestaltet und um optionale Arbeitsschritte erweitert werden: Hierzu gehören die Sequenzierung der erhaltenen Gene oder Genfragmente, Ableitung von Peptiden, die

über immunchemische Methoden oder über ihre biochemischen Eigenschaften charakterisiert werden können. Weitere Ausgestaltungen betreffen das Design der Primer hinsichtlich der Variabilität oder Auswahl der Bereiche, von denen sie abgeleitet werden; insbesondere, die in den Beispielen eingesetzten Primer stellen bevorzugte Ausführungsformen dar. Eine weitere Ausgestaltungsmöglichkeit betrifft die Herkunft des als PCR-Matrize dienenden Materials, wobei Sammlungen von Actinomycetales bevorzugt sind. In weiteren Ausführungsformen werden die PCR-Produkte über Expressionsbanken untersucht. Besonders bevorzugt ist eine Reaktionsführung, die zu einer Vielzahl von ähnlichen Produkten führt, über die ein Sequenzraum definiert werden kann.

Den fünften Erfindungsgegenstand bilden die nach einem Verfahren des vorherigen Erfindungsgegenstands erhaltenen α -Amylasen, α -Amylasefragmente oder α -Amylasegene oder deren Fragmente zur Auffindung oder Entwicklung neuer Enzyme, entweder, indem sie selbst für das Screening oder die Entwicklung neuartiger Primer verwendet werden, oder indem sie zur Fusion oder Verknüpfung mit einem anderen Protein oder Gen eingesetzt werden.

Den sechsten Erfindungsgegenstand bilden Vektoren mit den Nukleinsäuren des zweiten Erfindungsgegenstands, mit derartigen Vektoren transformierte Wirtszellen und alle biotechnologischen Verfahren zur Herstellung eines Proteins oder Derivats nach dem ersten Erfindungsgegenstand.

Den siebten Erfindungsgegenstand bilden die technischen Einsatzmöglichkeiten für die gefundenen α -Amylasen. Hierzu gehören Wasch- oder Reinigungsmittel, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie ein Protein oder Derivat gemäß dem ersten Erfindungsgegenstand enthalten, Verfahren zur Stärkeverflüssigung, insbesondere zur Ethanolproduktion, temporäre Klebverfahren und diverse Verwendungsmöglichkeiten, insbesondere zur Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung, insbesondere zum Entschlichten von Baumwolle, zur Herstellung von linearen und/oder kurzkettigen Oligosacchariden, zur Hydrolyse von Cyclodextrinen, zur Freisetzung von niedermolekularen Verbindungen aus Polysaccharidträgern oder Cyclodextrinen, zur Herstellung von Lebensmitteln und/oder Lebensmittelbestandteilen, zur Herstellung von Tierfutter und/oder Tierfutterbestandteilen und zur Auflösung stärkehaltiger Klebeverbindungen.

Unter einem **Protein** ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung ein aus den natürlichen Aminosäuren zusammengesetztes, weitgehend linear aufgebautes, zur Ausübung seiner Funktion zumeist dreidimensionale Struktur annehmendes Polymer zu verstehen. In der vorliegenden Anmeldung werden die 19 proteinogenen, natürlich vorkommenden L-Aminosäuren mit den international gebräuchlichen 1- und 3-Buchstaben-Codes bezeichnet.

Unter einem **Enzym** ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung ein Protein zu verstehen, das eine bestimmte biochemische Funktion ausübt. Unter **amylolytischen Proteinen** oder Enzymen mit amylolytischer Funktion sind solche zu verstehen, die α -1,4-glykosidische Bindungen von Polysacchariden hydrolysieren, insbesondere solche, die im Inneren der Polysaccharide liegen. Sie werden auch als α -1,4-Amylasen (E.C. 3.2.1.1) oder kurz: **α -Amylasen** bezeichnet.

Zahlreiche Proteine werden als sogenannte **Präproteine**, also zusammen mit einem **Signalpeptid** gebildet. Darunter ist dann der N-terminale Teil des Proteins zu verstehen, dessen Funktion zumeist darin besteht, die Ausschleusung des gebildeten Proteins aus der produzierenden Zelle in das Periplasma oder das umgebende Medium und/oder dessen korrekte Faltung zu gewährleisten. Anschließend wird das Signalpeptid unter natürlichen Bedingungen durch eine Signalpeptidase vom übrigen Protein abgespalten, so daß dieses seine eigentliche katalytische Aktivität ohne die zunächst vorhandenen N-terminalen Aminosäuren ausübt. Die **native** α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327*, beispielsweise, ist, wie in SEQ ID NO. 6 gezeigt ist, 461 Aminosäuren lang. Wie in SEQ ID NO. 5 dargestellt ist, umfaßt das Signalpeptid dieses Enzyms 30 Aminosäuren, so daß sich für das **mature Enzym** eine Länge von 431 Aminosäuren ergibt.

Für technische Anwendungen sind aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität die **maturen Peptide**, das heißt die nach ihrer Herstellung prozessierten Enzyme gegenüber den Präproteinen bevorzugt.

Pro-Proteine sind inaktive Vorstufen von Proteinen. Deren Vorläufer mit Signalsequenz werden als **Prä-Pro-Proteine** bezeichnet.

Unter **Nukleinsäuren** sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung die natürlicherweise aus Nukleotiden aufgebauten als Informationsträger dienenden Moleküle zu verstehen, die für die lineare Aminosäureabfolge in Proteinen oder Enzymen codieren. Sie können als Einzelstrang, als ein zu diesem Einzelstrang komplementärer Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Als der natürlicherweise dauerhaftere Informationsträger ist die Nukleinsäure **DNA** für molekularbiologische Arbeiten bevorzugt. Demgegenüber wird für die Realisierung der Erfindung in natürlicher Umgebung, wie beispielsweise in einer exprimierenden Zelle, eine **RNA** gebildet, weshalb erfindungswesentliche RNA-Moleküle ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

Bei DNA sind die Sequenzen beider komplementärer Stränge in jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß verschiedene Codon-Triplets für dieselben Aminosäuren codieren können, so daß eine bestimmte Aminosäure-Abfolge von mehreren unterschiedlichen und möglicherweise nur geringe Identität aufweisenden Nukleotidsequenzen abgeleitet werden kann (**Degeneriertheit des genetischen Codes**). Außerdem weisen verschiedene Organismen Unterschiede im **Gebrauch dieser Codons** auf. Aus diesen Gründen müssen sowohl Aminosäuresequenzen als auch Nukleotidsequenzen in die Betrachtung des Schutzbereichs einbezogen werden und angegebene Nukleotidsequenzen sind jeweils nur als eine beispielhafte Codierung für eine bestimmte Aminosäurefolge anzusehen.

Die einem Protein entsprechende Informationseinheit wird auch im Sinne der vorliegenden Anmeldung als **Gen** bezeichnet.

Einem Fachmann ist es über heutzutage allgemein bekannte Methoden, wie beispielsweise die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit molekularbiologischen und/oder proteinchemischen Standardmethoden möglich, anhand bekannter DNA- und/oder Aminosäuresequenzen die entsprechenden Nukleinsäuren bis hin zu vollständigen Genen herzustellen. Derartige Methoden sind beispielsweise aus dem „Lexikon der Biochemie“, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Band 1, S. 267-271 und Band 2, S. 227-229, bekannt.

Änderungen der Nukleotidsequenz, wie sie beispielsweise durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden herbeigeführt werden können, werden als **Mutationen**

bezeichnet. Je nach Art der Änderung kennt man beispielsweise **Deletions-**, **Insertions-** oder **Substitutionsmutationen** oder solche, bei denen verschiedene Gene oder Teile von Genen miteinander **fusioniert (shuffling)** werden; dies sind Genmutationen. Die zugehörigen Organismen werden als **Mutanten** bezeichnet. Die von mutierten Nukleinsäuren abgeleiteten Proteine werden als **Varianten** bezeichnet. So führen beispielsweise Deletions-, Insertions- Substitutionsmutationen oder Fusionen zu deletions-, insertions- substitutionsmutierten oder Fusionsgenen und auf Proteinebene zu entsprechenden Deletions-, Insertions- oder Substitutionsvarianten, beziehungsweise Fusionsproteinen.

Unter **Fragmenten** werden alle Proteine oder Peptide verstanden, die kleiner sind als natürliche Proteine oder solche, die vollständig translatierten Genen entsprechen, und beispielsweise auch synthetisch erhalten werden können. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen können sie den betreffenden vollständigen Proteinen zugeordnet werden. Sie können beispielsweise gleiche Strukturen annehmen oder proteolytische Aktivitäten oder Teilaktivitäten ausüben, wie beispielsweise die Komplexierung eines Substrats. Fragmente und Deletionsvarianten von Ausgangsproteinen sind prinzipiell gleichartig; während Fragmente eher kleinere Bruchstücke darstellen, fehlen den Deletionsmutanten eher nur kurze Bereiche, und damit nur einzelne Teilfunktionen.

Den Fragmenten entsprechen auf Nukleinsäure-Ebene die **Teilsequenzen**.

Unter **chimären** oder **hybriden** Proteinen sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Proteine zu verstehen, die aus Elementen zusammengesetzt sind, die natürlicherweise von verschiedenen Polypeptidketten aus demselben Organismus oder aus verschiedenen Organismen stammen. Dieses Vorgehen wird auch **Shuffling** oder **Fusionsmutagenese** genannt. Der Sinn einer solchen Fusion kann beispielsweise darin bestehen, mithilfe des heranfusionsierten Proteinteils eine bestimmte enzymatische Funktion herbeizuführen oder zu modifizieren. Es ist dabei im Sinne der vorliegenden Erfindung unwesentlich, ob solch ein chimäres Protein aus einer einzelnen Polypeptidkette oder mehreren Untereinheiten besteht, auf welche sich unterschiedliche Funktionen verteilen können. Zur Realisierung der letztgenannten Alternative ist es beispielsweise möglich, posttranslational oder erst nach einem Aufreinigungsschritt durch eine gezielte proteolytische Spaltung eine einzelne chimäre Polypeptidkette in mehrere zu zerlegen.

Unter durch **Insertionsmutation** erhaltene Proteinen sind solche Varianten zu verstehen, die über an sich bekannte Methoden durch Einfügen eines Nukleinsäure-, beziehungsweise Proteinfragments in die Ausgangssequenzen erhalten worden sind. Sie sind ihrer prinzipiellen Gleichartigkeit wegen den chimären Proteinen zuzuordnen. Sie unterscheiden sich von jenen lediglich im Größenverhältnis des unveränderten Proteinteils zur Größe des gesamten Proteins. In solchen insertionsmutierten Proteinen ist der Anteil an Fremdprotein geringer als in chimären Proteinen.

Inversionsmutagenese, also eine partielle Sequenzumkehrung, kann als Sonderform sowohl der Deletion, als auch der Insertion angesehen werden. Dasselbe gilt für eine von der ursprünglichen Aminosäureabfolge abweichende Neugruppierung verschiedener Molekülteile. Sie kann sowohl als Deletionsvariante, als Insertionsvariante, als auch als Shuffling-Variante des ursprünglichen Proteins angesehen werden.

Unter **Derivaten** werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Proteine verstanden, deren reine Aminosäurekette chemisch modifiziert worden ist. Solche Derivatisierungen können beispielsweise biologisch im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese durch den Wirtsorganismus erfolgen. Hierfür können molekularbiologische Methoden eingesetzt werden. Sie können aber auch chemisch durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette einer Aminosäure oder durch kovalente Bindung einer anderen Verbindung an das Protein. Bei solch einer Verbindung kann es sich beispielsweise auch um andere Proteine handeln, die beispielsweise über bifunktionelle chemische Verbindungen an erfindungsgemäße Proteine gebunden werden. Derartige Modifizierungen können beispielsweise die Substratspezifität oder die Bindungsstärke an das Substrat beeinflussen oder eine vorübergehende Blockierung der enzymatischen Aktivität herbeiführen, wenn es sich bei der angekoppelten Substanz um einen Inhibitor handelt. Dies kann beispielsweise für den Zeitraum der Lagerung sinnvoll sein. Ebenso ist unter Derivatisierung die kovalente Bindung an einen makromolekularen Träger zu verstehen.

Proteine können auch über die Reaktion mit einem Antiserum oder einem bestimmten Antikörper zu Gruppen **immunologisch verwandter** Proteine zusammengefaßt werden. Die Angehörigen einer Gruppe zeichnen sich dadurch aus, daß sie dieselbe, von einem Antikörper erkannte antigene Determinante aufweisen.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden alle Enzyme, Proteine, Fragmente und Derivate, sofern sie nicht explizit als solche angesprochen zu werden brauchen, unter dem **Oberbegriff Proteine** zusammengefaßt.

Unter **Vektoren** werden im Sinne der vorliegenden Erfindung aus Nukleinsäuren bestehende Elemente verstanden, die als kennzeichnenden Nukleinsäurebereich ein interessierendes Gen enthalten. Sie vermögen dieses in einer Spezies oder einer Zelllinie über mehrere Generationen oder Zellteilungen hinweg als vom übrigen Genom unabhängig replizierendes, stabiles genetisches Element zu etablieren. Vektoren sind insbesondere bei der Verwendung in Bakterien spezielle Plasmide, also zirkulare genetische Elemente. Man unterscheidet in der Gentechnik einerseits zwischen solchen Vektoren, die der Lagerung und somit gewissermaßen auch der gentechnischen Arbeit dienen, den sogenannten **Klonierungsvektoren**, und andererseits denen, die die Funktion erfüllen, das interessierende Gen in der Wirtszelle zu realisieren, das heißt, die Expression des betreffenden Proteins zu ermöglichen. Diese Vektoren werden als **Expressionsvektoren** bezeichnet.

Durch Vergleich mit bekannten Enzymen, die beispielsweise in allgemein zugänglichen Datenbanken hinterlegt sind, läßt sich aus der Aminosäure- oder Nukleotid-Sequenz die **enzymatische Aktivität** eines betrachteten Enzyms folgern. Diese kann durch andere Bereiche des Proteins, die nicht an der eigentlichen Reaktion beteiligt sind, qualitativ oder quantitativ modifiziert werden. Dies könnte beispielsweise die Enzymstabilität, die Aktivität, die Reaktionsbedingungen oder die Substratspezifität betreffen.

Solch ein Vergleich geschieht dadurch, daß ähnliche Abfolgen in den Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen der betrachteten Proteine einander zugeordnet werden. Dies nennt man **Homologisierung**. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als **Alignment** bezeichnet. Bei der Analyse von Nukleotidsequenzen sind wiederum beide komplementären Stränge und jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen; ebenso die Degeneriertheit des genetischen Codes und die organismenspezifische Codon-Usage. Inzwischen werden Alignments über Computerprogramme erstellt, wie beispielsweise durch die Algorithmen FASTA oder BLAST; dieses Vorgehen wird beispielsweise von D. J. Lipman und W. R. Pearson (1985) in *Science*, Band 227, S. 1435-1441 beschrieben.

Eine Zusammenstellung aller in den verglichenen Sequenzen übereinstimmenden Positionen wird als **Consensus-Sequenz** bezeichnet.

Solch ein Vergleich erlaubt auch eine Aussage über die Ähnlichkeit oder **Homologie** der verglichenen Sequenzen zueinander. Diese wird in **Prozent Identität**, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben Positionen widergegeben. Ein weiter gefaßter Homologiebegriff bezieht die konservierten Aminosäure-Austausche in diesen Wert mit ein. Es ist dann von **Prozent Ähnlichkeit** die Rede. Solche Aussagen können über ganze Proteine oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden.

Die Erstellung eines Alignments ist der erste Schritt zur Definition eines **Sequenzraums**. Dieser hypothetische Raum umfaßt sämtliche durch Permutation in Einzelpositionen abzuleitenden Sequenzen, die sich unter Berücksichtigung aller in den betreffenden Einzelpositionen des Alignments auftretenden Variationen ergeben. Jedes hypothetisch mögliche Proteinmolekül bildet einen Punkt in diesem Sequenzraum. Beispielsweise begründen zwei Aminosäuresequenzen, die bei weitgehender Identität an lediglich zwei verschiedenen Stellen jeweils zwei verschiedene Aminosäuren aufweisen, somit einen Sequenzraum von vier verschiedenen Aminosäuresequenzen. Ein sehr großer Sequenzraum wird erhalten, wenn zu einzelnen Sequenzen eines Raums jeweils weitere homologe Sequenzen gefunden werden. Über solche, jeweils paarweise bestehenden hohen Homologien können auch sehr niedrig homologe Sequenzen als einem Sequenzraum zugehörig erkannt werden.

Homologe Bereiche von verschiedenen Proteinen sind solche mit gleichen Funktionen, die sich durch Übereinstimmungen in der primären Aminosäuresequenz erkennen lassen. Sie geht bis zu völligen Identitäten in kleinsten Bereichen, sogenannten Boxen, die nur wenige Aminosäuren umfassen und meist für die Gesamtaktivität essentielle Funktionen ausüben. Unter den **Funktionen der homologen Bereiche** sind kleinste Teilfunktionen der vom gesamten Protein ausgeübten Funktion zu verstehen, wie beispielsweise die Ausbildung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen zur Komplexierung eines Substrats oder Übergangskomplexes.

Unter dem Begriff eines **erfindungsgemäßen amylolytischen Proteins** ist somit nicht allein eines mit der reinen, die Hydrolyse von α -1,4-glycosidischen Bindungen durchführenden Funktion zu verstehen, die auf die wenigen Aminosäurereste eines vermutlichen katalytisch aktiven Zentrums zurückzuführen sind. Er umfaßt darüberhinaus alle die Hydrolyse einer α -1,4-glycosidischen Bindung unterstützende Funktionen. Solche können beispielsweise von einzelnen Peptiden als auch von einem oder mehreren einzelnen Teilen eines Proteins durch Einwirken auf die eigentlich katalytisch aktiven Bereiche erreicht werden. Der Begriff der amylolytischen Funktion umfaßt auch allein solche modifizierenden Funktionen. Denn einerseits muß nicht notwendigerweise genau bekannt sein, welche Aminosäurereste des erfindungsgemäßen Proteins tatsächlich die Hydrolyse katalysieren, und andererseits können nicht von vornherein bestimmte Einzelfunktionen definitiv von der Beteiligung an der Katalyse ausgenommen werden. Zu den Hilfsfunktionen oder Teilaktivitäten gehören beispielsweise die Bindung eines Substrats, eines Zwischen- oder Endprodukts, die Aktivierung oder die Inhibierung oder Vermittlung eines regulierenden Einflusses auf die hydrolytische Aktivität. Dabei kann es sich beispielsweise auch um die Ausbildung eines Strukturelements handeln, das fern vom aktiven Zentrum liegt, oder um ein Signalpeptid, dessen Funktion die Ausschleusung des gebildeten Proteins aus der Zelle und/oder dessen korrekte Faltung betrifft und ohne das *in vivo* in der Regel kein funktionsfähiges Enzym gebildet wird. Allerdings muß sich insgesamt eine Hydrolyse von α -1,4-glycosidischen Bindungen von Stärke oder stärkeähnlichen Polymeren ergeben.

In diesem Sinne sind beispielsweise die Fragmente der α -Amylasen, die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 34 bis 262 angegeben sind, als amylolytische Proteine anzusehen. Denn sie sind naturgemäß Bestandteile größerer Proteine, die insgesamt die α -1,4-glycosidischen Bindungen von Stärke oder stärkeähnlichen Polymeren zu hydrolysieren vermögen.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist zwischen **Screening** (Hybridisierungs-Screening oder DNA-Screening) und **Aktivitätstest** zu unterscheiden. Im allgemeinen wird unter dem „Screening“ von Transformanten eine Nachweisreaktion verstanden, die dazu geeignet ist, solche Klone zu erkennen, bei denen das gewünschte Transformationsereignis stattgefunden hat. Es richtet sich, wie beispielsweise bei der geläufigen Blau-weiß-Selektion meist auf den Nachweis einer biochemischen Aktivität, die die Transformanten erhalten haben oder die nach erfolgter Rekombination nicht mehr

vorhanden ist. Diese Art von biochemischer Nachweisreaktion ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung als **Aktivitätstest** bezeichnet.

Screening bezeichnet das Durchsuchen einer Genbank mit bestimmten Nukleinsäuren und das damit mögliche Identifizieren von hinreichend ähnlichen Nukleinsäure-Sequenzen. Dies geschieht beispielsweise über Southern- oder Northern-Blot-Hybridisierungen, wie sie aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt sind. Dieser Begriff schließt beispielsweise aber auch erfindungsgemäße PCR-basierte Verfahren zur Identifizierung und/oder Gewinnung neuer Gene aus einer Sammlung von Organismen oder Nukleinsäuren ein, die dadurch gekennzeichnet sind, daß PCR-Primer mit einer variablen 3'-Region und einer 5'-Region mit hoher Homologie zu entsprechenden Bereichen aus bekannten Genen verwendet werden.

Unter der **Leistung eines Enzyms** wird dessen Wirksamkeit im jeweils betrachteten technischen Bereich verstanden. Diese basiert auf der eigentlichen enzymatischen Aktivität, hängt darüberhinaus aber von weiteren, für den jeweiligen Prozeß relevanten Faktoren ab. Dazu gehören beispielsweise Stabilität, Substratbindung, Wechselwirkung mit dem das Substrat tragenden Material oder Wechselwirkungen mit anderen Inhaltsstoffen, insbesondere Synergien. So wird beispielsweise bei der Untersuchung, ob sich ein Enzym für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln eignet, dessen Beitrag zur Wasch- oder Reinigungsleistung eines mit weiteren Bestandteilen formulierten Mittels betrachtet. Für verschiedene technische Anwendungen kann ein Enzym über an sich bekannte molekularbiologische Techniken, insbesondere die oben genannten weiterentwickelt und optimiert werden.

Gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen vom 28. April 1977 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b in 38124 Braunschweig am 15.01.2001 folgende Mikroorganismen hinterlegt: Unter der Eingangsnummer DSM 13990 das Isolat Actinomycetales / *Streptomyces* sp. B327* und unter der Eingangsnummer DSM 13991 das Isolat Actinomycetales / *Streptomyces* sp. B400B.

Sie sind gemäß der vorliegenden Anmeldung insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß sie Gene für α -Amylasen enthalten, deren vollständige DNA- und Aminosäure-

sequenzen im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 5 und 6, beziehungsweise SEQ ID NO. 7 und 8 angegeben sind.

Zur Lösung der gestellten Aufgabe wird erfindungsgemäß eine Vielzahl von α -Amylasen bereitgestellt, die alle als Vertreter eines bestimmten Sequenzraums anzusehen sind. Dieser ist über eine Teilsequenz dieser α -Amylasen definiert, nämlich einen Teil des für Amylasen bekannten Strukturelements $(\alpha\beta)_8$ -Barrel. Alle amylytischen Proteine, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der diesem spezifischen Sequenzraum angehört, sowie hinreichend ähnliche Proteine sind erfindungsgemäße Amylasen.

Dieser Sequenzraum ist in Figur 3 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 263 auf zwei verschiedene Weisen dargestellt. Es sind verkürzte Schreibweisen oder Zusammenfassungen aller gefundenen Sequenzen. Darin wird eine 100 Positionen umfassende Teilsequenz amylytischer Proteine gezeigt. In 86 dieser Positionen treten Sequenzvariationen auf. So wird beispielsweise die Position 6 in der Darstellung der Figur 3 von der Aminosäure X_0 eingenommen; bei dieser kann es sich um Isoleucin oder Leucin handeln. Dieselbe Information liefert das Sequenzprotokoll in den, der Consensus-Sequenz vorangestellten Zeilen. Anschließend werden alle Möglichkeiten in einer künstlichen Consensus-Sequenz zusammengefaßt. Besonders zu beachten ist, daß die Aminosäuren einzelner Positionen, wie beispielsweise in Position 28 durch eine einzelne oder auch durch eine Folge mehrerer Aminosäuren eingenommen werden können.

Die gezeigte Consensus-Sequenz verfügt in den Positionen 1-7 und 94-100 nur über eine sehr geringe Varianz. Diese ergibt sich aus der weiter unten und in den Beispielen beschriebenen, PCR-basierten Methode, die zur Identifizierung dieser Sequenz entwickelt worden ist: Diese Teilsequenzen entsprechen den DNA-Bereichen, an die die zur Amplifizierung eingesetzten Primer gebunden haben. Je nach Stringenz der Bedingungen, unter denen diese Bindung stattfindet, können auch abweichende Nukleotidfolgen gebunden und amplifiziert werden; die als Produkt erhaltene DNA stimmt somit bei vergleichsweise niedriger Selektivität an diesen Stellen nicht völlig mit der Matrize überein. Aus diesem Grund richtet sich der Schutzbereich insbesondere auf den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 der gezeigten Consensus-Sequenz entspricht.

Diese, den Sequenzraum beschreibende Consensus-Sequenz beruht auf 231 homologisierbaren Teilsequenzen von α -Amylasen. Diese sind im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 2, 4 und SEQ ID NO. 34 bis 262 dargestellt. Sie definieren über ihre Variationen in definierten Einzelpositionen den oben genannten Sequenzraum.

Die Herleitung einer solchen Consensus-Sequenz soll im folgenden erläutert werden; technische Details sind jeweils den Beispielen der vorliegenden Anmeldung zu entnehmen.

Die Sequenzen von α -Amylasen (E.C. 3.2.1.1), beispielsweise von gram-positiven Eubakterien verschiedener Gattungen der Ordnung Actinomycetales (*Streptomyces*, *Thermomonospora* und anderer), können aus allgemein zugänglichen Datenbanken erhalten werden. Ihr Vergleich, beispielsweise über das Erstellen eines Alignments erlaubt die Identifizierung von Sequenzbereiche, die zwischen den Spezies konserviert sind. Ein breiter Sequenzraum ergibt sich, wenn solche konservierten Bereiche erkannt werden, die variable Sequenzbereiche flankieren. Diese konservierten Bereichen werden auch als Sequenzanker bezeichnet, weil über sie die variablen Sequenzbereiche faßbar gemacht werden. Als konservierte Sequenzblöcke wurden die in Figur 1 hervorgehobenen Blöcke A bis E identifiziert. Aus ihren Aminosäuresequenzen, besser jedoch aus ihren Nukleotidsequenzen können PCR-Primer abgeleitet werden, die als *forward*- und *reverse*-Primer so aufeinander gerichtet sein sollen, daß bei einer PCR jeweils der variable Bereich erfaßt wird.

Als Matrize für die PCR können genomische DNA-Präparationen bekannter, aber auch unbekannter bakterieller Isolate dienen, beispielsweise aus Bodenproben. Sie sollten in Reinkultur vorliegen, um später reine PCR-Produkte und reine Enzyme zu liefern. Derartige Proben können schlicht aus der Natur entnommen und über Anlegen bestimmter Bedingungen (beispielsweise pH-Wert, Belüftung, verwertbares Substrat, Anwesenheit ansonsten toxischer Verbindungen, Lichteinfall etc.) kultiviert werden. Darin wachsen entsprechend geeignete Einzeller heran, die nach an sich bekannten Methoden vereinzelt und unter den entsprechenden Bedingungen weiterkultiviert werden können.

Eine Übersicht über Methoden zur Isolierung von Actinomyceten und Streptomyceten geben folgende Artikel:

- Nüesch (1965): „Isolierung und Selektionierung von Actinomyceten“; *Zbl. Bakt. I.*, Supplement 1, S. 234-252;
- Williams & Cross (1971): „Actinomyces“; in: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Herausgeber) *Methods in Microbiology, Acad. Press, London*, Band 4, S. 295-334;
- Williams & Wellington (1982): „Principles and Problems of selective Isolation of Microbes“, in: Bullock, J.D., Nisbet, L.J., Win-stanley, D.J. (Herausgeber), „Bioactive Microbial Products: Search and Discovery“, *Acad. Press London*, S. 9-26; und
- Wellington & Cross (1983): „Taxonomy of antibiotic-producing actinomycetes and new approaches for their selective isolation“, *Progr. Industr. Microbiol.*, Band 17, S. 7-36.

Im Beispiel wurde eine entsprechende Sammlung von Isolaten von Actinomycetales mit *Streptomyces*-Eigenschaften eingesetzt. Die Isolierung war in diesem Beispiel ausgehend von Bodenproben unter Zusatz des Antibiotikums Nystatin zur Unterdrückung der Begleitflora erfolgt.

Aus den entsprechenden PCR-Ansätzen konnten insbesondere mit der Primerkombination GEX024 (forward) / GEX026 (SEQ ID NO. 9, beziehungsweise 10) positive Ergebnisse erzielt werden. Diese sind aus den Sequenzbereichen C (GEX024) und D (GEX026), abgeleitet (Figur 1) und entsprechen den Amylasedomänen $\beta 4$ und $\beta 7$ der $(\alpha\beta)_8$ -Barrelstruktur, wie sie im Aufsatz „Alpha-Amylase family: molecular biology and evolution“ (Janecek, S. (1997), *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67 (1), S. 67-97) definiert sind. Sie lieferten für alle getesteten Isolate PCR-Produkte von ca. 300 bp Länge.

Diese PCR-Produkte wurden sequenziert. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 2, 4 und 34 bis 262 aufgeführt. Ein Vergleich dieser Teilsequenzen mit den Eintragungen in der Enzym-Datenbank GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) bestätigt, daß es sich bei allen um Teilsequenzen von Amylasen handelt. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Tabelle 1 dargestellt. Dort werden jeweils auch die zu den gefundenen Teilsequenzen nächstähnlichen Datenbankeinträge sowie der Grad der Homologie zwischen diesen beiden angegeben.

Tabelle 1: Aufstellung der 231 Einzelsequenzen mit den Identitäten zu ihren nächsten Verwandten in GenBank (NCBI; Release 121.0); ermittelt mit dem Programm FASTA am 2.2.2001.

<i>Streptomyces sp. ...</i>	SEQ ID NO. gemäß Sequenzprotokoll	Nächster Datenbankhit	Identität (%)
B327*	2	Y13332	92
B400B	4	M15540	74,2
B1002	34	AL352956	81
B1003B	35	AL352956	80
B1006	36	M15540	85,6
B1008A1	37	U51129	77
B1009A	38	Y13332	88
B1010	39	Y13332	88
B1011	40	Y13332	90
B1012B	41	Y13332	89
B1014A1	42	Y13332	91
B1017C	43	Y13332	91
B1019	44	Y13332	90
B101A	45	Z85949	83
B101B	46	Y13332	88
B102	47	M18244	64
B1020C	48	U51129	96
B1022A	49	Y13332	85
B1028	50	Z85949	74
B1029	51	AL352956	80
B1030A	52	Z85949	81
B1035B	53	M25263	74
B1036	54	Y13332	85
B1037A	55	M25263	82
B1039A	56	AL352956	86
B103A	57	Z85949	82
B1041A1	58	Y13332	91
B1043A	59	AL352956	97
B1044C	60	AL352956	75
B1045	61	Y13332	91
B1046A	62	AL352956	90

B1047A1	63	Z85949	97
B1048A	64	AL352956	96
B1049A	65	AL352956	86
B1050A	66	Z85949	85
B1052A2	67	AL352956	88
B1053	68	M18244	97
B1059	69	M15540	75,3
B1060	70	M25263	80
B1061B	71	Z85949	80
B1065	72	M25263	79
B1067A	73	AL352956	81
B1068	74	M25263	79
B1069B	75	M18244	92
B106C	76	Y13332	89
B107	77	U51129	87
B1070A	78	Y13332	92
B1071	79	M25263	79
B1072A	80	Y13332	94
B108	81	M25263	92
B109A	82	Y13332	86
B114C	83	Y13332	88
B115	84	Y13332	90
B117A1	85	Y13332	88
B118	86	M25263	80
B119E	87	U51129	75
B120alt	88	Y13332	88
B123	89	M18244	92
B124	90	Y13332	89
B125C	91	Z85949	89
B126A	92	Y13332	86
B127A	93	Y13332	85
B128B	94	U51129	85
B130B	95	M25263	93
B131	96	M25263	92

B134	97	M25263	92
B135A	98	Y13332	86
B137	99	M25263	78
B138	100	U51129	85
B138A	101	U51129	85
B138A2	102	U51129	86
B140	103	M25263	92
B141	104	M25263	92
B142	105	X57568	77
B143	106	M25263	92
B148A	107	Y13332	88
B152A	108	M25263	82
B153(B)	109	AL352956	89
B154A	110	Y13332	87
B156B	111	AL352956	89
B157C	112	Y13332	88
B158A	113	Y13332	89
B159	114	Y13332	89
B160B	115	Y13332	88
B161A	116	X57568	86
B166B	117	U51129	89
B168	118	Y13332	88
B179	119	M25263	82
B181C	120	Y13332	89
B183B	121	X57568	97
B184	122	M18244	96
B185(B)	123	Y13332	88
B186A	124	Y13332	83
B187A	125	AL352956	88
B187A2	126	AL352956	88
B194A	127	Z85949	62
B194B1	128	Y13332	87
B196A2C	129	Y13332	87
B196B	130	Y13332	87

B197B	131	Y13332	87
B198C2	132	Y13332	92
B200B	133	Y13332	88
B201A	134	Y13332	87
B202A	135	Y13332	87
B202B	136	Y13332	88
B206A	137	Y13332	87
B207	138	Y13332	90
B208B	139	Z85949	85
B209B	140	Y13332	87
B210	141	Z85949	89
B211A	142	Y13332	88
B212B1	143	Y13332	88
B213	144	Y13332	86
B214B	145	AL352956	79
B214C	146	M25263	83
B215	147	Y13332	88
B218D2	148	Y13332	87
B219A	149	Y13332	88
B220B	150	Y13332	88
B221A	151	Y13332	88
B222(B)	152	Z85949	88
B223A	153	U51129	88
B224(A)	154	Y13332	87
B225B	155	AL352956	73
B226B	156	AL352956	88
B227B2	157	Z85949	76
B228B	158	U51129	88
B230B1	159	AL352956	75
B231A	160	Z85949	74
B233C	161	Z85949	76
B234	162	Y13332	88
B235A	163	Z85949	76
B237A	164	Y13332	89

B238A	165	Y13332	89
B240A	166	Y13332	87
B241B2	167	Y13332	88
B242A1	168	M25263	78
B243C	169	U51129	86
B244B2	170	AL352956	75
B246	171	Y13332	89
B247A	172	Z85949	74
B248B2	173	AL352956	81
B249A	174	AL352956	75
B249C	175	U51129	77
B250A2	176	Y13332	87
B251B	177	Y13332	88
B252A	178	U51129	86
B253	179	Y13332	89
B253A	180	U51129	87
B255B2	181	Y13332	89
B256A	182	Y13332	88
B259A	183	Y13332	88
B261	184	U51129	96
B278	185	Z85949	87
B279	186	Y13332	88
B280C	187	Y13332	88
B284A	188	Y13332	86
B286A	189	Y13332	87
B287	190	M25263	81
B292A	191	M25263	95
B3001org	192	Y13332	84
B3002org	193	Z85949	74
B3003org	194	Y13332	88
B3017	195	X57568	77
B306	196	Y13332	84
B308	197	Y13332	87
B311	198	M25263	81

B315	199	Y13332	87
B317	200	X57568	82
B318	201	M25263	76
B319	202	Y13332	87
B320A	203	Y13332	89
B321	204	M25263	78
B322A	205	Y13332	89
B323	206	M25263	83
B326	207	Y13332	84
B327B	208	X57568	94
B335org	209	M25263	83
B345	210	Y13332	88
B346	211	Y13332	91
B347	212	X59159	45,2
B348	213	Y13332	85
B350	214	Y13332	90
B352	215	Y13332	90
B353	216	Y13332	76
B354	217	Y13332	87
B355	218	Y13332	87
B356	219	Y13332	92
B357	220	X57568	75
B358	221	M25263	80
B359	222	Y13332	89
B360	223	Y13332	86
B361	224	M18244	44,2
B362	225	Y13332	87
B363org	226	U51129	86
B366	227	Y13332	89
B368	228	Y13332	86
B370	229	AL352956	80
B371	230	Y13332	92
B372	231	Y13332	88
B373	232	Y13332	88

B374B	233	Y13332	89
B375	234	Y13332	89
B376	235	Y13332	91
B380	236	Y13332	87
B382	237	Y13332	85
B390	238	M25263	83
B392A	239	AL352956	97
B393	240	Z85949	74
B394	241	Z85949	76
B395	242	Y13332	88
B396(A)	243	Y13332	90
B400	244	Y13332	88
B4006	245	Y13332	89
B4006B	246	X59159	94,2
B400A	247	Y13332	88
B400A2	248	Y13332	92
B400B3	249	M25263	80
B400C	250	X57568	94
B400C2	251	M18244	91
B400D	252	M25263	89
B400D2	253	M25263	89
B400E	254	M25263	79
B400G	255	Y13332	87
B400G2	256	Y13332	87
B400I	257	M25263	81
B400J	258	X59159	45,7
B400K	259	X59159	45,7
B400L	260	X59159	45,7
B402	261	M25263	90
B907	262	M25263	80

Der Vergleich mit den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen zeigt, daß die nächstähnlichen Proteine Homologiewerte von 97% Identität aufweisen. Das sind im

Falle der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B1053 das Enzym mit der Zugangsnummer M18244, bei dem es sich um die α -Amylase aus *Streptomyces limosus* handelt, im Falle der Enzyme aus *Streptomyces* sp. B1043A und B392A das mit der Zugangsnummer AL352956 (α -Amylase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2)) und im Falle der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B1047A1 das Enzym mit der Zugangsnummer Z85949, wobei es sich um die α -Amylase B aus *Streptomyces lividans* handelt.

Über diese 231 Sequenzen ist ein Alignment möglich; im vorliegenden Beispiel ist eines mithilfe des Programms Clustal X[®], Version 1.64b (Standardeinstellungen; beschrieben in: Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994), „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice“, *Nucleic Acids Res.*, Band 22, Seiten 4673-4680) erstellt worden. Die Consensus-Sequenz ist, wie bereits oben angegeben, in Figur 3 und SEQ ID NO. 263 in zwei alternativen Darstellungen zu finden.

Diese Consensus-Sequenz, und damit der über die variablen Aminosäuren definierte zugehörige Sequenzraum basiert also auf 231 einzelnen Sequenzen, die aus natürlichen Quellen erhalten werden konnten. Dieser Sequenzraum umfaßt rechnerisch ca. 10⁵¹ verschiedene Aminosäuresequenzen. Sie alle werden von der Consensus-Sequenz beschrieben. Andererseits sind bislang keine Amylasen bekannt, die einen homologen Bereich besitzen, der zu irgendeiner dieser Sequenzen zu mehr als 97% identisch ist.

Diese Consensus-Sequenz definiert somit eine völlig neue Gruppe von α -Amylasen. Sie bezeichnet einen Bereich, der zwischen den beiden konservierten Regionen C und D liegt, die in Figur 1 gezeigt sind. Dabei handelt es sich um ein Sekundärstrukturelement, nämlich um die Domänen β 4 und β 7 der $(\alpha\beta)_8$ -Barrelstruktur, wie sie im Aufsatz von S. Janecek (1997) in *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67 (1), S. 67-97) definiert sind. Dieser Bereich wird für die Enzymfamilie der α -Amylasen als charakteristisch und als notwendiges Strukturelement angesehen. Denn es gewährleistet die optimale räumliche Anordnung der anderen funktionellen Teile des Moleküls, insbesondere des aktiven Zentrums.

Davon unabhängig ist für neu gefundene oder erzeugte Sequenzen jedoch auch eine andere Umgruppierung von Domänen denkbar. Deshalb stellen auch all jene α -Amylasen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, die an beliebiger Stelle

eine Teilsequenz enthalten, die sich durch die Consensus-Sequenz der SEQ ID NO. 263 beschreiben läßt.

Die Identitäten der Aminosäuresequenzen innerhalb dieses Sequenzraums liegen in der erwünschten Größenordnung. So weisen die beiden Teilsequenzen der α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B327* und B400B zueinander eine Homologie von 57% Identität auf Aminosäure-Ebene auf. Insgesamt wurde als minimaler Wert für zwei der ermittelten 231 Einzelsequenzen 32% und als maximaler Wert 99% Identität auf Aminosäure-Ebene ermittelt. Damit ist jede der gefundenen Sequenzen zu jeder anderen innerhalb dieses Sequenzraums mindestens zu 32% identisch. Teilweise ergeben sich, wie auch anhand der Werte in Tabelle 1 abgeschätzt werden kann, wesentlich darüber liegende Werte; denn es wurden als zu den verschiedenen Sequenzen nächstähnliche bekannte Proteine häufig dieselben gefunden.

Für Methoden zur Gewinnung neuer Enzyme über statistische Rekombination (beispielsweise gemäß Zhao et al. (1998), *Nat. Biotechnol.*, Band 16, S. 258-261, Shao et al., (1998), *Nucleic Acids Res.*, Band 26, S. 681-683 oder Stemmer, W.P.C. (1994), *Nature*, Band 370, S. 389-391 werden zwischen den eingesetzten Sequenzen Homologiewerte von mehr als 30% auf Aminosäure-Ebene als Voraussetzung angesehen. Vorteilhaft sind Werte von mehr 45%. Mit dem nun zur Verfügung gestellten Sequenzraum, insbesondere mit dessen tatsächlich offenbarten Vertretern wird ein Pool verwandter Sequenzen mit ausreichender Sequenzhomologie bereitgestellt, der eine weitere anwendungsrelevante Optimierung durch gerichtete Evolution ermöglicht. Deren Diversität läßt andererseits auf variierende amylytische Eigenschaften schließen, was beispielsweise Temperatur-Optima oder die Stabilität gegenüber externen Einflüssen betrifft.

Für derartige Methoden können alle in diesen Sequenzraum fallenden Moleküle ausgewählt werden oder Gruppen daraus, gewissermaßen Teilsequenzräume. Das hängt davon ab, wieviele Varianten erzeugt werden sollen oder ob nur bestimmte Teilbereiche variiert werden sollen. Bereits zwei der in diesen Raum fallenden Sequenzen definieren einen eigenständigen (Teil-)Sequenzraum.

Da die Consensus-Sequenz in einzelnen Positionen wie beispielsweise der Aminosäure 28 Folgen mehrerer Aminosäuren erlaubt sind und andere Positionen wie 45 oder 70

auch unbesetzt bleiben können, können sich innerhalb dieser mit 100 Aminosäurepositionen bezeichneten Consensus-Sequenz auch Homologiewerte mit einem nicht ganzzahligen Prozentwert ergeben.

Aus diesem Grund werden erfindungsgemäß alle amylolytischen Proteine beansprucht, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 zu 98% und zunehmend bevorzugt zu 98,25%, zu 98,5%, zu 98,75%, zu 99%, zu 99,25%, zu 99,5%, zu 99,75% und besonders bevorzugt zu 100% beschrieben wird. Dies gilt, wie oben dargelegt, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht.

Diese Argumentation trifft besonders auf jene amylolytischen Proteine zu, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 34 bis SEQ ID NO. 262 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 98% und zunehmend bevorzugt zu 98,25%, zu 98,5%, zu 98,75%, zu 99%, zu 99,25%, zu 99,5%, zu 99,75% und besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

Denn für diese sind die betreffenden Teilsequenzen auf die oben beschriebene Weise ermittelt worden und werden mit dem Sequenzprotokoll zur Verfügung gestellt. Die im Ergebnis in Tabelle 1 dargelegte Datenbanksuche hat ergeben, daß bislang keine α -Amylase bekannt ist, die eine der angegebenen Teilsequenzen enthält. Die höchste gefundene Homologie liegt bei 97% (siehe oben). Diese Aminosäuresequenzen definieren einen Sequenzraum, der in den Schutzbereich miteinbezogen wird. Somit stellt jeder Punkt dieses Sequenzraums eine erfindungsgemäße Teilsequenz und eine Lösung der vorgegebenen Aufgabe dar.

Insbesondere werden in den Schutzbereich solche Enzyme eingeschlossen, die einer oder beiden der hoch konserviert erscheinenden Positionen 11 und 75, die in der Consensus-Sequenz durchgehend mit Histidin, beziehungsweise Leucin besetzt sind, konservierte Austausche tragen. Hierunter gehören eine der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin oder Prolin anstelle des Histidin und/oder eine der aliphatischen Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin oder Isoleucin anstelle des Leucin.

Die α -Amylasen dieses Sequenzraums sind dadurch gekennzeichnet, daß sich mit den für sie codierenden Genen als Matrize in einer PCR mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 Fragmente amplifizieren lassen, die durch die Consensus-Sequenz der SEQ ID NO. 263 beschreibbar sind und mit einer der im Sequenzprotokoll angegebenen Teilsequenzen identisch sind. Insbesondere die Teilbereiche von den Positionen 8 bis 93 sind aufgrund der Natur der PCR für die betreffenden Fragmente charakteristisch.

Dies konnte in Beispiel 1 für folgende Stämme von *Streptomyces sp.* gezeigt werden: B101A, B114C, B134, B135A, B138A, B152A, B153(B), B156B, B157C, B158A, B160B, B161A, B373, B375, B380, B390, B392A und B394. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte aus der genomischen DNA dieser Actinomycetales-Isolate aus verschiedenen natürlichen Habitaten und Ableitung der zugehörigen Aminosäuresequenz wurden die Sequenzen erhalten, die im Sequenzprotokoll unter folgenden Nummern angegeben sind: SEQ ID NO. 45, 83, 97, 98, 101, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 116, 232, 234, 236, 238, 239 und 241.

Wie aus Tabelle 1 entnommen werden kann, besitzt die Amylase aus dem Stamm *Streptomyces sp.* B392A zu einer bekannten α -Amylase in dem Bereich der Consensus-Sequenz das höchste Maß an Homologie der hier aufgeführten Amylasen. Es liegt bei 97% gegenüber der α -Amylase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Datenbankeintrag AL352956). Diese Aminosäuresequenzen definieren einen Sequenzraum, der einen Teilraum des durch die Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 beschriebenen Sequenzraums darstellt. Er wird in den bevorzugten Schutzbereich miteinbezogen. Somit stellt jeder Punkt dieses Sequenzraums eine erfindungsgemäße Teilsequenz und eine bevorzugte Lösung der vorgegebenen Aufgabe dar.

Anders formuliert, werden alle α -Amylasen beansprucht, deren Aminosäuresequenzen in einem Teilbereich mit der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 homologisiert werden können, in diesem Bereich nur solche Aminosäuren aufweisen, die an der entsprechenden Position in einer dieser drei Sequenzen liegen. In diesem Sinne können sie in jeder Position dieses Teils auf eine dieser Sequenzen zurückgeführt werden.

Aus diesem Grund werden erfindungsgemäß alle amyloytischen Proteine beansprucht, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer dieser Sequenzen zu 98%

und zunehmend bevorzugt zu 98,25%, zu 98,5%, zu 98,75%, zu 99%, zu 99,25%, zu 99,5%, zu 99,75% und besonders bevorzugt zu 100% identisch ist oder in jeder homologen Position unmittelbar auf eine dieser Sequenzen zurückgeführt werden kann. Dies gilt, wie oben dargelegt, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht.

In den Beispielen werden die α -Amylasen der Stämme *Streptomyces* sp. B327*, B400B, und B327 eingehender untersucht. Die der Consensus-Sequenz (SEQ ID NO. 263) entsprechenden Teilbereiche dieser Amylasen werden im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 2, 4 und 208 gezeigt. Aus Tabelle 1 kann entnommen werden, daß das höchste Maß an Homologie, welches zu einer dieser Amylasen durch Datenbanksuche ermittelt werden konnte, die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327B aufweist. Es liegt bei 94% Identität mit der α -Amylase aus *Streptomyces griseus* (Datenbankeintrag X57568).

Diese Aminosäuresequenzen definieren einen Sequenzraum, der einen Teilraum des durch die Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 beschriebenen Sequenzraums darstellt. Er wird in den besonders bevorzugten Schutzbereich miteinbezogen. Somit stellt jeder Punkt des von diesen Sequenzen definierten Sequenzraums eine erfindungsgemäße Teilsequenz und eine besonders bevorzugte Lösung der vorgegebenen Aufgabe dar. Sie können abgeleitet werden, indem über ein Alignment über den Bereich, der der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht, in den aufeinanderfolgenden Aminosäurepositionen jeweils solche Aminosäuren eingesetzt werden, die sich an derselben Stelle in einer der genannten Ausgangssequenzen befindet.

Aus diesem Grund werden erfindungsgemäß alle amyloytischen Proteine beansprucht, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer dieser Sequenzen zu 95% und zunehmend bevorzugt zu 96%, zu 96,5%, zu 97%, zu 97,5%, zu 98%, zu 98,5%, zu 99%, zu 99,5% und besonders bevorzugt zu 100% identisch ist. Dies gilt, wie oben dargelegt, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht.

Wie beispielsweise aus dem Alignment der Figur 5 abgelesen werden kann, weisen die α -Amylasen der Stämme *Streptomyces* sp. B327* und B400B zueinander über die Gesamtlänge ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie von 57% Identität auf. Dieser

Wert läßt sie für statistische Verfahren zur Erzeugung neuer Sequenzen für amylolytische Proteine als besonders geeignet erscheinen.

Diese beiden amylolytischen Enzyme definieren über ihre vollständigen, auch in SEQ ID NO. 6, beziehungsweise 8 angegebenen Aminosäuresequenzen einen eigenen, den vollständigen Proteinen entsprechenden Sequenzraum. Weitere Angehörige dieses Raums, die sich durch Neukombination der in den betreffenden Positionen vorgegebenen Aminosäuren aus diesen beiden Sequenzen ableiten lassen, stellen ebenfalls Lösungen der Aufgabe dar. Sie können über ein der Figur 5 entsprechendes Alignment abgeleitet werden, indem jede der Positionen von einer Aminosäure eingenommen wird, die sich an der homologen Stelle in einer der beiden Ausgangssequenzen befindet.

Erfindungsgemäß sollen dabei auch konservierte Austausche möglich sein. Dazu gehören Austausche innerhalb der folgenden Aminosäuregruppen:

- Aliphatische Aminosäuren: G, A, V, L, I;
- Schwefelhaltige Aminosäuren: C, M;
- Aromatische Aminosäuren: F, Y, W;
- Hydroxylgruppenhaltige Aminosäuren: S, T;
- Säureamidgruppenhaltige Aminosäuren: N, Q;
- Saure Aminosäuren: D, E;
- Basische Aminosäuren: H, K, R, P.

Den konservierten Austauschen gegenüber bevorzugt sind solche Aminosäurepositionen, die unmittelbar auf eine der beiden Ausgangssequenzen zurückgeführt werden können, das heißt mit einer der beiden vorgegebenen Aminosäuren identisch sind.

In den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung fallen somit alle amylolytischen Proteine, deren Aminosäuresequenzen in jeder einzelnen homologen Position auf eine der beiden Sequenzen von *Streptomyces* sp. B327* und B400B durch einen konservierten Austausch, vorzugsweise unmittelbar zurückgeführt werden können.

Eine bevorzugte Lösung der gestellten Aufgabe stellen amylolytische Proteine dar, die eine Aminosäuresequenz besitzen, die mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 93% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen

31 bis 461, besonders bevorzugt in den Positionen 210-300. Bei dieser handelt es sich um die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen α -Amylase aus dem Actinomycetales-Isolat *Streptomyces* sp. B327*.

In Beispiel 4 der vorliegenden Anmeldung ist detailliert dargestellt, wie eine derartige, ein vollständiges Gen enthaltende Sequenz erhalten werden kann. Hierfür wird geeigneterweise eine Expressionsgenbank hergestellt, das heißt die genomische DNA der Ausgangsorganismen, in denen das spezielle Gen gefunden werden soll, fragmentiert und in vereinzelt Wirtsorganismen zur Expression gebracht.

Zur Klonierung und Isolierung von Genen, zumindest von α -Amylasegenen aus Actinomycetales kann, wie Beispiel 4 zeigt, eine Expressionsklonierung im heterologen Wirtsorganismus *Escherichia coli* durchgeführt werden. Gemäß Horinouchi et al. (Horinouchi, S. Uozumi, T. Beppu, T. (1980): „Cloning of *Streptomyces* DNA into *Escherichia coli*: Absence of Heterospecific Gene Expression of *Streptomyces* Genes in *E. coli*.“; *Agric. Biol. Chem.*, Band 44 (2), S. 367-381) kann keine heterologe Erkennung der Promotoren aus Actinomyceten im Wirtsorganismus *E. coli* vorausgesetzt werden. Somit empfiehlt es sich, von außen induzierbare Promotoren zu verwenden, beispielsweise den mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) induzierbaren β -Galactosidase-Promotor des lac-Operons (*lac*-Promotor) aus *E. coli*. In Wirtsstämmen mit einem *lacI^q*-Genotyp (zum Beispiel JM109) kann so durch Zugabe von IPTG die Expression der unter Kontrolle dieses Promotors stehenden Gene induziert werden.

Die *E. coli* Stämme JM 109, DH 10B und DH 12S erwiesen sich als geeignet für die Klonierung der aus Actinomycetales stammenden α -Amylasen und ihrem aktivitätsabhängigen Nachweis. Denn obwohl sie über die von *malS* codierten periplasmatischen Enzyme verfügen (Freundlieb, S., Boos, W. (1986): „Alpha-amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, *malS*, and identification of its product as a periplasmic protein“; *J. Biol. Chem.* 261 (6), S. 2946-2953), zeigten sie unter den Versuchsbedingungen keine nennenswerte Amylasefreisetzung. Die (gram-negativen) *E.-coli*-Stämme JM 109, DH 10B und DH 12S erwiesen sich auch hinsichtlich der Erkennung der Ribosomenbindungsstellen (*Shine Dalgarno*-Sequenzen) der Amylasegene aus den (gram-positiven) Actinomycetales und der Erkennung der aminoterminalen Signalsequenzen und der Ausschleusung aus der Zelle zur Bildung des

reifen Enzyms als geeignete Wirte. Offensichtlich wirkte auch die Expression von Streptomyceten-Amylasen auf die Wirtszellen nicht toxisch.

Gereinigte genomische DNA aus den zu untersuchenden Stämmen, im Beispiel 4 aus den Actinomycetales-Isolaten, muß somit also partiell gespalten, und ein an der erwarteten Gengröße orientierter, handhabbarer Größenbereich in entsprechend linearisierte Plasmidvektoren ligiert werden. Aus der mittleren Insertgröße und der gewünschten Genomabdeckung ergibt sich die für jede Genbank zu erzeugende Mindestklonzahl. Im Falle der α -Amylasen aus Actinomycetales hat sich eine Insertgröße von 3 bis 5 kb und eine Zahl von 40 000 zu erhaltenden Klonen ergeben.

Alternativ zur Erstellung einer genomischen Bank ist auch die Konstruktion einer cDNA-Bank möglich, die auf den mRNAs, also den tatsächlich exprimierten Genen aufbaut. Bei Genen jedoch, die in den Ausgangsorganismen nur niedrig oder schwach exprimiert werden, sind bei genomische Banken jedoch eher positive Ergebnisse zu erwarten.

Die erhaltenen Klone werden auf erfolgte Rekombination getestet, beispielsweise über die bekannte Blau/Weiß-Selektion und schließlich auf die Expression des interessierenden Proteins. Im vorliegenden Beispiel erfolgte die Detektion der α -Amylase über ihre enzymatische Aktivität. Alternativ wäre beispielsweise aber auch ein immunchemischer Nachweis möglich oder ein Screening über Hybridisierung mit bekannten Sonden.

Die zuletztgenannte Möglichkeit eignet sich besonders für schwach, oder in den Wirtszellen nicht exprimierte Gene. Hierfür können beispielsweise Nukleinsäure-Fragmente eingesetzt werden, wie sie nach der in den Beispielen 1 bis 3 beschriebenen PCR erhalten werden können. Möglicherweise sind auch solche Sonden geeignet, die anhand der im Sequenzprotokoll angegebenen Teilsequenzen oder Primersequenzen abgeleitet werden können. Beim Rückübersetzen der Aminosäuresequenz in eine Nukleotidsequenz sollte die jeweilige Codon-Usage berücksichtigt werden. Diese hängt davon ab, aus welchen Ausgangsorganismen die Genbank erstellt worden ist.

Aus positiv getesteten Klonen können nun nach an sich bekannten Methoden die zugehörigen DNA-Sequenzen abgeleitet werden. Außerdem stellen sie den Ausgangspunkt für alle nachfolgenden Klonierungen, Modifizierungen etc. dar.

Für das Actinomycetales-Isolat *Streptomyces* sp. B327* (siehe Beispiel 2) sind die auf diese Weise erhaltenen vollständigen DNA- und davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 5 und 6 dargestellt.

Das offene Leseraster für die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* (SEQ ID NO. 5) beginnt mit einem GTG-Startcodon, welches zur Initiation der Translation nicht mit Valin sondern mit Methionin übersetzt wird. Darauf wird auch im Sequenzprotokoll unter der Rubrik "misc_feature" hingewiesen: für die Positionen 1 bis 3 gilt das Merkmal "INIT_MET". Darüber hinaus befinden sich im Bereich bis zu 10 Nukleotiden stromaufwärts dieses Startcodons Sequenzen, die den Ribosomenbindungsstellen, das heißt den Shine-Dalgarno Sequenzen entsprechen.

Insgesamt umfaßt das Gen 1386 Nucleotide, die für insgesamt 461 Aminosäuren codieren. Von diesen werden die ersten 30 Aminosäuren als typische Signalsequenzen grampositiver Bakterien vorhergesagt, wie es für ein sekretiertes Enzym zu erwarten ist. Darauf weist im Sequenzprotokoll (SEQ ID NO. 5) das Merkmal "mat_peptide" hin, welches für die Positionen 91 bis 1383 gilt; denn dieser Bereich codiert für das mature Protein. In der Aminosäuresequenz (SEQ ID NO. 6) entsprechen die Positionen 201 bis 300 dem Bereich, der in der PCR-Typisierung (Beispiel 3) mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 amplifiziert werden konnte.

Mit den erhaltenen DNA- und Aminosäuresequenzen für das native und das mature Protein der α -Amylase von *Streptomyces* sp. B327* und mit der zugehörigen Nukleotidsequenz sind folgende Datenbanken auf die nächstähnlichen Eintragungen durchsucht worden: Genpept/GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Schweiz; <http://www.genebio.com/sprot.html>). Die Suche erfolgte an verschiedenen Tagen jeweils über den Server des EMBL-European Bioinformatics Institute (EBI) in Cambridge, Großbritannien (<http://www.ebi.ac.uk>). Durchgeführt wurden die Sequenzvergleiche nach der FASTA-Methode (W. R. Pearson, D. J. Lipman, *PNAS* (1988) 85, S. 2444-2448), das heißt mit dem Programm Fasta3 (Matrix: blosum62 und default parameters). Das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnis der Recherche in den Datenbanken Genpept/GenBank und Swiss-Prot über den EMBL-Server mit den Aminosäuresequenzen für das native (vollständige) und das mature Protein (ohne Leader-Peptid) der α -Amylase von *Streptomyces sp. B327**, sowie den zugehörigen DNA-Sequenzen; durchgeführt jeweils mit dem Programm FASTA.

Sequenz	Datenbank	Datum	Homologie in % Identität	Nächster Hit Acc.-No.
vollst. DNA	EMBL 1.0, 2000; 65.0, 2000; GenBank 121, 2000, 1.0 2001	18.01.01	83.5	U51129
DNA ohne Leader	EMBL 1.0, 2000; 65.0, 2000; GenBank 121, 2000, 1.0 2001	16.01.01	84.8	U51129
vollst. Protein	Genpept/Genbank 121, 2000	24.01.01	80	U51129
vollst. Protein	Swiss-Prot 39.0, 2000, EMBL 1.0, 2000	04.01.01	78.7	P27350
Protein ohne Leader	Genpept/Genbank 121, 2000	24.01.01	82.4	U51129
Protein ohne Leader	Swiss-Prot 39.0, 2000, EMBL 1.0, 2000	16.01.01	81.2	P27350

Auf Proteinebene weist die α -Amylase aus *Streptomyces sp. B327** die höchste Homologie zu dem Genbank-Datenbankeintrag U51129 auf; sie liegt bei 80% Identität über die Sequenz für das native Protein und bei 82,4% für das mature Protein. Bei diesem nächstähnlichen Enzym handelt es sich um die α -Amylase aus *Streptomyces albus*. Eine Suche in der Swiss-Prot-Datenbank dagegen ergab mit Werten von 78,7, beziehungsweise 81,2% Identität als besten Hit den Eintrag P27350; das ist die α -Amylase aus *Streptomyces thermoviolaceus*. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der α -Amylasen von *Streptomyces sp. B327** und *Streptomyces albus* ist in Figur 5 gezeigt; es sind dort die mit U51129, beziehungsweise B 327* bezeichneten Sequenzen.

Somit werden mit der vorliegenden Anmeldung alle amylolytischen Proteine beansprucht, deren Aminosäuresequenz, mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 85% und zunehmend bevorzugt zu 87,5%, zu 90%, zu 92,5%, zu 95%, zu 96%, zu 97%, zu 98%, zu 99% und ganz besonders zu 100% identisch ist. Dies gilt vorzugsweise für das mature Protein, das heißt, soweit sich das aus den bekannten Sequenzen abschätzen läßt, für die Positionen 31 bis 461.

Für die zunehmend bevorzugten Ausführungsformen von mehr als 95% Identität gilt dieses Maß an Identität vorzugsweise in den Positionen 31 bis 461 und besonders bevorzugt in den Positionen 210 bis 300. Denn für den zuletzt genannten Aminosäure-Bereich, der der Consensus-Sequenz von Figur 3, beziehungsweise SEQ ID NO. 263 entspricht, ist als nächstähnliche Sequenz, wie bereits in Tabelle 1 ausgewiesen ist, ein Datenbankeintrag gefunden worden, der zu diesem Bereich eine Identität von 92% aufweist. Dabei handelt es sich um den Eintrag Y13332, das heißt um die α -Amylase aus *Streptomyces sp.* TO1.

Ganz besonders stellen solche amylolytischen Proteine Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe dar, deren Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 31 bis 461, besonders bevorzugt in den Positionen 210-300.

Dieses, aus *Streptomyces sp.* B327* gefundene Protein kann, wie in den Beispielen 5 und 6 ausführlich dargestellt ist, in verschiedenen Wirtszellen heterolog exprimiert werden. Es kann beispielsweise *Streptomyces lividans* TK24 verwendet werden, welcher selbst keine meßbaren Amylasemengen in Flüssigmedien sekretiert. Als Expressionsvektor eignet sich beispielsweise der Expressionsvektor pAX5a (Faß S.H., Engels, J.W. 1996, „Influence of Specific Signal Peptide Mutations on the Expression and Secretion of the alpha-Amylase Inhibitor Tendamistat in *Streptomyces lividans*“, *J. Biol. Chem.*, Band 271 (Nummer 25), S. 15244-15252; Figur 6). In diesem Vektor steht die Expression unter der Kontrolle des konstitutiven *ermE*-Promotors. Alternativ ist beispielsweise auch eine Expression in *E. coli* DH 12S möglich.

In Beispiel 6 werden die enzymatischen Eigenschaften dieses heterolog produzierten Proteins untersucht. Demnach ist die α -Amylase aus *Streptomyces sp.* B327* bei 41,3°C maximal aktiv. Im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich weist sie ihre höchste, über

die Aktivität zu ermittelnde Stabilität auf. In einem Medium mit geringem SDS-Gehalt zeigt sie höhere Aktivität als in einem ohne SDS. In Gegenwart von Chelatbildnern mit zweiwertigen Kationen sinkt die Aktivität geringfügig. Diese Eigenschaften machen die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* zu einem interessanten Kandidaten für technische Anwendungen. Weiterentwicklungen dieses Enzyms über molekularbiologische Methoden werden innerhalb des oben bezeichneten Ähnlichkeitsbereichs in den Schutzbereich der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

Gewerblichen Anwendungen für dieses amyolytische Protein werden beispielhaft weiter unten ausführlich dargelegt.

Auf die gleiche Weise wie oben für die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* beschrieben, konnte auch eine erfindungsgemäße α -Amylase aus dem Actinomycetales-Isolat B400B erhalten werden. Deren vollständige DNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 7 und 8 dargestellt.

Das offene Leseraster der Nukleotidsequenz umfaßt insgesamt 1377 Nucleotide. Es beginnt mit einem TTG-Startcodon, welches ähnlich wie bei dem entsprechenden Enzym in *Streptomyces* sp. B327* zur Initiation der Translation nicht mit Leucin sondern mit Methionin übersetzt wird. Darauf wird auch im Sequenzprotokoll (SEQ ID NO. 7) unter der Rubrik "misc_feature" hingewiesen: für die Positionen 1 bis 3 gilt das Merkmal "INIT_MET". Der folgende Bereich enthält ebenfalls die Ribosomenbindungsstellen.

Die ersten 29 Aminosäuren werden als Exportsignalsequenz (des Proenzym) vorhergesagt, so daß das mature Protein mit der Aminosäurefolge TPPGE beginnt. Darauf weist im Sequenzprotokoll (SEQ ID NO. 7) das Merkmal "mat_peptide" hin, welches für die Positionen 88 bis 1374 gilt; denn dieser Bereich codiert für das mature Protein. Die vollständige Aminosäuresequenz zeigt SEQ ID NO. 8; dort beginnt das mature Protein mit der Position 30. Die Positionen 200 bis 296 entsprechen dem Bereich, der in der PCR-Typisierung (Beispiel 3) mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 amplifiziert werden konnte. Das Protein umfaßt 458 Aminosäuren.

Für dieses Enzym, beziehungsweise für die für dieses Enzym codierende DNA wurden die gleichen Datenbank-Recherchen wie für das aus dem Stamm B327* durchgeführt; deren Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Ergebnis der Recherche in den Datenbanken Genpept/GenBank und Swiss-Prot über den EMBL-Server mit den Aminosäuresequenzen für das native (vollständige) und das mature Protein (ohne Leader-Peptid) der α -Amylase von *Streptomyces* sp. B400B, sowie den zugehörigen DNA-Sequenzen; durchgeführt jeweils mit dem Programm FASTA.

Sequenz	Datenbank	Datum	Homologie in % Identität	Nächster Hit Acc.-No.
vollst. DNA	EMBL 1.0, 2000; 65.0, 2000; GenBank 121, 2000, 1.0 2001	19.01.01	81.9	U08602
DNA ohne Leader	EMBL 1.0, 2000; 65.0, 2000; GenBank 121, 2000, 1.0 2001	17.01.01	82.6	U08602
vollst. Protein	Genpept/Genbank 121, 2000	24.01.01	76.8	U08602
vollst. Protein	Swiss-Prot 39.0, 2000, EMBL 1.0, 2000	04.01.01	71.6	P08486
Protein ohne Leader	Genpept/Genbank 121, 2000	24.01.01	77.7	U08602
Protein ohne Leader	Swiss-Prot 39.0, 2000, EMBL 1.0, 2000	16.01.01	72.2	P08486

Auf Proteinebene weist die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B400B die höchste Homologie zu dem Genbank-Datenbankeintrag U08602 auf; sie liegt bei 76,8% Identität über die Sequenz für das native Protein und bei 77,7% für das mature Protein. Bei diesem nächstähnlichen Enzym handelt es sich um die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. (GenBank Acc.-No. U8602). Eine Suche in der Swiss-Prot-Datenbank dagegen ergab als besten Hit mit Werten von 71,6, beziehungsweise 72,2% Identität den Datenbankeintrag P08486, bei dem es sich um die α -Amylase aus *Streptomyces hygroscopicus* handelt.

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der α -Amylasen von *Streptomyces* sp. B400B und *Streptomyces* sp. (GenBank Acc.-No. U8602) ist in Figur 5 gezeigt; die betreffenden Aminosäuresequenzen werden dort mit U08602, beziehungsweise B400B bezeichnet.

Somit werden mit der vorliegenden Anmeldung alle amylolytischen Proteine beansprucht, deren Aminosäuresequenz, mit der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 80% und zunehmend bevorzugt zu 82,5%, zu 85%, zu 87,5%, zu 90%, zu 92,5%, zu 95%, zu 96%, zu 97%, zu 98%, zu 99% und ganz besonders zu 100% identisch ist.

Dies gilt vorzugsweise für das mature Protein, das heißt, soweit sich das aus den bekannten Sequenzen abschätzen läßt, für die Positionen 30 bis 448.

Besonders bevorzugt gilt dies für die Positionen 200 bis 296. Denn für diesen Aminosäure-Bereich, der der Consensus-Sequenz von Figur 3, beziehungsweise SEQ ID NO. 263 entspricht, ist, wie bereits in Tabelle 1 ausgewiesen ist, als nächstähnliche Sequenz ein Datenbankeintrag (M15540) gefunden worden, der zu diesem Bereich eine Identität von lediglich 74,2% aufweist. Dabei handelt es sich wiederum um die α -Amylase aus *Streptomyces hygroscopicus*, denn der EMBL-Eintrag M15540 entspricht in Swiss-Prot dem Eintrag P08468.

Ganz besonders stellen solche amylolytischen Proteine Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe dar, deren Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Aminosäuresequenz identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 30 bis 448, besonders bevorzugt in den Positionen 200 bis 396.

Dieses, aus *Streptomyces* sp. B400B gefundene Protein kann, wie in den Beispielen 4 und 5 ausführlich dargestellt und weiter oben bereits für die Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* angegeben ist, in verschiedenen Wirtszellen, beispielsweise *Streptomyces lividans* oder *E. coli* heterolog exprimiert werden. Es steht damit für alle gewerblichen Anwendungen zur Verfügung, wie sie beispielhaft weiter unten ausführlich dargelegt werden.

Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen Fragmente amylolytischer Proteine oder amylolytische, durch Deletionsmutation erhältliche Proteine dar, die sich von einem der oben beschriebenen Proteine ableiten lassen.

Dzu gehören beispielsweise solche Fragmente, die zur Komplexierung eines Substrats oder zur Ausbildung eines für die Hydrolyse erforderlichen Strukturelements beitragen. Es kann sich beispielsweise um einzelne Domänen handeln. Solche Fragmente können kostengünstiger herzustellen sein, bestimmte eventuell nachteilige Charakteristika des Ausgangsmoleküls nicht mehr besitzen, wie möglicherweise einen aktivitätssenkenden Regulationsmechanismus, oder ein günstigeres Aktivitätsprofil entfalten. Derartige Proteinfragmente können auch nicht-biosynthetisch, beispielsweise chemisch hergestellt werden. Derartige Methoden sind beispielsweise aus dem „Lexikon der Biochemie“, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Band 2, S. 194-196, bekannt. Die chemische Synthese kann beispielsweise dann vorteilhaft sein, wenn im Anschluß an die Synthese chemische Modifikationen vorgenommen werden sollen.

Die Erzeugung von amylolytischen Deletionsvarianten erscheint beispielsweise bei der Deletion inhibierender Bereiche sinnvoll. Im Ergebnis können mit den Deletionen sowohl eine Spezialisierung als auch eine Erweiterung des Anwendungsbereichs des Proteins einhergehen.

So ist es beispielsweise in Anlehnung an WO 99/57250 möglich, ein erfindungsgemäßes Protein oder Teile davon über peptidische oder nicht-peptidische Linker mit Bindungsdomänen aus anderen Proteinen zu versehen und dadurch die Hydrolyse des Substrats effektiver zu gestalten. Ebenso können erfindungsgemäße amylolytische Proteine beispielsweise auch mit Proteasen verknüpft werden, um Proteine mit einer Doppelfunktion zu erhalten.

Als natürlicherweise gebildete Fragmente, beziehungsweise deletionsmutierte Proteine kann man auch die von Präproteinen durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren erhältlichen Proteine und Signalpeptide ansehen. Solch ein Spaltungsmechanismus kann auch dazu verwendet werden, um mithilfe bestimmter Sequenzbereiche, die von Signalpeptidasen erkannt werden, in rekombinanten Proteinen spezifische Spaltstellen vorzugeben. Somit können *in vitro* Aktivierung und/oder Deaktivierung erfindungsgemäßer Proteine vorgenommen werden. Es können auch durch Deletion

einzelne, jeweils nicht mehr als 15 zusammenhängende, und zunehmend bevorzugt nicht mehr als jeweils 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 zusammenhängende und eine Aminosäure umfassende Bereiche aus dem Molekül entfernt werden. Dies ist dann besonders zweckmäßig, wenn dadurch der Beitrag zur Waschleistung nicht verschlechtert oder sogar verbessert wird.

Entsprechend den oben gemachten Ausführungen sind zunehmend solche Fragmente oder Deletionsvarianten bevorzugt, die Teile enthalten, die innerhalb der oben angegebenen Homologie-Werte ganz oder in Teilen den Positionen 210 bis 300 der SEQ ID NO. 6, beziehungsweise 200 bis 296 der SEQ ID NO. 8 entsprechen, und besonders solche, die Teile enthalten, die innerhalb der oben angegebenen Homologie-Werte den Positionen 8 bis 93 der Consensus-Sequenz der Figur 3, beziehungsweise SEQ ID NO. 263 entsprechen.

Weitere Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe sind amylytische, durch Insertionsmutation erhältliche oder amylytische chimäre Proteine, welche wenigstens in einem eine amylytische Aktivität verleihenden Teil aus einem der oben beschriebenen Proteine bestehen, besonders aus einem entsprechenden maturen Protein, ganz besonders aus einem Teil der oben beschriebenen Proteine, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der SEQ ID NO. 263 entspricht.

Erfindungsgemäß sollen die durch die Fusion erhaltenen Proteine eine im weitesten Sinne amylytische oder die Hydrolyse von α -1,4-glycosidischen Bindungen unterstützende Funktion aufweisen, herbeiführen oder modifizieren. Diese kann von einem Molekülteil ausgeübt oder modifiziert werden, das sich von einem erfindungsgemäßen Protein herleitet und innerhalb des oben beanspruchten Ähnlichkeitsbereichs für diesen Molekülteil liegt.

Bei solchen Molekülteilen kann es sich um Teile handeln, die über ihre Consensus-Sequenzen oder Boxen als homolog zu den Enzymen aus anderen Organismen erkannt werden können. Solche Bereiche verleihen dem Enzym zumeist seine charakteristischen enzymatischen Funktionen. Sie können auch über verschiedene Domänen, also globuläre Bereiche des Proteinmoleküls verteilt liegen. Zum Gegenstand der Erfindung gehören daher auch solche chimären Proteine, die aufgrund ihrer Konstruktion über ihre gesamte Aminosäure- und oder Nukleotidsequenz hinweg eine gegebenenfalls geringere

Identität aufweisen als für den erfindungsgemäßen Ähnlichkeitsbereich oben definiert, die ihm aber in mindestens einer der durch Fusion eingebrachten Bereiche zugerechnet werden können und in diesem Teil dieselben Funktionen wie in einer Amylase ausüben, die in den oben definierten Homologiebereich fällt.

Dies gilt für die Proteine, die sich von den SEQ ID NO. 6 oder 8 ableiten lassen, aber auch für die Bereiche, die außerhalb der in SEQ ID NO. 263 dargestellten Consensus-Sequenz liegen. Denn diese bezeichnet, wie in Beispiel 1 gezeigt ist, gerade einen hochvariablen Bereich von α -Amylasen.

Dasselbe gilt aufgrund ihrer prinzipiellen Gleichartigkeit auch für durch Insertionsmutation zu erhaltende Varianten der oben genannten amylolytischen Proteine. Der Sinn von Insertionsmutagenese besteht besonders darin, einzelne Eigenschaften erfindungsgemäßer Proteine mit denen anderer Proteine zu kombinieren. Es handelt sich dann um erfindungsgemäße, durch Insertionsmutation zu erhaltende Proteine oder chimäre Proteine, wenn die über ihre Homologie auf die oben genannten Sequenzen zurückzuführenden Bereiche entsprechende Homologiewerte aufweisen und die erhaltene Variante aufgrund dieser Bereiche eine im weitesten Sinne amylolytische Funktion besitzt.

So ist es beispielsweise in Anwendung der Lehre von WO 99/57250 möglich, solch ein Enzym zur Erhöhung der Wechselwirkung mit dem Substrat mit einer Cellulose-Bindungsdomäne zu koppeln. In analoger Weise können beispielsweise auch andere wasch- oder reinigungsaktive Enzyme mit einer erfindungsgemäßen Amylase fusioniert werden. Es ist dabei prinzipiell unerheblich, ob die Fusion N- oder C-terminal oder über Insertion erfolgt.

Unter amylolytischen Derivaten der zuvor genannten Proteine werden solche Proteine verstanden, die sich über chemische oder biologische, insbesondere molekularbiologische Modifizierungen von jenen Proteinen ableiten, die selbst eine amylolytische Aktivität besitzen oder die Hydrolyse von internen α -1,4-glycosidischen Bindungen unterstützen und innerhalb des oben angegebenen Ähnlichkeitsbereichs liegen. Zunehmend bevorzugt sind Derivate der entsprechend bevorzugten Ausgangsmoleküle.

Dabei handelt es sich insbesondere um Moleküle, die durch chemische Kopplung von niedermolekularen Verbindungen oder von Polymeren erhalten werden können. Der Sinn einer derartigen Modifikation, etwa in Anlehnung an die Lehre von WO 00/22103, kann in der Reduzierung der allergenen Wirkung, gemäß WO 99/58651 in einer Optimierung der enzymatischen Parameter oder gemäß EP 1088887 in der Erhöhung der Stabilität liegen. Beispielsweise in Anwendung der Lehre von WO 00/26354 können die Proteine auch über Glykosylierung modifiziert werden.

Je nach Gewinnung, Aufarbeitung oder Präparation eines Proteins kann es mit diversen anderen Stoffen vergesellschaftet sein, insbesondere wenn es aus natürlichen Produzenten dieses Proteins gewonnen worden ist. Es kann dann, aber auch unabhängig davon, mit bestimmten anderen Stoffen gezielt versetzt worden sein, beispielsweise zur Erhöhung seiner Lagerstabilität. Als Derivate sind deshalb auch alle Präparationen der oben genannten Proteine zu verstehen. Das ist auch unabhängig davon, ob sie in einer bestimmten Präparation tatsächlich diese enzymatische Aktivität entfalten oder nicht. Denn es kann gewünscht sein, daß sie bei der Lagerung keine oder nur geringe Aktivität besitzen und diese erst zum Zeitpunkt der Verwendung entfalten. Dies kann beispielsweise über den Faltungszustand des Proteins gesteuert werden oder aus der reversiblen Bindung eines oder mehrerer Begleitstoffe oder aus einem sonstigen Kontrollmechanismus resultieren.

Die erfindungsgemäßen Proteine können vor allem während der Lagerung durch Stabilisatoren beispielsweise vor Denaturierung, Zerfall oder Inaktivierung, etwa durch physikalische Einflüsse, Oxidation oder Proteolyse geschützt werden. Vielfach werden auch sich ergänzende oder gegenseitig steigernde Kombinationen von Stabilisatoren verwendet.

Eine Gruppe von Stabilisatoren sind reversible Proteaseinhibitoren, wie beispielsweise Benzamidin-Hydrochlorid und Leupeptin, Borax, Borsäuren, Boronsäuren, deren Salze oder Ester, Peptidaldehyde oder rein peptidische Inhibitoren wie Ovomucoid oder spezifische Subtilisin-Inhibitoren. Weitere geläufige Enzymstabilisatoren sind Aminoalkohole wie Mono-, Di-, Triethanol- und -propanolamin, aliphatische Carbonsäuren bis zu C₁₂, Dicarbonsäuren, niedere aliphatische Alkohole, v.a. aber Polyole, wie beispielsweise Glycerin, Ethylenglykol, Propylenglykol oder Sorbit. Ebenso werden Calciumsalze verwendet, wie beispielsweise Calciumacetat oder Calcium-

Formiat, Magnesiumsalze, verschiedenste Polymere wie beispielsweise Lignin, Cellulose-Ether, Polyamide oder wasserlösliche Vinyl-Copolymere, um die Enzym-Präparation v.a. gegenüber physikalischen Einflüssen oder pH-Wert-Schwankungen zu stabilisieren. Reduktionsmittel und Antioxidantien, wie beispielsweise Natrium-Sulfit oder reduzierende Zucker, erhöhen die Stabilität der Proteine gegenüber oxidativem Zerfall.

Weitere Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe sind amylolytische Proteine oder Derivate, die wenigstens eine antigene Determinante mit einem der oben genannten Proteine oder Derivate gemeinsam haben.

Denn entscheidend für die Ausübung enzymatischer Aktivitäten ist nicht allein die pure Aminosäureabfolge eines Proteins, sondern auch dessen Sekundärstrukturelemente und dessen dreidimensionale Faltung. So können in ihrer Primärstruktur deutlich voneinander abweichende Domänen räumlich weitgehend übereinstimmende Strukturen ausbilden und somit gleiches enzymatisches Verhalten ermöglichen. Solche Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur werden üblicherweise als übereinstimmende antigene Determinanten von Antiseren oder reinen oder monoklonalen Antikörpern erkannt. Über immunchemische Kreuzreaktionen können somit einander strukturell ähnliche Proteine oder Derivate detektiert und zugeordnet werden. Zum anderen kann über die immunologische Kreuzreaktion leicht der Nachweis erbracht werden, daß eine erfindungsgemäße Amylase in einem entsprechenden Mittel, beispielsweise einem Wasch- oder Reinigungsmittel, tatsächlich aktiv ist

Deshalb werden in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung gerade auch solche Proteine oder Derivate einbezogen, die amylolytische Aktivität aufweisen und möglicherweise nicht über ihre Homologiewerte in der Primärstruktur, wohl aber über ihre immunchemische Verwandtschaft den oben definierten erfindungsgemäßen Proteinen oder Derivaten zugeordnet werden können.

Umgekehrt können erfindungsgemäße Proteine oder Derivate dazu verwendet werden, um verwandte Amylasogene oder Amylasen zu gewinnen, zu identifizieren oder zu untersuchen. Dies ist beispielsweise über alle molekularbiologischen Methoden möglich, bei denen Antikörper gegen entsprechende Bereiche verwendet werden, etwa bei einem Screening einer Expressionsgenbank.

Bevorzugte Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe stellen die oben definierten amylolytischen Proteine oder Derivate dar, wenn sie aus natürlichen Quellen erhältlich sind. Hierzu gehören Proben natürlicher Habitats, Anreicherungskulturen, Zellkulturen, Isolate oder kultivierte Einzelorganismen. Bevorzugt sind Mikroorganismen. Denn sie können nach den im Stand der Technik etablierten Methoden kultiviert und unmittelbar zur Proteingewinnung oder als Ausgangspunkte für molekularbiologische Methoden eingesetzt werden.

Es kann sich jedoch auch um Organismen handeln, die selbst nicht oder nur sehr schwierig zu kultivieren sind, deren Proteine oder deren DNA jedoch über an sich bekannte Methoden aus natürlichen Habitats isoliert und analysiert werden können. Es kann sich auch um Mischungen von derartigen Organismen handeln. Bevorzugt sind jeweils solche Stämme, die das amylolytische Protein unter kontrollierbaren Bedingungen bilden und in das sie umgebende Medium abgeben.

Als Mikroorganismen sind nicht zuletzt wegen ihres Protein-Synthese- und Ausschleusungsmechanismus gram-positive Bakterien, und hierunter solche der Ordnung Actinomycetales bevorzugt. Denn für diese stehen nicht zuletzt aufgrund der Angaben in den Beispielen der vorliegenden Anmeldung entsprechende Methoden zur Verfügung. Aus Actinomycetales konnten, wie in den Beispielen angegeben ist, die dieser Anmeldung zugrundeliegenden Sequenzen für amylolytische Proteine, insbesondere für einen Teil die Consensus-Sequenz der SEQ ID NO. 263 ermittelt werden.

Weiter bevorzugt sind amylolytische Proteine oder Derivate, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie aus einer *Streptomyces*-Spezies erhältlich sind. Denn am Beispiel einer Sammlung von mikrobiellen Isolaten der Ordnung Actinomycetales und mehrheitlich der Gattung *Streptomyces* konnten mehr als 200 α -Amylasen und deren natürliche Produzenten-Stämme gefunden und mit der vorliegenden Anmeldung zur Verfügung gestellt werden. Hierunter sind die Isolate oder Spezies *Streptomyces* sp. B327* und *Streptomyces* sp. B400B bevorzugt, die unter den Eingangsnummern DSM 13990 und DSM 13991 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt worden sind. Denn aus diesen konnten die beiden besonders bevorzugten Ausführungsformen erfindungsgemäßer Proteine erhalten werden, deren

DNA- und Aminosäuresequenzen im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 5 bis 8 angegeben sind.

Manche Actinomycetales können mehr als eine α -Amylase bilden. Hier kann es vorteilhaft sein, einen natürlichen Produzenten mehrerer α -Amylasen zu kultivieren, welche sich in ihren biochemischen Eigenschaften möglicherweise zu ergänzen vermögen. Dies kann beispielsweise für die Produktion eines Enzymcocktails mit einem breiten Wirkungsspektrum ausgenutzt werden. Solche Stämme kennzeichnen somit besonders vorteilhafte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

Die SEQ ID NO. 34 bis SEQ ID NO. 262 beschreiben die Aminosäuresequenzen, die, wie oben und in Beispiel 1 dargestellt ist, von bestimmten PCR-Produkten abgeleitet sind. Sie sind dadurch erhalten worden, daß die isolierten Nukleinsäuren aus einer Sammlung von mehreren hundert Actinomycetales-Isolaten als Matrizen in Polymerase-Kettenreaktionen mit den Primerpaaren GEX024 (SEQ ID NO. 9) / GEX026 (SEQ ID NO. 10) und GEX029 (SEQ ID NO. 11) / GEX031 (SEQ ID NO. 12) zur Reaktion gebracht worden sind. Die Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 liegen innerhalb der Primer GEX024 und GEX026, so daß sie als besonderes charakteristisch für die gefundenen Sequenzen angesehen werden können. Somit kennzeichnen auch die Nukleinsäuren, die für diese Bereiche codieren, entsprechend bevorzugte Ausführungsformen. Aus diesen einzelnen Sequenzen konnte die in Figur 3 und SEQ ID NO. 263 dargestellte Consensus-Sequenz abgeleitet werden; diese definiert einen Sequenzraum. Somit werden mit der vorliegenden Erfindung Amylasen zur Verfügung gestellt, die einen Teil enthalten, der weitgehend durch diese Consensus-Sequenz von beschrieben werden kann.

Aus folgenden Gründen müssen deshalb auch die zugehörigen Nukleinsäuren als Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe und damit als eigene Erfindungsgegenstände angesehen werden: Zum einen werden Proteine dann molekularbiologisch faßbar, wenn die zugehörigen Gene zur Verfügung stehen. Dies gilt für die Identifizierung und die Charakterisierung, über die Mutagenese, bis hin zu biotechnologischen Produktion. Es werden auch die aufgrund der zwischen den verschiedenen Organismen variierenden Codon-Usage abgeleiteten Nukleotidsequenzen, als auch Ribonukleinsäuren miteingeschlossen, denn auch von ihnen können funktionsfähige Enzyme abgeleitet werden. Entsprechende Nukleinsäuren können auch zur Gewinnung,

Identifizierung oder Untersuchung von Amylasegenen verwendet werden. So ist es beispielsweise möglich, entsprechende Sonden zum Genbank-Screen zu entwerfen.

Zum anderen beruht die oben angegebene und in den Beispielen detailliert ausgeführte Methode zum Auffinden der betreffenden α -Amylasen auf der PCR und damit auf den entsprechenden Nukleinsäuren. Nicht zuletzt werden im Sequenzprotokoll die Nukleotidsequenzen zweier besonders bevorzugter α -Amylasen (SEQ ID NO. 1, 3, 5 und 7) angegeben; die für die übrigen Sequenzen codierenden Nukleinsäuren können nach an sich bekannten Methoden erschlossen werden.

Beansprucht werden somit Nukleinsäuren, die für amylolytische Proteine codieren, deren Aminosäuresequenzen einen Teil enthalten, der mit der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 zu 98% und zunehmend bevorzugt zu 98,25%, zu 98,5%, zu 98,75%, zu 99%, zu 99,25%, zu 99,5%, zu 99,75% und besonders bevorzugt zu 100% beschrieben wird, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht.

Nukleinsäuren, die für die nach der Consensus-Sequenz möglichen Varianten codieren, können nach allgemein bekannten Methoden hergestellt werden. Beispielsweise in dem „Lexikon der Biochemie“, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999 werden in Band 1, S. 267-271 Methoden zur *De-novo*-Synthese von DNA und in Band 2, S. 227-229, die Polymerasekettenreaktion (PCR) vorgestellt. Die Sequenzen können nach dem allgemein bekannten Codierungssystem für Aminosäuren vorgegeben werden, gegebenenfalls in einer Codon-Usage, die für bestimmte Gattungen charakteristisch ist. Außerdem können die in SEQ ID NO. 1 und 3 angegebenen DNA-Sequenzen als Ausgangspunkte zur Synthese weiterer Nukleotidsequenzen dienen, indem in den Positionen dieser Sequenzen, die den gewünschten, erfindungsgemäßen Variationen entsprechen, die zugehörigen Punktmutationen eingeführt werden.

Hierzu können alle gängigen und zweckmäßigen Methoden eingesetzt werden, wie sie beispielsweise aus dem Handbuch Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, bekannt sind. Wie in Beispiel 5 gezeigt ist, kann auch eine PCR auch zum Einführen von einzelnen Basenaustauschen in DNA verwendet werden.

Eine alternative Möglichkeit besteht darin, über eine PCR, wie sie weiter oben und in den Beispielen beschrieben wird, an Nukleinsäuren aus Isolaten aus natürlichen Quellen oder aus bekannten Stämmen, neue Gene oder Genfragmente aufzufinden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz durch die Consensus-Sequenz der SEQ ID NO. 263 beschrieben wird.

Wie in den Beispielen anhand der α -Amylasen aus B327* und B400B dargestellt ist, können die zu den Teilsequenzen gehörenden vollständigen Gene beispielsweise durch Expressionsklonierung, Screening von Genbanken oder vergleichbare Verfahrensschritte gefunden werden. Dazu gehört beispielsweise die Klonierung von genomischer oder von cDNA in einen Expressionsvektor mit Deletions-mutanter α -Amylase. Für Zischenklonierungen sind Streptomyces- oder Bacillus-Spezies bevorzugt.

Auf der Nukleotidsequenz beruhen auch die im Stand der Technik unter dem Begriff Protein Engineering zusammengefaßten gentechnischen und Protein-biochemischen Methoden. Mit solchen können erfindungsgemäße Proteine in Hinblick auf verschiedene Verwendungen weiter optimiert werden, beispielsweise durch Punktmutagenese oder durch Fusion mit Sequenzen aus anderen Genen.

Bevorzugte Lösungen der erfindungsgemäßen Aufgabe sind Nukleinsäuren, die für amylytische Proteine codieren, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthalten, der mit einer der in SEQ ID NO. 34 bis SEQ ID NO. 262 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 98% und zunehmend bevorzugt zu 98,25%, zu 98,5%, zu 98,75%, zu 99%, zu 99,25%, zu 99,5%, zu 99,75% und besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

Denn diese α -Amylasen stellen die Basis für die Definition des oben angesprochenen Sequenzraum dar. Zum anderen verkörpern sie erfolgreich auf Amylase-Aktivität getestete Proteine, beziehungsweise Proteinfragmente. Außerdem sind, wie in Tabelle 1 zusammengestellt ist, bislang keine Proteine bekannt, die zu irgendeinem dieser Proteinfragmente eine Homologie von mehr als 97% Identität aufweisen.

Die für sie jeweils zu erschließende Nukleotidsequenz kann ohne weiteres in Arbeitsschritte zur Mutagenese, insbesondere zu Optimierung eingebracht werden oder

zum Screening nach den vollständigen Sequenzen eingesetzt werden. Dies ist in den Beispielen anhand der α -Amylasen aus B327* und B400B dargestellt ist. Ein entsprechendes positives Ergebnis ist auch für jedes andere der im Sequenzprotokoll und SEQ ID NO. 13 bis SEQ ID NO. 242 offenbarten Fragmente zu erwarten. Ein möglicherweise auftretendes einzelnes negatives Ergebnis, kann dabei auf stammspezifische Eigenheiten zurückzuführen sein. So ist es beispielsweise denkbar, daß es sich um ein durch Duplikation hervorgegangenes und anschließend durch Mutation inaktiviertes Gen handelt oder um eines, das aus bislang unbekannten Gründen in den lebenden Zellen nicht aktiviert wird.

Somit stellt auch jede zu den in SEQ ID NO. 13 bis SEQ ID NO. 242 offenbarten Fragmenten codierende Nukleinsäure eine alternative Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe dar. Zumindest zeichnet sie den Weg zu einer vollständigen α -Amylase vor und kennzeichnet sie in dem Bereich, der der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

Weiter bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind Nukleinsäuren, die für amylolytische Proteine codieren, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 45, 83, 97, 98, 101, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 116, 232, 234, 236, 238, 239 und 241 angegebenen Aminosäuresequenzen der mit einer dieser Sequenzen zu 98% und zunehmend bevorzugt zu 98,25%, zu 98,5%, zu 98,75%, zu 99%, zu 99,25%, zu 99,5%, zu 99,75% und besonders bevorzugt zu 100% identisch ist oder in jeder homologen Position unmittelbar auf eine dieser Sequenzen zurückgeführt werden kann, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

Denn in Beispiel 1 konnten die mit den beiden Primerpaaren GEX024/GEX026 und GEX029/GEX031 zu erhaltenden PCR-Produkte an DNA aus folgenden Isolaten, beziehungsweise von Stämmen von *Streptomyces* sp. erhalten werden: B101A, B114C, B134, B135A, B138A, B152A, B153(B), B156B, B157C, B158A, B160B, B161A, B373, B375, B380, B390, B392A und B394. Deren gelelektrophoretische Auftrennung ist in Figur 2 gezeigt. Durch deren Sequenzierung und Ableitung der zugehörigen Aminosäuresequenz wurden die genannten Aminosäuresequenzen erhalten.

Somit stellen alle Nukleinsäuren, die für Proteine codieren, die einen Teil aufweisen, der innerhalb des oben definierten Ähnlichkeitsbereichs liegen, Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands dar. Dies gilt, wie oben dargelegt, insbesondere für den Teilbereich, der für die Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

Weiter bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind Nukleinsäuren, die für amylytische Proteine codieren, deren Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 2, 4 und 208 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 95% und zunehmend bevorzugt zu 96%, zu 96,5%, zu 97%, zu 97,5%, zu 98%, zu 98,5%, zu 99%, zu 99,5% und besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht, ganz besonders bevorzugt eine Nukleinsäure mit einer in SEQ ID NO. 1 oder 3 angegebenen Nukleotidsequenz.

Denn die über diese Teilsequenzen erhaltenen vollständigen Proteine sind in Beispiel 6 auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht worden. Sie erscheinen damit als aussichtsreiche Kandidaten für den Einsatz in technischen Prozessen oder zur weiteren Optimierung in Hinblick auf technische Prozesse. Ähnliche Eigenschaften sind für die Proteine zu erwarten, die ausgehend von den Nukleinsäuren dieses Erfindungsgegenstands erhalten werden können.

Besonders bevorzugte Ausführungsformen sind solche Nukleinsäuren, die für ein amylytisches Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz in jeder einzelnen homologen Position auf eine der beiden Sequenzen SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 8 durch einen konservierten Aminosäure-Austausch, vorzugsweise unmittelbar zurückgeführt werden kann.

Denn wie oben bereits dargelegt worden ist, definieren diese beiden Aminosäuresequenzen einen Sequenzraum, in den die über konservierte Austausche oder unmittelbare Übernahme der in diesen beiden Sequenzen vorgegebenen Aminosäuren weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung fallen. Dementsprechend stellen auch die zugehörigen Nukleinsäuren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

Der Rückbezug auf die Aminosäuresequenz ist deshalb notwendig, weil unmittelbare Übernahme der einen oder anderen Nukleobase aus den beiden vorgegebenen Nukleotidsequenzen zu einer Abweichung in den Codons und damit zu nicht konservierten Austauschen auf Aminosäure-Ebene führen könnten. In den Schutzbereich fallen nur solche Nukleotidsequenzen, die für Proteine codieren, die demselben Sequenzraum angehören. Sie werden durch Übernahme der betreffenden Codons oder durch Austausch gegen solche Codons erhalten, die für dieselben Aminosäuren (synonyme Codons) oder konservierte Aminosäuren entsprechend der oben angegebenen Gruppen codieren.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind solche Nukleinsäuren, die zu dem α -Amylase-Gen aus *Streptomyces sp.* B327* hinreichend ähnlich sind. Denn für sie ist zu erwarten, daß sie für ebenso vielversprechende Enzyme wie die in Beispiel 6 charakterisierte α -Amylase codieren oder in Verfahren zu deren Optimierung eingebracht werden können.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß auf DNA-Ebene das zu diesem nächstähnliche Gen das unter der Zugangsnummer U51129 in Genbank eingetragene Gen für die α -Amylase aus dem *Streptomyces albus* ist. Dessen Homologie liegt bei 83,5% Identität für die vollständige in SEQ ID NO. 5 angegebene Sequenz und bei 84,8% Identität für den Teil, der für das mature Protein codiert.

Dieser Teil wird von den Nukleotiden 91 bis 1383 der in SEQ ID NO. 5 angegebenen Sequenz codiert. Den Aminosäuren der Consensus-Sequenz (Figur 3 und SEQ ID NO. 263) entsprechen die Nukleotide 628 bis 900.

Somit werden als bevorzugte Vertreter dieses Erfindungsgegenstands solche für amylytische Proteine codierenden Nukleinsäuren beansprucht, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 5 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 85% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 91 bis 1383, besonders bevorzugt in den Positionen 628 bis 900.

Zunehmend bevorzugt werden solche für amylytische Proteine codierenden Nukleinsäuren beansprucht, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 5 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 87,5%, zu 90%, zu 92,5%, zu 95%, zu 96%, zu 97%,

zu 98%, zu 99% und zu 100% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 91 bis 1383, besonders bevorzugt in den Positionen 628 bis 900.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind solche Nukleinsäuren, die zu dem α -Amylase-Gen aus *Streptomyces* sp. B400B hinreichend ähnlich sind. Denn für sie ist zu erwarten, daß sie für ebenso vielversprechende Enzyme wie die in Beispiel 6 charakterisierte α -Amylase codieren oder in Verfahren zu deren Optimierung eingebracht werden können.

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß auf DNA-Ebene das nächstähnliche Gen das für die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. (GenBank Acc.-No. U08602) ist. Die Homologie dieser beiden Sequenzen liegt bei 81,9% Identität über die Sequenz, die für das native Protein codiert, und bei 82,6% für die für das mature Protein.

Der mature Teil wird von den Nukleotiden 88 bis 1374 der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Sequenz codiert. Den Aminosäuren der Consensus-Sequenz (Figur 3 und SEQ ID NO. 263) entsprechen die Nukleotide 598 bis 888.

Somit werden als bevorzugte Vertreter dieses Erfindungsgegenstands solche für amylytische Proteine codierenden Nukleinsäuren beansprucht, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 85% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 88 bis 1374, besonders bevorzugt in den Positionen 598 bis 888.

Zunehmend bevorzugt werden solche für amylytische Proteine codierenden Nukleinsäuren beansprucht, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 85%, zu 87,5%, zu 90%, zu 91%, zu 92%, zu 93%, zu 94%, zu 95%, zu 96%, zu 97%, zu 98%, zu 99% und zu 100% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 88 bis 1374, besonders bevorzugt in den Positionen 598 bis 888.

Entsprechend bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands stellen die Nukleinsäuren dar, die für eines der oben bezeichneten amylytischen Proteine oder Fragmente codieren.

Dies schließt auch jene Varianten ein, die nicht über ihre ganze Sequenzlänge hinweg in den oben definierten Ähnlichkeitsbereich fallen, dies aber in einzelnen Bereichen tun. Dazu gehören beispielsweise die Nukleotidsequenzen, die, wie oben ausgeführt, durch Insertions- oder Deletionsmutation erhalten worden sind, chimäre Proteine oder Proteinfragmente. Aber auch sogenannte Antisense-Konstrukte, beispielsweise über einzelne Teilabschnitte, stellen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, weil sie Sequenzinformationen über amyolytische Proteine realisieren und zur Regulation der amyolytischen Aktivität eingesetzt werden können.

Zu den über an sich bekannte molekularbiologische Methoden erhältlichen Mutanten gehören insbesondere solche mit einzelnen gezielten Basenaustauschen oder randomisierten Punktmutationen, Deletionen von einzelnen Basen oder von Teilsequenzen, Fusionen mit anderen Genen oder Genfragmenten oder anderen Enzymen, Insertionen, Shuffling-Mutagenese oder Inversionen. Derartige Mutationen oder Modifikationen können bevorzugte Ausführungsformen für spezifische Anwendungen darstellen.

Solch eine Mutagenese kann zielgerichtet oder über zufallsgemäße Methoden durchgeführt werden. Dies kann beispielsweise mit einem anschließenden auf die Aktivität gerichteten Erkennungs- und/oder Auswahlverfahren (Screening und Selektion) an den klonierten Genen kombiniert werden. Die durch Mutation erhaltenen Gene unterliegen dem Schutzbereich der hier beschriebenen Erfindung, wenn sie für im weitesten Sinne amyolytische Proteine codieren und in dem oben definierten Ähnlichkeitsbereich liegen; letzteres insbesondere in homologen und funktionsrelevanten Bereichen.

Wie aus den bisherigen Ausführungen und Beispiel 1 ersichtlich ist, können mit den angegebenen Methoden zahlreiche Organismen dadurch charakterisiert werden, daß sie amyolytische Proteine bilden, die Teile enthalten, die durch die Consensus-Sequenz von Figur 3 oder SEQ ID NO. 263 beschrieben werden.

Somit stellen alle natürlichen Organismen, die für eines der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 263 bezeichneten Proteine oder Proteinfragmente codierende Nukleinsäuren enthalten, einen eigenen Erfindungsgegenstand dar. Sie können nach an sich bekannten Methoden, insbesondere den mit dieser Anmeldung zur Verfügung

gestellten, aus natürlichen Habitaten isoliert und kultiviert werden. Sie sind über jede mikrobiologische Charakterisierung hinaus dadurch identifizierbar, daß sich anhand ihrer genomischen DNA mit einem der in Beispiel 1 genannten PCR-Primer, insbesondere mit dem Paar GEX024/GEX026 Amplifizierungsprodukte erhalten lassen, deren abgeleitete Aminosäuresequenz mit der Consensus-Sequenz von Figur 3 oder SEQ ID NO. 263 beschreibbar ist.

Vorzugsweise handelt es sich um solche natürlichen Organismen, aus denen sich auf diese Weise eine Aminosäuresequenz ableiten läßt, die mit einer der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 34 bis 262 angegebenen Sequenzen identisch ist und besonders bevorzugt mit einer der unter SEQ ID NO. 2, 4, 6 oder 8 angegebenen Sequenzen.

Dies gilt für alle Organismen, beispielsweise eukaryontische Zellen etwa aus Zellkulturen oder überwiegend einzellige Pilze wie Hefen.

Dies gilt bevorzugt für Mikroorganismen, vorzugsweise für Bakterien, ganz besonders bevorzugt für gram-positive Bakterien.

Unter den gram-positiven Bakterien sind jene der Ordnung Actinomycetales, insbesondere der Gattung *Streptomyces* bevorzugt.

Von diesen, wiederum, sind die beiden Spezies *Streptomyces* sp. B327* und *Streptomyces* sp. B400B bevorzugt, insbesondere wenn es sich um einen der beiden Stämme DSM 13990 oder DSM 13991 handelt.

Wie oben und in den Beispielen dargelegt ist, konnte die Vielzahl erfindungsgemäßer α -Amylasen über ein speziell entwickeltes Verfahren bereitgestellt werden. Dieses bildet deshalb einen eigenen Erfindungsgegenstand.

Beansprucht werden somit PCR-basierte Verfahren zur Identifizierung und/oder Gewinnung neuer Amylasen aus einer Sammlung von Organismen oder Nukleinsäuren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß PCR-Primer verwendet werden, die jeweils eine variable 3'-Region aufweisen und eine 5'-Region mit hoher Homologie zu Bereichen aus bekannten Amylasen.

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist im Stand der Technik etabliert; sie wird beispielsweise in „Lexikon der Biochemie“, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Band 2, S. 227-229 beschrieben. Sie beruht darauf, daß im ersten Schritt eine doppelsträngige DNA-Matrize bei erhöhter Temperatur aufgeschmolzen wird, (2.) bei niedriger Temperatur kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, sogenannte Primer oder Primer-Oligonukleotide, an für die Hybridisierung hinreichend homologe Positionen der aufgeschmolzenen DNA binden und (3.) diese bei mittlerer Temperatur wie bei der natürlichen DNA-Synthese vom 5'- zum 3'-Ende verlängert werden. Dadurch entstehen im ersten Durchgang zwei Kopien des DNA-Bereichs, der in der anfänglich aufgeschmolzenen DNA zwischen den beiden Primer-Bindungsstellen liegt. Bei (4.) zyklischer Reaktionsführung, wie sie beispielsweise unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase möglich ist, erhält man mit zunehmender Zyklenzahl eine exponentiell steigende Anzahl an identischen DNA-Molekülen über den von den beiden Primer-Sequenzen flankierten DNA-Bereich.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist durch neuartige Primer für die PCR gekennzeichnet. Diese zeichnen sich durch einen variablen 3'-Abschnitt und einen 5'-Bereich mit hoher Homologie zu DNA- und/oder Aminosäure-Bereichen aus bekannten Amylasen aus. Vorzugsweise handelt es sich bei den 5'-Bereichen der Primer um Bereiche, die sich aus einem Sequenzvergleich auf Proteinebene, vorzugsweise auf DNA-Ebene mit verschiedenen homologisierbaren Amylasen als konservierte Regionen herausgestellt haben und die neben variablen Bereichen der betreffenden, homologisierten Gene oder Proteine liegen. Solch eine Zuordnung wird beispielsweise in Figur 1 dargestellt.

Die Grenze zwischen den so definierten 3'- und 5'-Bereichen der Primer ist identisch mit der über die Homologisierung gefundenen Grenze zwischen der konservierten und der variablen Region der Amylasen. Im Zweifel beginnt der variable Bereich dort, wo über die Synthese (siehe unten) eine Varianz erzeugt worden ist.

Hohe Homologie bedeutet in diesem Zusammenhang, daß diese Primer in ihrem 5'-Bereich (a) 100 % Identität zu den betrachteten Regionen aus bekannten Enzymen oder Consensus-Sequenzen aufweisen oder (b) im Falle geringerer Identität als 100 % immer noch ein ausreichendes Maß an Übereinstimmungen in einzelnen Positionen, um mit

einer ebenfalls homologisierbaren Matrizen-DNA in dem durch Sequenzvergleich nahegelegten Bereich innerhalb der Hybridisierungsphase eines PCR-Zyklus zu hybridisieren und im weiteren Fortgang der PCR eine DNA-Synthesereaktion zu ermöglichen.

Variable oder degenerierte PCR-Primer weisen an definierten Positionen nicht jeweils ein bestimmtes Nukleotid auf, sondern in statistischer Mischung eine Auswahl aus zwei, drei oder vier verschiedenen Nukleotiden, so daß nicht die Gesamtlänge, aber die Identität der Primer variiert wird. Mit der Zahl der variablen Einzelpositionen nimmt das Maß an Variabilität des erhaltenen Primer-Pools exponentiell zu. Diese Variationen können bei der Synthese der Primer, insbesondere der chemischen Synthese, nach an sich bekannten Methoden eingeführt werden. Erforderlich ist hierfür, zu dem Zeitpunkt, an dem das Nukleotid für eine bestimmte Position eingebaut wird, dieses Reagenz nicht als reines Nukleotid sondern als Nukleotidgemisch einzusetzen. Man erhält auf diese Weise eine Schar von Primern mit identischen 5'-Bereichen, die in zahlreiche Unterpopulationen mit allen statistisch möglichen Nukleotiden in den jeweiligen variablen Bereichen zerfallen.

Diese neuartigen Primer ergeben bei Vorliegen von Gensequenzen amylolytischer Proteine eine Produktbande, die diesen Proteinen entspricht. Über sie wird der dazwischen liegende variable Bereich faßbar gemacht. Sie werden deshalb auch als Sequenzanker bezeichnet.

Als Matrize für erfindungsgemäße PCR können beliebige DNA-Präparationen eingesetzt werden. Aufgrund des vergleichsweise geringen Aufwands, den eine einzelne Probe bereitet, können mehrere Ansätze parallel angesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich also besonders für das Durchsuchen einer Sammlung von Nukleinsäuren, die aus einer Vielzahl von Organismen nach an sich bekannten Methoden hergestellt worden sind. Bei den Matrizen kann es sich auch um cDNA- oder sogar um mRNA-Präparationen handeln, wenn die PCR entsprechend ausgestaltet wird, wie dies im Stand der Technik hinlänglich beschrieben ist.

In einer Variation der Reaktionsführung werden die degenerierten Primer nur den ersten Reaktionszyklen zuzugeben und/oder nach den ersten Zyklen die Primer zugesetzt, die den konstanten Bereichen der erfindungswesentlichen Primer entsprechen. Eine dritte

Möglichkeit besteht darin, zwei eigenständige PCR durchzuführen. Auf diese Weise werden in den ersten Zyklen mit den deegenerierten Primern die relevanten genetischen Elemente aus der Matritze angereichert und in den nachfolgenden Zyklen gezielt amplifiziert.

Die Auswahl dieser Möglichkeiten oder weiterer Abwandlungen, insbesondere in der Reaktionsführung der PCR, hängt beispielsweise davon ab, wie selektiv die Primer binden oder wie häufig die als Matrize eingesetzte DNA das auf diese Weise amplifizierbare genetische Element beinhaltet. Die Selektivität der PCR kann über die Reaktionsbedingungen in an sich bekannter Weise reguliert werden kann. Bei niedrigen Temperaturen, beispielsweise, hybridisieren die Primer mit DNA-Bereichen, die nicht identisch und/oder nur wenig homolog sind; bei höheren Temperaturen nimmt die Selektivität zu. Auf diese Weise können α -Amylase-Sequenzen erschlossen werden, die mit den zuvor bekannten Amylase-Genen auch in den hochhomologen Bereichen nicht vollständig übereinstimmen. Andererseits darf die Primerbindung nicht so unspezifisch sein, daß der Anteil an Genen, die nicht für Amylasen codieren nicht gegenüber dem erwünschten Produkt überhand nimmt. Das Optimum muß durch Variation der Reaktionsbedingungen im Einzelfall ermittelt werden.

Die Vielzahl der Variationsmöglichkeiten ermöglicht eine Anpassung an viele verschiedene Fragestellungen, beispielsweise an unterschiedliche Ausgangs-DNA-Sammlungen. Sie machen die erfindungsgsmethode zu einem sehr flexiblen Instrument zum Auffinden neuer Amylase-Sequenzen.

Diese Optimierung geschieht vor dem Hintergrund, daß bei Untersuchung von DNA-Sequenzen aus Sammlungen von verwandten Nukleinsäuren vorteilhafterweise eine Schar von α -Amylase-Sequenzen erhalten werden soll, die ihrerseits zwar divers sind, zueinander ein gewisses Maß an Homologie aber auch nicht unterschreiten (siehe oben). Denn dann können sie zur Definition eines Sequenzraums herangezogen und für statistische Mutagenese-Verfahren wie etwa das Shuffling eingesetzt werden.

Auf diese Weise haben sich in Beispiel 1 für eine Sammlung von DNA aus Actinomycetales die Primer-Kombinationen GEX029/GEX031 und insbesondere GEX024/GEX026 als optimal herausgestellt.

Die erhaltenen PCR-Produkte werden für die Suche nach vollständigen Amylase-Sequenzen eingesetzt. Diese PCR stellt somit einen Screening-Schritt dar, über welchen aus einer Genbank oder Sammlung von isolierten Nukleinsäuren bestimmte Gene oder Genfragmente identifiziert werden. Die erhaltenen PCR-Fragmente oder zugehörigen Gene stellen einschließlich aller ihrer Abweichungen in einzelnen Positionen einen Sequenzraum dar. Sie sind auch auf diese Weise typisiert; denn sie können über diese gemeinsame Sequenz als Vertreter eines bestimmten Enzymtyps angesehen werden.

Durch dieses Screening wird die globale Diversität auf den Sequenzraum jener Gene reduziert, die für bestimmte Enzyme mit amylolytischer Aktivität codieren. Dieser Sequenzraum ist dann besonders interessant, wenn er in sich eine möglichst große Sequenzvariabilität an Genen für solche Enzyme aufweist.

Ein bevorzugtes, bereits bei der Primerkonstruktion zu berücksichtigendes Ziel kann es sein, einen Varianzraum für bestimmte Enzymbereiche, wie beispielsweise bestimmte enzymatisch interessante Domänen zu gewinnen. Das sind meistens Domänen, die gewisse Teilaktivitäten wie beispielsweise Strukturelemente oder enzymatisch aktive Aminosäuren bereitstellen. Die einen solchen Sequenzraum bildenden Fragmente können mit bekannten anderen Enzymen oder Enzymfragmenten fusioniert werden. Ebenso können sie in evolutive Techniken zur Entwicklung neuer Enzyme eingebracht werden. Solche evolutiven Techniken zur statistischen Rekombination verschiedener Fragmente werden beispielsweise in den Patentanmeldungen WO 98/05764, WO 97/35966, EP 590689 oder EP 229046 dargestellt. Solch ein Verfahren, welches auf der PCR beruht, stellt beispielsweise die in WO 98/42832 beschriebene StEP-Methode dar.

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit der PCR-Produkte ist das Screening von Genbanken, das mit den durch die PCR erhaltenen DNA-Fragmenten oder Teilen davon als Sonde erfolgt. Im Stand der Technik sind hierfür insbesondere Hybridisierungsverfahren etabliert, nach denen je nach Stringenz der Hybridisierungen hoch- oder niedrig-homologe Sequenzen detektiert werden können. Auf diese Weise können ähnliche Sequenzen für amylolytische Proteine identifiziert werden.

Das PCR-Fragment und die damit gewonnene Sequenzinformation selbst kann auch als Ausgangspunkt für weitere PCR- und/oder Sequenz-basierte Verfahren zur

Identifizierung, Isolierung oder Klonierung des gesamten Gens dienen. Hierfür sind beispielsweise inverse PCR, A-PCR (anchored PCR) oder Primer-walking im Stand der Technik beschrieben. Die so erhaltenen vollständigen Gene werden abschließend in einem Aktivitätstest, etwa nach Klonierung in einen Expressionsvektor auf ihre stärkespaltende Aktivität untersucht.

All diese Verfahren können in sinnvoller Weise mit einem anschließenden Test auf amylytische Aktivität an den über eventuelle Zwischenschritte erhaltenen Genen, beziehungsweise Proteinen verknüpft werden. Diese Variationen kennzeichnen bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands.

In einer Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands werden die erhaltenen Gene oder Genfragmente sequenziert.

Diese Sequenzierung kann Aufschluß über die Identität der erhaltenen Fragmente geben. Denn wie erwähnt ist das Verfahren von der Selektivität der PCR-Bedingungen abhängig. So können bei niedrig selektiven Bedingungen positive Ergebnisse durch PCR-Produkte vorgetäuscht werden, die aufgrund unspezifischer Primer-Bindung gebildet worden sind. Die optionale Sequenzierung der Produkte verhindert also überflüssige Arbeiten. Für große PCR-Produkte kann zur Sequenzierung das Primer-Walking angewendet werden, etwa so, wie dies in Beispiel 4 für die vollständigen Gene durchgeführt worden ist.

Zum anderen können wie in den Beispielen 1 bis 3 gezeigt ist, bereits über die PCR-Produkte, die von einem Teil des Gens abgeleitet sind, Homologisierung, Datenbankrecherchen und die Definition eines Sequenzraums erfolgen. Die Bildung eines bestimmten PCR-Produkts kann einzelne Stämme oder größere Gruppen wie Spezies oder Gattungen kennzeichnen und ein taxonomisches Zuordnungsmerkmal darstellen. Dies ist bei der Kultivierung der Stämme ein wertvolles Hilfsmittel.

Eine Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß von den erhaltenen Genen oder Genfragmenten Peptide abgeleitet werden, die über ein immunchemisches Verfahren auf ein Epitop von einer bekannten Amylase getestet werden.

Hierfür eignen sich beispielsweise auch die Produkte der erfindungsgemäßen PCR. So kann das Screening beispielsweise mithilfe von Antikörpern erfolgen, die nach an sich bekannten Methoden aufgrund der abgeleiteten Peptide synthetisiert worden sind. Für besonders bevorzugte Ausführungsformen stehen die mit der vorliegenden Anmeldung offenbarten amylytischen Proteine und Derivate zur Verfügung.

Alternativ oder ergänzend zur Sequenzierung oder einem immunchemischen Verfahren können α -Amylasen auch aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität identifiziert werden.

Somit sind solche Verfahren bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß von den erhaltenen Genen oder Genfragmenten Peptide abgeleitet werden, die auf einen Beitrag zu einer amylytischen Aktivität, vorzugsweise auf vollständig von diesen Peptiden ausgeübte amylytische Aktivität getestet werden. Hierfür kann das PCR-Produkt oder das über einen Genbankscreen erhaltene vollständige Gen etwa wie in Beispiel 5 durch Klonierung zur Expression gebracht werden.

Insbesondere lange PCR-Fragmente, wie sie sich insbesondere durch die Wahl entsprechender Primer ergeben, können im Zuge der Expressionsklonierung direkt in Expressionsvektoren kloniert werden, ohne entsprechend andere Teilsequenzen in dem Vektor vorzuhalten. Anschließend werden die erhaltenen Klone auf Stärke-Hydrolyse-Aktivität getestet, beispielsweise durch Ausplattieren auf stärkehaltigen Agarplatten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die 3'-Region mindestens eines Primers hochvariabel oder hochdegeneriert und/oder die 5'-Region mindestens eines Primers zu einem Bereich aus bekannten Amylasen hochhomolog.

Unter hochvariablen Primern sind beispielsweise 8fach, 16fach, 64fach, 96fach, 128fach oder noch höher degenerierte Primer zu verstehen oder Primer mit dazwischen liegenden Werten an Variabilität. Als hochhomolog werden die Primer dann angesehen, wenn in den konstanten 5'-Regionen Abweichungen von höchstens zwei Nukleobasen, bevorzugt höchstens einer Nukleobase gegenüber der zur Konstruktion herangezogenen Consensus-Sequenz auftauchen, und besonders bevorzugt wenn völlige Übereinstimmung besteht.

Die anhand der Figur 1 abgeleiteten Primer sind in Beispiel 1 in Tabelle 3 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 9 bis 33 zusammengestellt. Die variablen Positionen sind dort jeweils mit den allgemein üblichen, beispielsweise im WIPO-Standard ST.25 vermerkten Einbuchstaben-Codes angegeben. So weist beispielsweise der Primer GEX024 (SEQ ID NO. 9) in zwei Positionen die Abkürzungen "s", beziehungsweise "r" auf, was jeweils alternativ g oder c (bei s), beziehungsweise g oder a (bei r) bedeuten kann. Er verfügt somit über eine 4fache Degeneration. In entsprechender Weise kann nachvollzogen werden, daß beispielsweise der Primer GEX026 (SEQ ID NO. 10) ebenfalls 4fach, der Primer GEX029 (SEQ ID NO. 11) 96fach und der Primer GEX031 (SEQ ID NO. 12) 8fach degeneriert ist.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren beruht auf der Tatsache, daß zwischen mehreren Amylasen konservierte Bereiche identifiziert werden können, die für die Konstruktion der konstanten Bereiche der erfindungsgemäßen Primer ausgenutzt werden können. Dadurch werden sie zu Sequenzankern. In Beispiel 1 sind entsprechende Primer aufgeführt; deren Lage gegenüber bestimmten konservierten Regionen ist in Figur 1 gezeigt.

Dementsprechend sind solche erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die 5'-Region mindestens eines PCR-Primers aus einem Sequenzbereich abgeleitet ist, der einer konservierten Amylasedomäne entspricht, vorzugsweise eines Bereichs, der den Aminosäurepositionen (A) 58-91, (B) 94-141, (C) 155-207, (D) 295-345 oder (E) 392-427 der α -Amylase aus *Streptomyces griseus*, besonders bevorzugt einer der Domänen β 4 oder β 7 der $(\alpha\beta)_8$ -Barrelstruktur entspricht.

Letztere konnten in Beispiel 1 an DNA aus Actinomycetales erfolgreich eingesetzt werden.

Die mit der vorliegenden Anmeldung zur Verfügung gestellten, im Sequenzprotokoll aufgeführten Aminosäuresequenzen können zur Synthese entsprechender Primer herangezogen werden. Dies gilt beispielsweise auch für Bereiche, die nicht in den konservierten Regionen liegen, aber in Unterpopulationen, beispielsweise einzelnen Vertretern der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 als gemeinsame Teilsequenzen hervorgehen.

Bevorzugt sind somit Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß ein, vorzugsweise zwei PCR-Primer eingesetzt werden, die sich aus einer der Aminosäuresequenzen eines Proteins oder Fragments des ersten Erfindungsgegenstands ableiten lassen.

Demgegenüber sind solche Verfahren bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß ein, vorzugsweise zwei PCR-Primer eingesetzt werden, die sich aus einer der Nukleotidsequenzen gemäß dem zweiten Erfindungsgegenstand unmittelbar ergeben. Denn diese weisen bereits eine Nukleotidsequenz auf. Sie sollte aufgrund der Codon-Usage insbesondere für die Amplifizierung von Sequenzen aus Actinomycetales oder anderen gram-positiven Bakterien geeignet sein.

Hierunter sind Verfahren bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß mindestens ein Primer eine der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 9 bis 33, insbesondere eine der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 9 bis 12 angegebenen Sequenzen enthält.

Hierunter sind wiederum die Verfahren bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Primer in der Kombination SEQ ID NO. 9 mit SEQ ID NO. 10 oder SEQ ID NO. 11 mit SEQ ID NO. 12 eingesetzt werden. Denn diese konnten, wie in Beispiel 1 gezeigt ist, erfolgreich für die Gewinnung einer Vielzahl von α -Amylasen eingesetzt werden.

Erfindungsgemäße Verfahren sind an einzelnen Proben durchführbar. Demgegenüber sind jedoch Verfahren bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich bei der eingesetzten Matrizen-DNA um isolierte Nukleinsäuren von mehreren Proben handelt. Hierfür sind alle biologisch sinnvollen Sammlungen denkbar. Dazu gehören beispielsweise Sammlungen von Organismen, Zellkulturen, Isolaten oder kultivierten Einzelstämmen, oder um isolierte Nukleinsäuren von einer Summe von Organismen, Zellkulturen, Isolaten, kultivierten Einzelstämmen oder isolierten Nukleinsäuren.

Isolierte Nukleinsäure können beispielsweise unter Umgehung eines Vereinzelungsschrittes aus Proben, beispielsweise Freilandisolaten, aufgereinigt werden. Auf diese Weise kann eine sehr große Bandbreite verschiedener biologischer Quellen einem erfindungsgemäßen Screening unterworfen werden.

Alternativ zur Gewinnung von Freilandisolaten ist es auch möglich, verschiedene Stämme aus den allgemein zugänglichen. Es kann sich auch um Sammlungen von

gentechnisch veränderten Organismen, vorzugsweise Mikroorganismen handeln. Es ist auch möglich, verschiedene Stämme aus Kultursammlungen (DSMZ, ATCC, CBS) mit dieser Methode zu untersuchen.

Auch auf Zellkulturen, wie sie beispielsweise von Eukaryonten, insbesondere vom Menschen angelegt werden, kann die erfindungsgemäße Methode angewendet werden. Dies ist beispielsweise dann sinnvoll, wenn die zu erhaltenden Enzyme aufgrund einer bestimmten physiologischen Wirkung eingesetzt werden oder besonders gut verträglich sein sollen. Letzteres gilt insbesondere für kosmetische Anwendungen.

Vorzugsweise handelt es sich bei solchen Sammlungen um solche von überwiegend einzelligen Mikroorganismen wie Pilzen, Hefen, Bakterien oder Cyanobakterien. Bevorzugt sind Bakterien, weil diese den im Stand der Technik etablierten mikrobiologischen und gentechnischen Methoden am leichtesten zugänglich sind. Besonders bevorzugt sind darunter solche von gram-positiven Bakterien, weil diese aufgrund ihrer Fähigkeit, neusynthetisierte Proteine in das umgebende Medium auszuschleusen, technischen Anwendungen am nächsten kommen.

Entsprechend der oben gemachten Ausführungen und der Beispiele zur vorliegenden Anmeldung sind folgende Verfahren zunehmend bevorzugt:

Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich bei der eingesetzten Matrizen-DNA um isolierte Nukleinsäuren von Mikroorganismen, vorzugsweise von Bakterien und besonders bevorzugt von gram-positiven Bakterien handelt; solche, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich um Mitglieder der Ordnung Actinomycetales, insbesondere um solche der Gattung *Streptomyces* handelt und solche, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich bei den Mitgliedern der Gattung *Streptomyces* um *Streptomyces* sp. 327* oder *Streptomyces* sp. B400B, insbesondere um einen der beiden Stämme DSM 13990 und DSM 13991 handelt.

Bevorzugte Verfahren sind dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltenen Gene oder Genfragmente in eine Expressionsgenbank eingebracht werden, die anschließend auf amylolytische Proteine oder Fragmente amylolytischer Proteine getestet wird. Solch ein Test geschieht vorzugsweise durch Hybridisierung von Nukleinsäuren, durch ein

immunchemisches Verfahren oder über einen Aktivitätstest. In Beispiel 4 wird eine solche Expressionsklonierung beschrieben.

Die Hybridisierung geschieht auf bekannte, beispielsweise in dem Handbuch von Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989 beschriebene Weise, indem eine Nukleinsäure einer bekannten Amylase als Sonde dazu verwendet wird, um aus der Genbank die zu ihr weitgehend komplementären Sequenzen zu identifizieren. Der gewünschte Grad der Übereinstimmung kann hierbei über die Wahl der Reaktionsbedingungen, das heißt der Stringenz gesteuert werden. Identifizierte, erfindungsgemäße Sequenzen können über ihre Homologie zu bekannten Amylasen erkannt werden; als positive Kontrolle dient ein Aktivitätstest.

Banken, die bereits für die Expression der enthaltenen Gene sorgen, werden anhand der Genprodukte getestet. Hierfür eignen sich Antikörper gegen bekannte α -Amylasen, wobei die gefundenen Produkte ebenfalls auf ihre amylytische Aktivität überprüft werden müssen. Auch diese Methoden sind im Stand der Technik etabliert. Alternativ können die vereinzelt Zellen von Expressionsbanken direkt auf ihre Aktivität getestet werden, indem sie, wie in den Beispielen angegeben, auf stärkehaltige Agarplatten aufgebracht werden. Positive Klone sind dann an ihren Lysehöfen zu erkennen.

Verfahren einer Ausführungsform sind dadurch gekennzeichnet, daß die isolierte DNA in einen Expressionsvektor eingebracht wird, welcher Transkriptions- und Translationskontrollelemente und optional ein oder mehrere Fragmente eines Amylase-Gens bereitstellt, so daß sich im positiven Falle insgesamt eine Amylase-Aktivität ergibt.

Hierfür eignen sich insbesondere solche Vektoren, in die ein erhaltenes Fragment so hineinrekombiniert wird, daß vollständige Enzyme erhalten werden. Dies ist durch Expressionsvektoren realisierbar, die ein so deletiertes Gen enthalten, daß mit der Klonierung des Fragments eben diese Deletion aufgehoben wird. Diese Ausführungsform eignet sich besonders für PCR-Fragmente, die zu kurz sind, um für eine detektierbare amylytische Aktivität zu codieren.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, dessen auf die erfindungsgemäße PCR zum Screening isolierter Nukleinsäuren folgender, aus drei Schritten bestehender Aktivitätstest folgt:

- (a) Durchmustern einer Genbank, vorzugsweise einer mit vollständigen Genen, mithilfe des erhaltenen PCR-Fragments oder einer hiervon abgeleiteten Sonde,
- (b) Expression der auf diese Weise identifizierten Gene oder Genfragmente und
- (c) Messung des Beitrags zu einer amylolytischen Aktivität der durch diese Expression erhaltenen Proteine oder Proteinfragmente.

Dabei kann es sich geeigneterweise um eine genomische oder um eine cDNA-Bank handeln. Es ist möglich, an derselben Bank die erfindungsgemäße PCR und den Aktivitätstest durchzuführen.

Mit dem Begriff Durchmustern ist ein im Stand der Technik etabliertes Screening gemeint, insbesondere das oben erwähnte Testen der Banken über Hybridisierung mit Nukleinsäuren. In diesem Falle werden keine Teilsequenzen von bekannten Amylasen eingesetzt sondern die durch die erfindungsgemäße PCR erhaltenen Teilsequenzen. Das Screening der Genbanken dient nunmehr dazu, Klone zu identifizieren, die das zugehörige vollständige Amylase-Gen enthalten.

Alternative, aus dem Stand der Technik bekannte Methoden bestehen darin, das erhaltene PCR-Fragment als Ausgangspunkt für eine inverse PCR oder eine anchored PCR (a-PCR) oder eine Sequenzierung durch „Primer-Walking“ zu verwenden.

Bevorzugt sind solche Verfahren, bei denen die nach der PCR erhaltenen Nukleinsäuren oder die vollständigen Gene vor dem Aktivitätstest in Klonierungsvektoren eingebracht und in Wirtszellen transformiert werden. Sie sind somit leichter der oben erwähnten Sequenzierung und/oder weiteren Klonierungsschritten, einschließlich der Klonierung in Expressionsvektoren zugänglich.

Bei den hierfür einzusetzenden Wirtszellen handelt es sich vorzugsweise um Stämme der Gattungen *Escherichia coli*, *Streptomyces* oder *Bacillus*.

Erfindungsgemäße Verfahren werden nicht nur in Hinblick auf einzelne Sequenzen durchgeführt, sondern auch, um eine Vielzahl von Sequenzen zu erhalten, die

homologisierbar sind und über die ein Sequenzraum definiert werden kann. Dieser bezieht sich wiederum auf die jeweiligen Aminosäuresequenzen. Denn es ist das Ziel des erfindungsgemäßen Verfahrens, entsprechend unterschiedliche Proteine zu identifizieren. Es müssen also jeweils die von den PCR-Produkten ableitbaren Aminosäuresequenzen betrachtet werden.

Entsprechend bevorzugt sind deshalb Verfahren, die an so vielen verschiedenen PCR-Matrizen durchgeführt oder wiederholt werden, daß mindestens zwei verschiedene Aminosäure-Sequenzen mit einer gemeinsamen Consensus-Sequenz erhalten werden, insbesondere über einzelne Domänen, Teilaktivitäten, Strukturelemente oder vollständige Gene und/oder Proteine.

Ziel dieser Arbeiten ist die Erstellung eines Sequenzraums, dessen einzelne Vertreter ein Verhältnis an Homologie und Varianz aufweisen, daß er in statistische Methoden zur Mutagenese und Enzymentwicklung, beispielsweise Shuffling-Mutagenese eingebracht werden kann.

Entsprechend bevorzugt sind deshalb Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß eine Consensus-Sequenz mit Sequenzidentitäten mindestens zweier enthaltener Sequenzen von mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 40%, besonders bevorzugt mindestens 50% erhalten wird.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt es dar, wenn die mit der vorliegenden Anmeldung zur Verfügung gestellten Proteine oder Nukleinsäuren zur Auffindung weiterer α -Amylasen verwendet werden können.

Somit wird die Verwendung eines Proteins oder Derivats nach dem ersten Erfindungsgegenstand zur Identifizierung eines amylytischen Proteins beansprucht, vorzugsweise in einem Verfahren nach dem vierten Erfindungsgegenstand.

Sie können beispielsweise zur Ableitung entsprechender Primer für erfindungsgemäße Verfahren herangezogen werden. Sie können aber auch für die oben genannten Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern für das immunchemische Screening einer Expressionsbank eingesetzt werden.

Auch Nukleinsäuren nach dem zweiten Erfindungsgegenstand können zur Identifizierung und/oder Gewinnung einer neuen Amylase verwendet werden, vorzugsweise in einem Verfahren nach dem vierten Erfindungsgegenstand.

Sie können beispielsweise als Vorlage für die Entwicklung von Primern für eine erfindungsgemäße PCR dienen oder als Deletionsmutante in Expressionsvektoren bereitgehalten werden, so daß durch Klonierung in diesen Vektor eine Komplementation bei der Expression erreicht wird.

Eine Verwendungsmöglichkeit für Proteine, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten worden sind, ergibt sich durch die Fusion oder Verknüpfung mit einem anderen Protein, insbesondere zur Entwicklung eines neuen Enzyms. Auf diese Weise können durch chemische Kopplung beispielsweise mehrfachfunktionelle Enzyme hergestellt werden.

Eine Verwendungsmöglichkeit für Nukleinsäuren, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten worden sind, ergibt sich durch ihre Verwendung zur Fusion mit einer anderen Nukleinsäure, insbesondere zur Entwicklung eines neuen Enzyms. Dies kann über gezielte Fusion bestimmter Sequenzen oder über ein statistisches Rekombinationsverfahren erfolgen.

Bevorzugte Ausführungsformen stellen derartige Verwendungen zur gezielten Fusion, unter Ausnutzung hochhomologer Bereiche der Aminosäuresequenzen, gemeinsamer Restriktionsschnittstellen der Nukleinsäuren oder über PCR-basierte Fusion dar.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung in einem statistischen Rekombinationsverfahren, insbesondere unter Ausnutzung hochhomologer Bereiche der Aminosäuresequenzen, gemeinsamer Restriktionsschnittstellen der Nukleinsäuren oder über PCR-basierte Fusion.

Die hochhomologen Bereiche der Aminosäuresequenzen, die zumeist konservierte, funktionstragende Bereiche darstellen, können dabei als Anker für PCR-Primer, gegebenenfalls von degenerierten Primern dienen. Gemeinsame Restriktionsschnittstellen der Nukleinsäuren zweier verschiedener Gene ermöglichen eine unmittelbare Fusion auf der DNA-Ebene. Für die Kombination der verschiedenen

Genbereich stehen alle im Stand der Technik etablierten Methoden sowie die erfindungsgemäße Methode mit ihren verschiedenen Ausführungsformen zur Verfügung.

Einem eigenen Erfindungsgegenstand werden Vektoren zugerechnet, die einen der Nukleinsäurebereiche des zweiten Erfindungsgegenstands enthält.

Solche Vektoren bilden die bevorzugten Ausgangspunkte für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen des betreffenden Gens oder zugehörigen Proteins, für erfindungsgemäße Weiterentwicklungen und für die Amplifizierung und Produktion erfindungsgemäßer Proteine.

Geeignete Vektoren können sich von bakteriellen Plasmiden, von Viren oder von Bacteriophagen ableiten, aber auch Elemente verschiedenster Herkunft enthalten. Mit den weiteren jeweils vorhandenen genetischen Elementen vermögen Vektoren, sich in den betreffenden Wirtszellen über mehrere Generationen hinweg als stabile Einheiten zu etablieren. Es ist dabei im Sinne der Erfindung unerheblich, ob sie sich extrachomosomal als eigene Einheiten etablieren oder in ein Chromosom integrieren. Welches der zahlreichen aus dem Stand der Technik bekannten Systeme gewählt wird, hängt vom Einzelfall ab. Ausschlaggebend können beispielsweise die erreichbare Kopienzahl, die zur Verfügung stehenden Selektionssysteme, darunter vor allem Antibiotikaresistenzen, oder die Kultivierbarkeit der zur Aufnahme der Vektoren befähigten Wirtszellen sein.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind Klonierungsvektoren.

Diese eignen sich neben der Lagerung, der biologischen Amplifizierung oder der Selektion des interessierenden Gens für die Charakterisierung des betreffenden Gens, etwa über das Erstellen einer Restriktionskarte oder die Sequenzierung. Klonierungsvektoren sind auch deshalb bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, weil sie eine transportierbare und lagerfähige Form der beanspruchten DNA darstellen. Sie sind auch bevorzugte Ausgangspunkte für molekularbiologische Techniken, die nicht an Zellen gebunden sind, wie beispielsweise die Polymerasekettenreaktion.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind Expressionsvektoren.

Sie sind aufgrund der entsprechenden genetischen Elemente in der Lage, in den für die Produktion von Proteinen optimierten Wirtsorganismen zu replizieren und dort das enthaltene Gen zur Expression zu bringen. Bevorzugte Ausführungsformen sind Expressionsvektoren, die selbst alle zur Expression notwendigen genetischen Elemente tragen. Promotoren regulieren die Transkription eines Gens. Beispiele hierfür sind natürliche, ursprünglich vor den betreffenden Genen lokalisierte Promotoren. Da diese für die meisten der erfindungsgemäßen Gene jedoch nicht als bekannt vorausgesetzt werden können, sind solche Ausführungsformen bevorzugt, bei denen nach gentechnischer Fusion bekannte, andere Promotoren zur Regulation des Transgens bereitgestellt werden. Dabei kann es sich um einen Promotor der Wirtszelle, um einen modifizierten oder auch um einen völlig anderen Promotor aus einem anderen Organismus handeln. Bevorzugte Ausführungsformen sind solche Expressionsvektoren, die über Änderungen der Kulturbedingungen oder Zugabe von bestimmten Verbindungen, wie beispielsweise die Zelldichte oder spezielle Faktoren, regulierbar sind.

Expressionsvektoren ermöglichen in Abhängigkeit von den jeweiligen genetischen Elementen eine heterologe oder eine homologe Proteinexpression. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können auch zellfreie Expressionssysteme sein, bei denen die Proteinbiosynthese *in vitro* nachvollzogen wird. Derartige Expressionssysteme sind im Stand der Technik ebenfalls etabliert und beruhen auf den in Klonierungs- oder Expressionsvektoren bereitgestellten Genen.

Diesem Erfindungsgegenstand werden Wirtszellen zugerechnet, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder Derivate exprimieren oder zu dessen Expression angeregt werden können. Dies geschieht vorzugsweise unter Einsatz eines entsprechenden Expressionsvektors.

Die *In-vivo*-Synthese eines erfindungsgemäßen amylolytischen Enzyms durch lebende Zellen, erfordert den Transfer des zugehörigen Gens in eine Wirtszelle, deren sogenannte Transformation. Als Wirtszellen eignen sich prinzipiell alle Organismen, das heißt Prokaryonten, Eukaryonten oder Cyanophyta. Bevorzugt sind solche Wirtszellen,

die sich genetisch gut handhaben lassen, was beispielsweise die Transformation mit dem Expressionsvektor und dessen stabile Etablierung angeht. Zudem zeichnen sich bevorzugte Wirtszellen durch eine gute mikrobiologische und biotechnologische Handhabbarkeit aus. Das betrifft beispielsweise leichte Kultivierbarkeit, hohe Wachstumsraten, geringe Anforderungen an Fermentationsmedien und gute Produktions- und Sekretionsraten für Fremdproteine. Häufig müssen aus der Fülle an verschiedenen nach dem Stand der Technik zur Verfügung stehenden Systeme die optimalen Expressionssysteme für den Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Bevorzugte Ausführungsformen stellen solche Wirtszellen dar, die aufgrund genetischer Regulationselemente, die beispielsweise auf dem Expressionsvektor zur Verfügung gestellt werden, aber auch von vornherein in diesen Zellen vorhanden sein können, in ihrer Proteinbildungsrate regulierbar sind. Beispielsweise durch kontrollierte Zugabe von chemischen Verbindungen, die als Aktivatoren dienen, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte können diese zur Expression angeregt werden. Dies ermöglicht eine sehr wirtschaftliche Produktion der interessierenden Proteine.

Eine Variante dieses Versuchsprinzips stellen Expressionssysteme dar, bei denen zusätzliche Gene, beispielsweise solche, die auf anderen Vektoren zur Verfügung gestellt werden, die Produktion erfindungsgemäßer Proteine beeinflussen. Hierbei kann es sich um modifizierende Genprodukte handeln oder um solche, die mit dem erfindungsgemäßen Protein gemeinsam aufgereinigt werden sollen, etwa um dessen amylolytische Funktion zu beeinflussen. Dabei kann es sich beispielsweise um andere Proteine oder Enzyme, um Inhibitoren oder um solche Elemente handeln, die die Wechselwirkung mit verschiedenen Substraten beeinflussen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Bakterium ist, insbesondere eines, das das gebildete Protein oder Derivat ins umgebende Medium sekretiert.

Bevorzugte Wirtszellen sind prokaryontische oder bakterielle Zellen. Bakterien zeichnen sich gegenüber Eukaryonten in der Regel durch kürzere Generationszeiten und geringere Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Verfahren zur Gewinnung erfindungsgemäßer Proteine etabliert werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie gram-positive Bakterien sind.

Grampositive Bakterien, wie beispielsweise Bacilli oder Actinomyceten oder andere Vertreter der Actinomycetales, besitzen keine äußere Membran, so daß sekretierte Proteine sogleich in das die Zellen umgebende Nährmedium abgegeben werden, aus welchem sich nach einer anderen bevorzugten Ausführungsform die exprimierten erfindungsgemäßen Proteine direkt aufreinigen lassen.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie der Gattung *Bacillus*, vorzugsweise der Species *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* oder *Bacillus alcalophilus* angehören.

Diese stellen etablierte gram-positive Expressionssysteme dar.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie der Ordnung Actinomycetales, insbesondere der Gattung *Streptomyces*, vorzugsweise der Species *Streptomyces lividans*, besonders bevorzugt *S. lividans* TK24, oder der Spezies *Streptomyces* sp. 327* oder *Streptomyces* sp. B400B angehören, insbesondere einem der beiden Stämme DSM 13990 oder DSM 13991.

Denn aus Vertretern dieser Gattung, beziehungsweise dieser Spezies konnten, wie oben und in den Beispielen beschrieben ist, besonders bevorzugte Ausführungsformen erfindungsgemäßer Proteine erhalten werden. Sie eignen sich auch aufgrund der ähnlichen Codon-Usage besonders zur Expression der mit dieser Erfindung zur Verfügung gestellten Gene und Genfragmente.

Sie ermöglichen für den Fall, daß in ihnen die eigenen Gene exprimiert werden, eine homologe Proteinexpression. Diese kann den Vorteil aufweisen, daß natürliche, mit der Translation in einem Zusammenhang stehende Modifikationsreaktionen an dem entstehenden Protein genauso durchgeführt werden, wie sie auch natürlicherweise ablaufen würden. Dies kann beispielsweise über einen eingebrachten Vektor erfolgen, der das bereits endogen vorhandene Gen, oder erfindungsgemäße Abwandlungen desselben, in diese Zellen einbringt, beispielsweise in einer vielfachen Kopienzahl.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie gram-negative Bakterien sind.

Denn an gram-negativen Bakterien, wie beispielsweise *E. coli* oder *Klebsiella*, hat man in der biotechnologischen Produktion bislang die meisten Erfahrungen machen können. Bei ihnen werden zudem eine Vielzahl von Proteinen in den periplasmatischen Raum sekretiert, also in das Kompartiment zwischen den beiden die Zellen einschließenden Membranen. Dies kann für spezielle Anwendungen ausgenutzt werden. Demgegenüber kann aber auch die gezielte Freisetzung der von gram-negativen Bakterien produzierten Enzyme in den extrazellulären Raum bevorzugt sein. Ein Verfahren hierfür wird beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP01/04227 mit dem Titel "Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine durch gram-negative Bakterien" beschrieben.

Bevorzugt sind solche Wirtszellen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie der Gattung *Escherichia*, bevorzugt der Spezies *Escherichia coli*, besonders bevorzugt einem der Stämme *E. coli* JM 109, *E. coli* DH100B oder *E. coli* DH 12S angehören.

Hierbei handelt es sich um etablierte, allgemein zugängliche Labor- und Produktionsstämme. Der Stamm *E. coli* DH 12S wurde in Beispiel 6 erfolgreich für die heterologe Expression der erhaltenen Actinomycetales-Gene verwendet; es konnten dadurch Proteine mit nachweisbarer α -Amylase-Aktivität erhalten werden.

Eine weitere Ausführungsform stellen Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie eukaryontische Zellen sind, insbesondere solche, die das gebildete Protein posttranslational modifizieren.

Beispiele dafür sind Pilze oder Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Dies kann beispielsweise dann besonders vorteilhaft sein, wenn die Proteine im Zusammenhang mit ihrer Synthese spezifische Modifikationen erfahren sollen, die derartige Systeme ermöglichen. Dazu gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide.

Eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands stellen Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Proteins oder Derivats dar. Dafür werden erfindungsgemäße Nukleinsäuren eingesetzt, optional unter Verwendung eines entsprechenden Vektors und/oder unter Verwendung einer entsprechenden Wirtszelle oder unter Verwendung einer Zelle, die dieses natürlicherweise bildet. Hierunter sind die oben diskutierten natürlichen Organismen entsprechend bevorzugt.

Alle bereits oben ausgeführten Elemente können zu Verfahren kombiniert werden, um erfindungsgemäße Proteine herzustellen. Es ist dabei für jedes erfindungsgemäße Protein eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten an Verfahrensschritten denkbar. Sie alle verwirklichen die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Idee, nämlich Vertreter eines über die amylolytische Funktion und gleichzeitig die hohe Homologie zu den in den Sequenzprotokollen angegebenen Sequenzen definierten Proteintyps mithilfe der zugehörigen genetischen Information quantitativ herzustellen. Das optimale Verfahren muß für jeden konkreten Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Prinzipiell wird dabei folgendermaßen vorgegangen: Erfindungsgemäße Nukleinsäuren werden in Form der DNA in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert. Dieser wird in die Wirtszelle transformiert, beispielsweise in Zellen eines leicht zu kultivierenden Bakterienstammes, der die Proteine, deren Gene unter der Kontrolle entsprechender genetischer Elemente stehen, in das umgebende Nährmedium ausschleust oder im Zellinneren akkumuliert; regulierende Elemente dafür können beispielsweise vom Expressionsvektor zur Verfügung gestellt werden. Aus dem umgebenden Medium, beziehungsweise unter Zellaufschluß aus den Wirtszellen selbst, kann das erfindungsgemäße Protein über mehrere Aufreinigungsschritte, wie beispielsweise Fällungen oder Chromatographien, aufgereinigt werden. Ein Fachmann ist in der Lage, ein System, welches im Labormaßstab experimentell optimiert worden ist, auf einen großtechnischen Produktionsmaßstab zu übertragen.

Die technischen Einsatzmöglichkeiten für erfindungsgemäße Amylasen stellen einen eigenen Erfindungsgegenstand dar. Denn die zugrundeliegende Aufgabe hatte darin bestanden, geeignete Amylasen für diverse technische Prozesse zur Verfügung zu stellen. Die wichtigsten davon werden im folgenden ausgeführt.

Zahlreiche in der Technik etablierte Anwendungsmöglichkeiten für amylytische Enzyme werden in Handbüchern, wie beispielsweise dem Buch „Industrial enzymes and their applications“ von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998, ausgeführt. Folgende Zusammenstellung ist nicht als abschließende Aufzählung zu verstehen, sondern stellt eine Auswahl der technischen Verwendungsmöglichkeiten dar. Sollte sich herausstellen, daß einzelne, innerhalb des Ähnlichkeitsbereichs liegende Proteine aufgrund ihrer enzymatischen, das heißt amylytischen Eigenschaften für zusätzliche hier nicht ausdrücklich beanspruchte Anwendungsmöglichkeiten geeignet sind, so werden diese hiermit in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung miteingeschlossen.

Eine Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands sind Wasch- und Reinigungsmittel, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie ein erfindungsgemäßes Protein oder Derivat enthalten.

Ein wichtiges Einsatzgebiet für amylytische Enzyme ist das als aktive Komponenten in Wasch- oder Reinigungsmitteln zur Reinigung von Textilien oder von festen Oberflächen, wie beispielsweise Geschirr, Fußböden oder Arbeitsgeräten. In diesen Anwendungen dient die amylytische Aktivität dazu, kohlenhydrathaltige Verunreinigungen und insbesondere solche auf Stärkebasis hydrolytisch aufzulösen oder vom Untergrund abzulösen. Dabei können sie allein, in geeigneten Medien oder auch in Wasch- oder Reinigungsmitteln zur Anwendung gebracht werden. Die hierfür zu wählenden Bedingungen, wie beispielsweise Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Redox-Verhältnisse oder mechanische Einflüsse sollten für das jeweilige Reinigungsproblem optimiert werden, also in Bezug auf die Anschmutzung und auf das Trägermaterial. So liegen übliche Temperaturen für Wasch- und Reinigungsmittel in Bereichen von 10°C bei manuellen Mitteln über 40°C und 60°C bis hin zu 95° bei maschinellen Mitteln oder bei technischen Anwendungen. Vorzugsweise werden auch die Inhaltsstoffe der betreffenden Mittel aufeinander abgestimmt. Da bei modernen Wasch- und Spülmaschinen die Temperatur meist stufenlos einstellbar ist, sind auch alle Zwischenstufen der Temperatur eingeschlossen. Die übrigen Bedingungen können über die übrigen Bestandteile der Mittel ebenfalls sehr variabel auf den jeweiligen Reinigungszweck ausgelegt werden.

Bevorzugte erfindungsgemäße Mittel zeichnen sich dadurch aus, daß unter irgendwelchen der auf diese Weise definierbaren Bedingungen die Wasch- oder

Reinigungsleistung dieses Mittels durch Zugabe eines erfindungsgemäßen amylolytischen Enzyms gegenüber der Rezeptur ohne dieses Enzym verbessert wird. Insofern werden bevorzugt solche amylolytischen Proteine in erfindungsgemäße Mittel eingearbeitet, die die Wasch- und/oder Reinigungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels zu verbessern vermögen.

Weiterhin bevorzugte Mittel zeichnen sich dadurch aus, daß die amylolytischen Enzyme und die übrigen Komponenten synergistisch die Beseitigung der Verunreinigungen bewirken. Das geschieht beispielsweise so, daß die Hydrolyseprodukte der amylolytischen Proteine durch andere Bestandteile der Mittel wie etwa Tenside solubilisiert werden. Ein erfindungsgemäßes Protein kann sowohl in Mitteln für Großverbraucher oder technische Anwender als auch in Produkten für den Privatverbraucher Anwendung finden, wobei alle im Stand der Technik etablierten und/oder zweckmäßigen Darreichungsformen auch Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

Die Amylasen werden in erfindungsgemäßen Mittel beispielsweise mit einzelnen oder mehreren der folgenden Inhaltsstoffe kombiniert: anionische, kationische und/oder nichtionische Tenside, Builder, Bleichmittel, Bleichaktivatoren, Bleichkatalysatoren, Enzyme wie beispielsweise Proteasen, andere Amylasen, Lipasen, Cellulasen, Hemicellulasen oder Oxidasen, Stabilisatoren, insbesondere Enzymstabilisatoren, Lösungsmittel, Verdicker, Abrasivstoffe, Farbstoffe, Duftstoffe, Vergrauungsinhibitoren, Farbtransferinhibitoren, Schauminhibitoren, Korrosionsinhibitoren, insbesondere Silberschutzmittel, optische Aufheller, antimikrobielle Wirkstoffe, UV-Schutzmittel und andere Komponenten, die aus dem Stand der Technik bekannt sind.

Bevorzugte Mittel sind dadurch gekennzeichnet, daß sie 0,000001 Gewichts-Prozent bis 5 Gew.-%, und zunehmend bevorzugt 0,00001 bis 4 Gew.-%, 0,0001 bis 3 Gew.-%, 0,001 bis 2 Gew.-% oder 0,01 bis 1 Gew.-% des amylolytischen Proteins oder Derivats enthalten.

Bevorzugte Mittel sind dadurch gekennzeichnet, daß sie aus mehr als einer Phase bestehen. Hierunter können feste Mittel sein, insbesondere solche, bei denen mindestens zwei verschiedene feste Komponenten, insbesondere Pulver, Granulate oder Extrudate, in insgesamt loser Form miteinander vermischt vorliegen oder mindestens zwei feste Phasen miteinander verbunden vorliegen, insbesondere nach

einem gemeinsamen Kompaktierungsschritt. Zusätzlich kann wenigstens eine der Phasen ein Amylase-sensitives Material, insbesondere Stärke enthalten oder von diesem zumindest teilweise umgeben oder beschichtet sein.

Ebenfalls bevorzugte Mittel sind dadurch gekennzeichnet, daß sie insgesamt flüssig, gelförmig oder pastös sind. Vorzugsweise liegen darin das enthaltene Protein und/oder wenigstens eines der enthaltenen Enzyme und/oder wenigstens eine der sonstigen enthaltenen Komponenten einzeln oder zusammen mit anderen Bestandteilen verkapselt vor, bevorzugt in Mikrokapseln, besonders bevorzugt in solchen aus einem Amylase-sensitiven Material.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die amylolytische Aktivität durch einen der sonstigen Bestandteile des Mittels modifiziert, insbesondere stabilisiert und/oder in ihrem Beitrag zur Wasch-, beziehungsweise Reinigungsleistung des Mittels gesteigert.

Diesen Ausführungen entsprechend stellen auch alle Wasch- oder Reinigungsverfahren, die in wenigstens einem Teilschritt auf einer erfindungsgemäßen α -Amylase beruhen oder vorzugsweise ein erfindungsgemäßes Mittel zum Einsatz kommt, Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

Ebenso stellt jede Verwendung einer erfindungsgemäßen α -Amylase oder vorzugsweise eines erfindungsgemäßen Mittels zum Waschen oder Reinigen von Textilien oder harten Oberflächen eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

Eine weitere Ausführungsform stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung dar, insbesondere zum Entschlichten von Baumwolle.

Rohmaterialien und Zwischenprodukte der Textilherstellung, beispielsweise für solche auf Baumwollbasis, werden im Rahmen ihrer Herstellung und Weiterverarbeitung mit Stärke ausgerüstet, um eine bessere Verarbeitung zu ermöglichen. Dieses sowohl auf Garne, auf Zwischenprodukte, als auch auf Textilien angewendete Verfahren nennt man Schlichten (sizing). Zur Entfernung der Schlichte, also der stärkehaltigen Schutzschicht (Entschlichten, desizing) sind erfindungsgemäße amylolytische Proteine geeignet.

Eine weitere Ausführungsform stellen Verfahren zur Stärkeverflüssigung, insbesondere zur Ethanolproduktion dar, die dadurch gekennzeichnet sind, daß darin ein erfindungsgemäßes Protein oder Derivat eingesetzt wird.

Zur Stärkeverflüssigung wird in Wasser oder Puffer gequollene Stärke mit amylolytischen Enzymen inkubiert, wodurch das Polysaccharid in kleinere Bestandteile, . zuletzt überwiegend in Maltose gespalten wird. Erfindungsgemäße Enzyme werden bevorzugt für ein solches Verfahren oder einen Teilschritt davon eingesetzt, wenn sie sich aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften gut in ein entsprechendes Produktionsverfahren einpassen lassen. Dies kann beispielsweise dann der Fall sein, wenn sie in einem Schritt zusätzlich zu anderen Enzymen eingebracht werden sollen, die die gleichen Reaktionsbedingungen benötigen. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße amylolytische Proteine, wenn gerade die von ihnen selbst gebildeten Produkte im Zentrum des Interesses stehen. Die Stärkeverflüssigung kann auch einen Schritt in einem mehrstufigen Verfahren zur Gewinnung von Ethanol oder davon abgeleiteten Folgeprodukten, beispielsweise Essigsäure darstellen.

Eine weitere Ausführungsform stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Herstellung von linearen und/oder kurzkettigen Oligosacchariden dar.

Aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität bilden erfindungsgemäße amylolytische Proteine aus stärkeähnlichen Polymeren nach kürzerer Inkubationszeit überwiegend höhermolekulare Oligosaccharide, wie beispielsweise Maltohexaose, Maltoheptaose oder Maltooctaose. Nach längerer Inkubationszeit steigt unter den Reaktionsprodukten der Anteil niedrigerer Oligosaccharide, wie beispielsweise Maltose oder Maltotriose an. Bei besonderem Interesse an bestimmten Reaktionsprodukten können entsprechende Varianten erfindungsgemäßer Proteine verwendet und/oder die Reaktionsbedingungen entsprechend gestaltet werden. Dies ist insbesondere dann attraktiv, wenn es nicht auf reine Verbindungen, sondern auf Gemische ähnlicher Verbindungen ankommt, wie beispielsweise bei der Bildung von Lösungen, Suspensionen oder Gelen mit lediglich bestimmten physikalischen Eigenschaften.

Eine weitere Ausführungsform stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Hydrolyse von Cyclodextrinen dar.

Cyclodextrine sind α -1,4-glycosidisch verknüpfte, cyclische Oligosaccharide, von denen die aus 6, 7 oder 8 Glucose-Monomeren, die α -, β -, beziehungsweise γ -Cyclodextrine (oder Cyclohexa-, -hepta-, beziehungsweise -octa-Amylosen), wirtschaftlich die größte Bedeutung besitzen. Sie können mit hydrophoben Gastmolekülen, wie beispielsweise Duftstoffen, Geschmacksstoffen oder pharmazeutischen Wirkstoffen, Einschlußverbindungen bilden, aus welchen die Gastmoleküle bei Bedarf wieder freigesetzt werden können. Solche Einschlußverbindungen sind je nach Einsatzgebiet der Inhaltsstoffe beispielsweise für die Herstellung von Nahrungsmitteln, die Pharmazie oder die Kosmetik, beispielsweise in entsprechenden Produkten für den Endverbraucher von Bedeutung. Die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus Cyclodextrinen stellt somit eine Verwendungsmöglichkeit für erfindungsgemäße Proteine dar.

Eine weitere Ausführungsform stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Freisetzung von niedermolekularen Verbindungen aus Polysaccharidträgern oder Cyclodextrinen dar.

Aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität können erfindungsgemäße amylytische Proteine niedermolekulare Verbindungen auch aus anderen α -1,4-glycosidisch verknüpften Polysacchariden freisetzen. Dieses kann sich wie bei den Cyclodextrinen auf molekularer Ebene abspielen als auch an größeren Systemen, wie beispielsweise Inhaltsstoffen, die in Form von Mikrokapseln verkapselt sind. Beispielsweise Stärke ist ein im Stand der Technik etabliertes Material, um Verbindungen wie beispielsweise Enzyme, die in definierten Mengen in Reaktionsansätze eingebracht werden sollen, während der Lagerung einzukapseln. Der kontrollierte Freisetzungsprozeß aus derartigen Kapseln kann von erfindungsgemäßen amylytischen Enzymen unterstützt werden.

Eine weitere Ausführungsform stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Herstellung von Lebensmitteln und/oder Lebensmittelbestandteilen dar.

Ebenso stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Herstellung von Tierfutter und/oder Tierfutterbestandteilen eine Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands dar.

Wo immer Stärke oder von Stärke abgeleitete Kohlenhydrate als Lebensmittel- oder Tiernahrungsbestandteil eine Rolle spielen, kann eine amylytische Aktivität zur Herstellung dieser Artikel zum Einsatz kommen. Sie erhöht den Anteil von Mono-, oder Oligomeren gegenüber dem polymeren Zucker, was beispielsweise dem Geschmack, der Verdaubarkeit oder der Konsistenz des Lebensmittels zugute kommen kann. Dies kann zur Herstellung bestimmter Tierfutter erforderlich sein, beispielsweise aber auch bei der Herstellung von Fruchtsäften, Wein oder anderer Lebensmittel, wenn der Anteil polymerer Zucker verringert und der von süßen und/oder leichter löslichen Zuckern erhöht werden soll. Die weiter oben ausgeführte Verwendungsmöglichkeit zur Stärkeverflüssigung und/oder Ethanolproduktion kann als großtechnische Variante dieses Prinzips angesehen werden.

Amylasen wirken darüberhinaus auch dem unter Altbacken-Werden bekannten Geschmacksverlust von Backwaren (Anti staling-Effekt) entgegen. Dafür werden sie geeigneterweise dem Teig vor dem Backen zugesetzt. Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind also solche, bei denen erfindungsgemäße Proteine zur Herstellung von Backwaren verwendet werden.

Eine weitere Ausführungsform stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder Derivats zur Auflösung stärkehaltiger Klebeverbindungen dar.

Ebenso stellen temporäre Klebeverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß darin ein erfindungsgemäßes Protein oder Derivat eingesetzt wird, eine Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands dar.

Neben anderen Naturstoffen wird auch Stärke bereits seit Jahrhunderten als Bindemittel in der Papierherstellung und dem Verkleben unterschiedlicher Papiere und Pappen verwendet. Dies betrifft beispielsweise Graphiken und Bücher. Im Laufe langer Zeiträume können solche Papiere unter ungünstigen Einflüssen, wie beispielsweise Feuchtigkeit, Wellen aufwerfen oder brechen, was bis zu deren völliger Zerstörung führen kann. Bei der Restaurierung solcher Papiere und Pappen kann das Auflösen der Klebeschichten erforderlich sein und durch Verwendung eines erfindungsgemäßen amylytischen Proteins erheblich erleichtert werden.

Pflanzliche Polymere wie Stärke oder Cellulose und deren wasserlösliche Derivate werden unter anderem als Klebstoffe oder Kleister verwendet. Dafür müssen sie in Wasser zunächst quellen und nach Aufbringen auf dem Klebegut trocknen, wodurch dieses am Untergrund fixiert wird. Das erfindungsgemäße Enzym kann solch einer wäßrigen Suspension zugesetzt werden, um die Klebeeigenschaften des entstehenden Kleisters zu beeinflussen. Es kann aber auch stattdessen oder zusätzlich zu dieser Funktion dem Kleister zugesetzt werden, um nach dem Antrocknen für lange Zeit, beispielsweise einige Jahre, inaktiv auf dem Klebegut zu verharren. Gezieltes Ändern der Umgebungsbedingungen, beispielsweise durch Anfeuchten, kann dann dazu verwendet werden, um das Enzym zu einem späteren Zeitpunkt zu aktivieren und damit ein Auflösen des Kleisters herbeizuführen. Auf diese Weise ist das Klebegut leichter wieder vom Untergrund abzulösen. In diesem Verfahren fungiert das erfindungsgemäße Enzym aufgrund seiner amylolytischen Aktivität als scheidendes Agens in einem temporären Klebeverfahren oder als sogenannter „Schalter“ zum Ablösen des Klebeguts.

Beispiele

Beispiel 1

Konstruktion von Primer-Oligonukleotiden zur Amplifizierung von variablen Sequenzbereichen von α -Amylasen

Basierend auf Vergleichen bekannter Sequenzen von α -Amylasen (E.C. 3.2.1.1) gram-positiver Eubakterien verschiedener Gattungen der Ordnung Actinomycetales (*Streptomyces*, *Thermomonospora* und anderer) aus GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; Stand November 1998) wurden potentiell konservierte Sequenzbereiche identifiziert, die möglichst variable Sequenzbereiche flankieren. Als konservierte Sequenzblöcke wurden die in Figur 1 hervorgehobenen Blöcke A bis E identifiziert. Sie erstrecken sich über folgende Aminosäure-Positionen: A: 58-91, B: 94-141, C: 155-207, D: 295-345, E: 392-427. Anhand der Sequenzen dieser Bereiche wurden die in Tabelle 4 zusammengestellten Oligonukleotide als erfindungsgemäße Primer entworfen; ihre Sequenzen werden im Sequenzprotokoll unter den Nummern 9 bis 33 angegeben. Ihre Lage im Verhältnis zu den konservierten Sequenzblöcken A bis E innerhalb eines α -Amylasegens ist beispielhaft an der α -Amylase aus *Streptomyces griseus* (GenBank Accession-Number X57568) in Figur 1 dargestellt. Sie lassen sich in Orientierung zu diesem Gen in forward- und reverse-Primer unterscheiden.

Tabelle 4: PCR-Primer zur Amplifizierung von Teilsequenzen von α -Amylasen von Vertretern der Ordnung Actinomycetales.

Angegeben sind jeweils die in Figur 1 verwendeten Namen, die zugehörigen Nummern nach dem Sequenzprotokoll der vorliegenden Patentanmeldung und die Orientierung der Primer in Relation zu den betreffenden Amylasegenen.

Name	SEQ ID NO.	Orientierung
GEX 015	13	forward
GEX 016	14	forward
GEX 017	15	forward

GEX 018	16	forward
GEX 019	17	reverse
GEX 020	18	reverse
GEX 021	19	reverse
GEX 022	20	reverse
GEX 023	21	forward
GEX 024	9	forward
GEX 025	22	reverse
GEX 026	10	reverse
GEX 027	23	forward
GEX 028	24	forward
GEX 029	11	forward
GEX 030	25	reverse
GEX 031	12	reverse
GEX 036	26	forward
GEX 037	27	forward
GEX 038	28	reverse
GEX 039	29	reverse
GEX 040	30	forward
GEX 041	31	forward
GEX 042	32	reverse
GEX 043	33	reverse

Als Matrize dienten nach Standardmethoden erhaltene genomische DNA-Präparationen bekannter und unbekannter bakterieller Isolate aus diversen Bodenproben, die jeweils in Reinkultur vorlagen. Die Primer wurden in Kombinationen von jeweils einem *forward*- mit einem *reverse*-Primer in jeweils einer PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden wie unten beschrieben über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und zum Screening nach vollständigen Genen verwendet.

Unter den PCR-Ansätzen befanden sich auch solche mit den Primerkombinationen GEX024 (forward) / GEX026 (reverse) und GEX029 (forward) / GEX031 (reverse). Diese

sind aus den Sequenzbereichen C (GEX024 und GEX029) und D (GEX026 und GEX031), abgeleitet (Figur 1), welche den Amylasedomänen $\beta 4$ und $\beta 7$ der $(\alpha\beta)_8$ -Barrelstruktur entsprechen, wie sie im Aufsatz „Alpha-Amylase family: molecular biology and evolution“ (Janecek, S. (1997), *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67 (1), S. 67-97) definiert sind. Die Nukleotidsequenzen für diese vier Primer sind im Sequenzprotokoll unter den Bezeichnungen SEQ ID NO. 9 bis SEQ ID NO. 12 angegeben.

Diese vier Primer ergaben in den PCR-Ansätzen mit den isolierten Nukleinsäuren bakterieller Isolate Fragmente reproduzierbarer Größe. Figur 2 zeigt eine beispielhafte Größenanalyse der erhaltenen Amplifizierungsprodukte von 20 zufällig ausgewählten Präparationen von Isolaten der Ordnung Actinomycetales; mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 in Figur 2 A und mit dem Primerpaar GEX029/GEX031 in Figur 2 B. Die PCR-Bedingungen sind in Beispiel 2 angegeben; jeweils 1/10 des Reaktionsvolumens wurde nach der Reaktion in einem 2,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Ansätze beruhen auf den in der folgenden Tabelle zusammengestellten Stämmen von *Streptomyces sp.*.

Tabelle 5: Stämme von *Streptomyces sp.*, deren PCR-Produkte mit mit den Primerpaaren GEX024/GEX026 und GEX029/GEX031 in Figur 2 gezeigt sind.

Bahnen	<i>Streptomyces sp. ...</i>	SEQ ID NO.
1	B101A	45
2	B114C	83
3	B134	97
4	B135A	98
5	B138A	101
6	B152A	108
7	B153(B)	109
8	B161A	116
9	B156B	111
10	B157C	112
11	B158A	113

12	B160B	115
13	B161A	116
14	B373	232
15	B375	234
16	B380	236
17	B390	238
18	B392A	239
19	B392A	239
20	B394	241

Mit beiden Primerpaaren wurden DNA-Fragmente entsprechend einer 300 bp-Bande amplifiziert. Daneben tauchte in einigen Ansätzen ein Fragment von ca. 500 bp auf. Beide Produkte wurden durch Sequenzierung (siehe Beispiel 2) als α -Amylase-Sequenzen bestimmt. Die anderen oben und im Sequenzprotokoll aufgeführten Primer zeigten eine geringere Selektivität.

Alle im Sequenzprotokoll aufgeführten Stämme ergaben die gleichen Ergebnisse; insbesondere die Bande von 300 bp war für alle Stämme reproduzierbar. Alle Fragmente, insbesondere die 300 bp-Fragmente, die auf diese Weise von den getesteten Proben erhalten werden konnten, lassen sich homologisieren. Sie weisen insbesondere in den Primer-Bereichen große, wenn auch nicht notwendigerweise völlige Übereinstimmungen auf, die ausgereicht haben, um sie mit der erfindungsgemäßen Methode zu identifizieren. Sie definieren über ihre Sequenzvariationen zueinander, wie sie auch im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 263 und in Figur 3 angegeben sind, einen Sequenzvarianzraum innerhalb der Gruppe der amylolytischen Proteine.

Beispiel 2

Gewinnung der genomischen DNA aus Actinomyceten und PCR-basierte Amplifizierung und Klonierung von α -Amylase Gensequenzen

Die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Methode wurde an einer Sammlung von mehreren hundert einzelnen Isolaten der Ordnung Actinomycetales erprobt, welche nach

gängigen mikrobiologischen Methoden aus Bodenproben gewonnen worden waren. Es handelte sich jeweils um kultivierte Einzelstämme.

Die Isolierung erfolgte in diesem Beispiel nach Standardmethoden, ausgehend von Bodenproben unter Verwendung von GYM-Medium (4,0 g/l Glucose, 4,0 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Malzextrakt, 2,0 g/l CaCO_3 , 10 g/l Agar, pH 7,2) unter Zusatz von 50 µg/ml Nystatin zur Unterdrückung der Begleitflora.

Anzucht der Stämme

Die Anzucht der Actinomyceten-Stämme erfolgte durch Inokulation von 5 ml GHPF-Medium (10 g/l Glucose; 5 g/l Pepton aus Casein; 5 g/l Fleischextrakt; 5 g/l Hefeextrakt; 0,74 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2) mit 50 µl Sporensuspension bei der jeweils Stammspezifischen Temperatur (28°C bis 50°C) und 200 rpm Schüttelgeschwindigkeit.

Nach ausreichender Mycelbildung wurden 200 ml YEME-Medium (3 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Bacto-Trypton; 3 g/l Malzextrakt; 10 g/l D(+)Glucose; 340 g/l Saccharose; pH 7,2; nach Autoklavieren Zugabe von 5 mM MgCl_2 und Glycin, Stamm-spezifisch 0,5 – 20 g/l) mit der gesamten Vorkultur beimpft und bei gleicher Temperatur und bei 170 rpm 3 Tage lang in einem 1-Liter Schikanenkolben geschüttelt.

DNA Isolierung

Für die DNA-Präparation wurden je 1 g in 20 % (v/v) Glycerin gewaschenes Mycel in 3 ml TE25S-Puffer (25 mM Tris, pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M Saccharose) unter Zugabe von 2 mg/ml Lysozym resuspendiert, 30 min bei 37°C invertiert und nach Zugabe von 4 ml 2x Kirby-Mix-Lösung (2 % SDS; 120 g/l Natrium-4-aminosalicylat; 100 mM Tris, pH 8,0; 6% Phenol, gesättigt mit 50 mM Tris/pH 8,0 und supplementiert mit 0,1 % Hydroxychinolin) weitere 10 min invertiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Extraktion der wässrigen Phase mit nacheinander 8 und 3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) über jeweils 10-minütiges Invertieren und nachfolgendes Zentrifugieren bei 2500 x g. Die DNA wurde unter Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (ungepuffert) und 0,6 Volumen Isopropanol bei leichtem Invertieren gefällt, aufgespult und fünfmal mit 70 % Ethanol gereinigt. Das Pellet wurde

in 3 ml HE-Puffer (10 mM HEPES pH 8,0 mit NaOH; 1 mM EDTA) aufgenommen, 1 h bei 50 - 55°C inkubiert und über Nacht bei 4°C gelöst.

Gegebenenfalls kann hieran noch ein Reinigungsschritt angeschlossen werden, um eventuelle, auf eine Amplifikationsreaktion inhibitorisch wirkende, die DNA begleitende Komponenten zu entfernen. Dies war bei einigen DNA-Präparationen erforderlich, bei denen zunächst kein PCR-Produkt (siehe unten) gebildet worden war. Hier mußte zunächst der Einfluß von inhibitorischen Komponenten in der DNA-Präparation durch Verdünnen (bis zu 1:100) oder durch Aufreinigung über eine QIAquick PCR-Purification Säule (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben unterbunden werden.

Am Folgetag fand eine Aufarbeitung der DNA durch einstündige Inkubationen bei 37°C, nacheinander mit 40 µg/ml RNaseA (hitzeinaktiviert) und 0,5 mg/ml Proteinase K statt. Anschließend wurde die wäßrige Phase im gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, 10 min invertiert, bei 2500 x g zentrifugiert und wie am Vortag gefällt, nach Aufspulen gewaschen und in 1 ml HE-Puffer gelöst.

Amplifizierung der Amylasesequenzen durch die erfindungsgemäße PCR

Vor einer Charakterisierung der Amylase-Sequenzen erfolgte zunächst eine Amplifizierung durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Diese wurde unter Verwendung von HotStar *Taq*-Polymerase (Firma Qiagen, Hilden) und der Amylase-spezifischen Primer durchgeführt (Beispiel 1, Tabelle 3). Hierfür wurden jeweils 4 µl der nach obigem Verfahren isolierten genomischen DNA in Gegenwart von 200 µM dNTPs (jeweils dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20 pmol jeweils eines forward- und eines reverse-Primers, 2,5 U HotStar *Taq*-Polymerase (Firma Qiagen, Hilden) und 1 x PCR-Puffer in 50 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Es wurden Fragmente der Größen 280 bis 500 bp in folgenden Zyklen amplifiziert: 1 Zyklus 15 min bei 95°C; 40 Zyklen mit je 30 s bei 95°C, 30 s bei 60°C und 30 s bei 72°C; 1 Zyklus 7 min bei 72°C.

Insbesondere das Primerpaar GEX024/GEX026 lieferte konstante Ergebnisse bei allen genomischen DNAs bezüglich eines 300 bp Produktes, das in der Sequenzierung Homologien zu Amylasen zeigte (siehe Beispiel 1). Bei einigen DNA-Präparationen kam es zunächst zu keiner Produktbildung. Hier mußte zunächst der Einfluß von inhibitorischen Komponenten in der DNA-Präparation durch Verdünnen (bis zu 1:100)

oder durch Aufreinigung über eine QIAquick®-PCR-Purification Säule (Firma Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben unterbunden werden.

Die mit der Primerkombination GEX024/GEX026 erhaltenen Banden (ca. 300 bp) wurden zur Sequenzierung mithilfe des QIAEX II®-Kits der Firma Qiagen (Hilden) eluiert und mittels des TOPO TA®-Kits (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande) nach Herstellerangaben in den pCR2.1-TOPO®-Vektor kloniert. Mit den Ligationsprodukten wurde in *E.coli*-TOP® 10F' (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande) transformiert. Nach Blau/weiß-Selektion rekombinanter Klone auf LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (100 mM), X-Gal (40 mg/ml) wurde die Plasmid-DNA von weißen Klonen nach Minipräparation in einer Restriktionsanalyse mit *Eco*RI auf Insert-DNA überprüft.

Die Sequenzanalyse von Plasmiden mit Insert-DNA erfolgte routinemäßig auf einem ABI PRISM® 310 (Firma Perkin Elmer, Weiterstadt) nach Herstellerangaben mittels AmpliTaq-FS-Big-Dye® Terminator-Kit (Firma Perkin Elmer, Weiterstadt) unter Einsatz von 200-500 ng Plasmid-DNA, 10 pmol Primer (TopoF: 5'-GCTCGGATCCACTAGTAACG-3' und TopoR: 5'-CTCTAGATGCATGCTCGAG-3'), 4 µl Premix in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden routinemäßig konzeptionell in eine Aminosäuresequenz umgeschrieben, über die BlastX, BlastN und BlastP Algorithmen mit den vorhandenen GenBank-Einträgen verglichen und auf diese Weise als Teilsequenzen von α -Amylasegenen identifiziert. In Tabelle 1 sind für jede erhaltene Teilsequenz die in öffentlich zugänglichen Datenbanken eingetragenen amylolytischen Proteine angegeben, die zu den betreffenden Sequenzen jeweils die höchste Homologie aufweisen. Die gefundenen Teilsequenzen werden im Sequenzprotokoll unter den Nummern SEQ ID NO. 2, 4 und 34 bis 262 aufgeführt und in der Consensus-Sequenz der Figur 3, beziehungsweise der SEQ ID NO. 263 zusammengefaßt.

Hervorgehoben seien die ebenfalls mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 amplifizierten Teilsequenzen, die im Sequenzprotokoll unter den Nummern SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 4 dargestellt sind. Die zugehörigen Stämme wurden mit den Namen *Streptomyces* sp. B327* (SEQ ID NO. 1 und 2) und *Streptomyces* sp. B400B bezeichnet (SEQ ID NO. 3 und 4). Die vom Actinomycetales-Isolat *Streptomyces* sp. B327* erhaltene Teilsequenz umfaßt einschließlich der Primerbereiche 302 Basenpaare und codiert für

100 Aminosäuren. Die vom Actinomycetales-Isolat *Streptomyces* sp. B400B erhaltene Teilsequenz umfaßt einschließlich der Primerbereiche 293 Basenpaare und codiert für 97 Aminosäuren.

Beispiel 3

Typisierung von mikrobiellen Reinkulturoislaten und Klonierung von α -Amylase Gensequenzen

Aus allen in Beispiel 2 bezeichneten Streptomyceten-Stämmen sind, wie beschrieben, die DNA-Sequenzen von α -Amylasen durch eine erfindungsgemäße PCR mit den Primern GEX024/GEX026 amplifiziert und anschließend kloniert und sequenziert worden. Insgesamt wurden somit 231 Teilsequenzen für α -Amylasen gefunden, die im Sequenzprotokoll unter den Nummern SEQ ID NO. 2, 4 und 34 bis 262 aufgeführt sind. Die darin bezeichneten einzelnen Stämme von *Streptomyces* sp., beispielsweise *Streptomyces* sp. B327* und *Streptomyces* sp. B400B, sind darüber charakterisierbar, daß sich aus ihnen über eine PCR mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 Fragmente mit entsprechender Größe und den im Sequenzprotokoll angegebenen Teilsequenzen von Amylasen amplifizieren lassen.

Mithilfe des Alignment-Programms Clustal X®, Version 1.64 b (Standardeinstellungen; beschrieben in: Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994), „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice“, *Nucleic Acids Res.*, Band 22, S. 4673-4680) wurde aus diesen Sequenzen eine Consensus-Sequenz abgeleitet. Über diese gemeinsame Sequenz können sie als Vertreter eines bestimmten Amylasetyps angesehen werden. Diese Consensus-Sequenz ist in zwei alternativen Darstellungsweisen in Figur 3 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 263 wiedergegeben. Zur Positionsdefinition der Consensus-Sequenz wurde die Sequenz des PCR-Produkts von Stamm B327* mit dem Primerpaar GEX024/GEX026 (100 Aminosäuren; SEQ ID NO. 2) zugrundegelegt.

Die in der Consensus-Sequenz so gut wie nicht variabel erscheinenden Aminosäurepositionen 1 bis 8 und 93 bis 100 sind durch die PCR-Primersequenzen (GEX024/GEX026) vorgegeben. Innerhalb dieser Bereiche ergaben sich aufgrund der

Selektivität der durchgeführten PCR nur geringfügige Abweichungen. Stringentere Bedingungen (insbesondere höhere Anlagerungstemperatur) ergeben eine geringere Zahl an positiven Ergebnissen, nämlich solche Sequenzen, die in den Primer-Bereichen vollständig mit diesen übereinstimmen. Unter weniger stringenten Bedingungen werden demgegenüber aufgrund der Komplexität der Ausgangs-DNA zunehmend Produkte gebildet, die in Agarosegelen schwerer voneinander zu trennen sind. Unter diesen nimmt der Anteil der Sequenzen zu, die nicht mehr für Amylasen codieren.

Ansonsten sind in den aufgeführten Sequenzen lediglich die Aminosäurereste Histidin in Position 11 und Leucin in Position 75 über alle getesteten Amylasefragmente konserviert. In Position 28 befinden sich in einigen Fragmenten anstelle einer einzigen Aminosäure Folgen von mehreren Aminosäuren; auch diese sind in Figur 3 und SEQ ID NO. 263, beziehungsweise den betreffenden Einzelsequenzen angegeben. Dabei handelt es sich um den Stamm *Streptomyces* sp. B347 (SEQ ID NO. 212) mit der Teilsequenz TAGGE, um den Stamm *Streptomyces* sp. B361 (SEQ ID NO. 204) mit der Teilsequenz TSGAE und um den Stamm *Streptomyces* sp. B4006B (SEQ ID NO. 246) mit der Teilsequenz YPAWGGGK. Darüber hinaus besitzen einige Fragmente in den Positionen 29, 45, 46, 66, 70, 81, 82, 83 oder 91 keine Aminosäure, so daß deren individuelle Zählung von der der Consensus-Sequenz leicht abweicht; hierzu gehören beispielsweise die der Stämme *Streptomyces* sp. B347, B361 und B1059.

Die gezeigten Sequenzen weisen, wie aus der weiter vorne bereits gezeigten Tabelle 1 entnommen werden kann, zwischen rund 45% und 97% Sequenzidentität zu bekannten α -Amylasen auf. Auch unter diesen Sequenzen ergibt sich zum Teil eine beträchtliche Varianz. So weisen die gefundenen Aminosäuresequenzen der α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B327* und B400B zueinander eine Identität von lediglich 57% auf.

Beispiel 4

Detektion von für α -Amylase codierenden, full-length Gensequenzen durch Aktivitäts-Screening von Expressionsgenbanken

Zur Klonierung und Isolierung vollständiger α -Amylasegene aus Actinomycetales wurde eine Expressionsklonierung im heterologen Wirtsorganismus *Escherichia coli*, und zwar dem Stamm DH 12S gewählt. Als Promotor wurde der mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) induzierbare β -Galactosidase-Promotor des lac-Operons (*lac*-Promotor) eingesetzt.

Dieser wurde auf dem pUC18 Plasmidvektor (GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA); Accession-Number L08752; Figur 4) bereitgestellt.

Die Herstellung von Expressionsgenbanken für die jeweiligen Stämme

Gereinigte genomische DNA aus den jeweiligen Actinomycetales-Stämmen, die gemäß Beispiel 2 erhalten worden war, wurde partiell mit dem Restriktionsenzym *AccI* gespalten, und der Größenbereich von 3 bis 5 kb in mit dem Restriktionsenzym *AccI* linearisierte pUC18-Plasmidvektoren (Figur 4) ligiert. Bei einer mittleren Insertgröße von 4 kb und einer geschätzten Actinomyceten-Genomgröße von 8 Mb ergibt sich für eine gewünschte 5-fache Genomabdeckung in einer Genbank eine Zahl von 20 000 Primärklonen. Da die Expression vom plasmideigenen *lac*-Promotor ausgeht, die Inserts aber jeweils in zwei Orientierungen integrieren können, erhöht sich diese Zahl auf mindestens 40 000 Klone. Dies war die für jede Genbank erreichte Mindestklonzahl.

Zur Ermittlung der optimalen Restriktionsparameter für den präparativen Partialverdau genomischer DNA aus Actinomyceten wurden zunächst Restriktionskinetiken unter Einsatz von 6 µg DNA und Restriktionsenzym (*AccI*) in Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 U pro µg DNA in 1 x-Puffer, gegebenenfalls laut Herstellerangaben mit Rinderserumalbumin (BSA) in einem Gesamtvolumen von 15 µl durchgeführt. Die Ansätze wurden dafür zunächst ohne Enzym auf 37°C temperiert. Dann wurde die jeweilige Reaktion durch Zugabe von Restriktionsendonuklease gestartet. In festgelegten Intervallen zwischen 0 und 10 min wurden jeweils 1,5 µl Reaktionsansatz zu 1 x-Stop-Puffer (6X: 10 mM Tris, pH 7,0; 20 % Glycerin; 0,1% SDS) auf Eis gegeben und auf einem 0,7 %-igen Agarosegel analysiert. Dadurch wurde individuell für jede DNA-Präparation die optimale Restriktionsdauer für einen partiellen Verdau ermittelt; er lag im Durchschnitt bei 4 bis 5 min.

Der präparative Partialverdau erfolgte wie oben beschrieben, jedoch im zehnfachen Ansatz unter Einsatz von 60 µg chromosomaler Actinomyceten-DNA und der zuvor optimierten Enzymmenge für die jeweils individuell bestimmte Dauer. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 x-Stop-Puffer wurde der Ansatz auf einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, der Gelbereich mit DNA der Größe von 3-5 kb ausgeschnitten und dieser über zweistündige Elektroelution in Dialyseschläuchen bei 4°C isoliert. Die mit 1/10 Volumen von 3 M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen

Ethanol gefällte und in einem kleineren Volumen aufgenommene DNA wurde zur weiteren Abtrennung von kleineren Fragmenten einer zweiten Gelelektrophorese mit anschließender Elektroelution und erneuter Aufkonzentrierung unterzogen.

Die Ligation mit dem Plasmidvektor pUC18 erfolgte über Nacht bei 16°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Einsatz von 150 ng mit *Acc I* linearisiertem, nach Herstellerangaben mit CIAP (Alkalische Phosphatase aus Kalbsthymus) dephosphoryliertem pUC18-Vektor und 450 ng partiell gespaltener genomischer DNA, sowie einer angemessenen Ligase-Menge (hier 400 NEB-Units) in 1 x-Ligase-Puffer.

Die Transformation kompetenter *E.coli* DH 12S Zellen (Firma Gibco Life Technologies, Karlsruhe) erfolgte über Elektro-Transformation. Hierfür wurden 1 µl Ligationsansatz und 30 µl Zellen gemischt, in einer Elektroporationsküvette 1 min lang auf Eis inkubiert und im Elektroporator (BTX[®] ECM399, Firma Genetronics Inc., San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben behandelt. Nach sofortiger Überführung in 1 ml SOC-Medium (2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; pH 7,0, eingestellt mit NaOH; autoklaviert; supplementiert mit 10 mM MgSO₄ und MgCl₂ sowie 20 mM D(+)-Glucose) folgte vor der Plattierung eine Erholungsphase von 1 h bei 37°C.

Zur Untersuchung der Qualität der Genbank wurde die Anzahl der insgesamt erzeugten Primärtransformanten und die Anzahl Insert-tragender Klone über Blau/Weiß-Selektion in einer Testplattierung bestimmt. Hierfür wurden je 1 und 10 µl des Ligationsansatzes auf LB-Medium mit Ampicillin, IPTG, X-Gal (wie oben beschrieben) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Bestätigung der tatsächlich klonierten Insertgrößen erfolgte die Isolation der Plasmide von mindestens 10 weißen Kolonien der Testplattierung und ein geeigneter Restriktionsverdau mit nachfolgender gelelektrophoretischer Größenanalyse.

Aktivitäts-Test der Genbanken

Zunächst wurde die Fähigkeit der Genbanken zum Abbau von Stärke ermittelt. Hierfür wurde LB-Agar mit 1 % löslicher Stärke (Firma Merck, Darmstadt, Best.-Nr. #1252) verwendet, auf welcher Klone, die zum Abbau von Stärke befähigt sind, durch Lysehöfe zu identifizieren sind. Dafür war eine zwei- bis vierwöchige Lagerung der Platten bei 4°C bis zur Eintrübung notwendig, wonach ein Abbau der Stärke als Aufklaren der Platten um die Kolonien herum sichtbar war. Ergänzend kam mit Cibacron Brilliant Red[®] 3B-A

(Firma Aldrich, Taufkirchen) markierte lösliche Stärke (ca. 0,6 % w/v) zum Einsatz (Biely, P., Mislovicova, D., Markovic, O., Kalac, V. (1988): „A new chromogenic substrate for assay and detection of alpha-amylase“; *Anal. Biochem.*, Band 172 (1), Seiten 176-179), wobei Stärkeabbau an einer Entfärbung des rötlichen Agars im Bereich des positiven Klonen erkennbar ist. Vor Gebrauch wurden den Platten in beiden Fällen IPTG (100 mM) zur Induktion des Promotors und Ampicillin (100 µg/ml) zur Ausübung des Selektionsdrucks auf die Transformanten zugesetzt.

Entsprechend des Titors der jeweils erzeugten Bank wurde ein definiertes Volumen des Transformationsansatzes mit ca. 10 000 Kolonien je Platte (14 cm Durchmesser) mittels Glaskugeln gleichmäßig ausplattiert (primäre Plattierung). Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten weitere 24 - 48 h bei 28°C zur Amylase-Expression und Freisetzung inkubiert. Dabei war die Inkubation bei 28°C in der Regel für einen sichtbaren Abbau von Stärke unabdingbar. Hierbei mögen eine verbesserte Proteinfaltung und eine Permeabilisierung der äußeren Zellmembran eine Rolle spielen (Stathopoulos, C., Georgiou, G., Earhart, C. F. (1996): „Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'OmpA(46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane“; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Band 45 (1-2), Seiten 112-119). Damit ging also eine Freisetzung der jeweils gebildeten α -Amylase einher, und eine zusätzlich durchzuführende Zell-Lyse zum Nachweis nicht exportierter cytoplasmatischer Amylasen war nicht nötig.

Nach einer Vereinzelung der Kolonien aus den Hofbereichen der primären Plattierung durch erneute (sekundäre) Plattierung auf den gleichen Stärkeplatten konnten Amylase-bildende Einzelkolonien anhand erneuter Hofbildung selektiert werden. Für fotodokumentarische Zwecke hat sich nach Sicherung der Klone eine Färbung der Stärkeplatten mit 50% Lugol-Lösung (Firma Merck) zur eindeutigen Visualisierung von Stärke-freien Bereichen (Abbauhöfen) bewährt.

Figur 7 zeigt eine entsprechend gefärbte, stärkehaltige LB_{Amp}-Agarplatte, auf die jeweils Suspensionen von positiven Klonen der Sekundärplattierung aufgetropft worden sind.

Isolierung einzelner Klone

Die nach Minipräparation (Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland, verwendet nach Herstellerangaben) erhaltene Plasmid-DNA positiver Klone wurde in einer

Restriktionsanalyse mit *Eco* R I oder *Sac* II / *Hind* III auf die Insertgröße hin untersucht und anschließend sequenziert. Hierbei kamen zunächst die Insert-flankierenden M13-Primer (M13 forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; M13 reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') zum Einsatz, um schließlich die Gesamtsequenz über sogenanntes Primer-walking zu erhalten, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist. Das Prinzip dieses Vorgehens besteht darin, daß in einer sich wiederholenden Abfolge ausgehend von ermittelten Sequenzen neue Sequenzierprimer abgeleitet und für die Sequenzierung der sich anschließenden, noch unbekannten Bereiche verwendet werden; aus diesen lassen sich wiederum die nächsten Sequenzierprimer ableiten.

Für die beiden Actinomycetales-Isolate *Streptomyces* sp. B327* und *Streptomyces* sp. B400B (siehe Beispiel 2) sind die auf diese Weise erhaltenen vollständigen DNA- und davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 5 und 6, beziehungsweise SEQ ID NO. 7 und 8 dargestellt.

Figur 5 zeigt ein Alignment der beiden vollständigen α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B 327* und *Streptomyces* sp. B400B mit den nächst-ähnlichen Amylasesequenzen, die aus GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, USA) am 24.1.2001 gefunden werden konnten. Dabei handelt es sich zum einen um die α -Amylase aus *Streptomyces albus*, Accession Number U51129; diese weist zu *Streptomyces* sp. B327* über das gesamte Protein eine Identität von 80% auf. Zum anderen besitzt die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. (GenBank Acc.-No. U8602) zu *Streptomyces* sp. B400B 76,8% Identität über das gesamte Protein.

Beispiel 5

Heterologe Expression von α -Amylasen in prokaryontischen Expressionssystemen

Zur Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der klonierten α -Amylasen sollten diese in größeren Mengen löslich produziert werden. Sie erfolgte für die vollständigen Amylasegene von *Streptomyces* sp. 327*, *Streptomyces* sp. B400B und das Actinomycetales-Isolat *Streptomyces* sp. B327B. Als Expressionswirt wurde *Streptomyces lividans* TK24 eingesetzt; als Expressionsvektor diente pAX5a (Figur 6). Darin steht die Expression unter Kontrolle des konstitutiven *ermE*-Promotors.

Um die für die Klonierung notwendigen *Spe* I- und *Eco* RI-Schnittstellen einzufügen und um die selteneren und daher möglicherweise schlechter translatierten Startcodons der Amylasegene von B327* (GTG) und B400B (TTG) durch ATG zu ersetzen, erfolgte eine PCR mit entsprechend modifizierten Primern. So wurden beispielsweise zur Klonierung der vollständigen α -Amylase aus *Streptomyces* sp. 327* der forward-Primer: 5' aaaactagt**AAGGAGA**ACCCCCACaTGATATCGAG 3' und der reverse-Primer: 5' gaattcgccctt**TCAGCAGTTGGCCTTGCCCG** 3' verwendet. Neue, nicht komplementäre Nukleotide sind hier in Kleinbuchstaben wiedergegeben. Im forward-Primer sind die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Spe* I und das Start-Codon unterstrichen; die Shine-Dalgarno-Sequenz ist darin fett hervorgehoben. Im reverse-Primer ist die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Eco* RI unterstrichen und das Stop-Codon (in umgekehrter Orientierung) fett hervorgehoben. Als Matrize dienten die aus den Genbanken isolierten genomischen Klone.

Nach einer Zwischenklonierung der mit *Pfx* Platinum Polymerase erzeugten PCR-Produkte in dem Vektor pCR Blunt II TOPO (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande) erfolgte die gerichtete Insertion in den Streptomyceten-Expressionsvektor pAX5a unter Verwendung der *Spe* I- und *Eco* RI-Restriktionsschnittstellen. Anschließend erfolgte die Protoplastentransformation von *S. lividans* TK 24 nach Kieser et al. (Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000): „PEG-assisted transformation of *Streptomyces* protoplasts with plasmid DNA. Rapid small-scale procedure.“ in: „Practical *Streptomyces* Genetics“, The John Innes Foundation (Herausgeber), Crows, Norwich, England) und eine Ausplattierung der Transformanten auf dem selektivem Regenerationsmedium R2YE. Dieses besteht aus: 103 g Sucrose, 0,25 g K_2SO_4 , 0,12 g $MgCl_2 \times 6H_2O$, 10 g Glucose, 100 mg Difco Casaminoacids (Firma Difco, Heidelberg), 10 ml 0,5%ige (w/v) KH_2PO_4 -Lösung, 80 ml 3,68%ige (w/v) $CaCl_2$ -Lösung, 1,5 ml L-Prolin, 100 ml TES-Puffer (pH 7,2; 2-[[Tris(hydroxymethyl)methyl]amino]-ethansulfonsäure), 0,2 ml Spurenelementelösung (40 mg/l $ZnCl_2$, 200 mg/l $FeCl_3 \times 6 H_2O$, 10 mg/l $CuCl_2 \times 2 H_2O$, 10 mg/l $MnCl_2 \times 2 H_2O$, 10 mg/l $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$, 10 mg/l $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$) und 5 ml 10%iges (w/v) Difco-Hefeextrakt (Firma Difco, Heidelberg), auf 1 l H_2O) mit 75 μ g/ml Thiostrepton als Selektivantibiotikum.

Nach Umplattierung auf NBSA-Indikatorplatten (8 g/l Nutrient Broth Difco, 15 g/l Agar Serva, 1,5% (w/v) lösliche Stärke Merck #1252, pH 8,0; Hersteller: Firma Difco,

Heidelberg; Firma Serva, Heidelberg; Firma Merck, Darmstadt) und Identifizierung Amylase-positiver Klone, welche anhand der entstehenden Stärkeabbauhöfe erkannt werden konnten, erfolgte eine Anzucht in Flüssigkultur zur Gewinnung enzymatisch aktiver Überstände. Hierzu wurde eine 5-ml-Vorkultur für 16 h und in Folge eine 50-ml-Hauptkultur in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Verwendung von GYM-Medium (4 g/l Glucose, 4 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Malzextrakt, 2 g/l CaCO_3) mit 75 $\mu\text{g/ml}$ Thiostrepton für 4 Tage kultiviert. Der Amylase-haltige Kulturüberstand wurde durch Abtrennung der Zellmasse durch Zentrifugation für 15 min bei 2500 g und anschließender Filtration (0,45 μm) gewonnen und direkt der Vermessung zugeführt oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Beispiel 6

Charakterisierung der amyolytischen Aktivität von Vertretern der α -Amylasen

Der grundsätzliche Nachweis der amyolytischen Aktivität der beiden erfindungsgemäßen α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B327* und B400B ist bereits in Beispiel 4 beschrieben worden. Hier werden die enzymatischen Eigenschaften von gemäß Beispiel 5 heterolog hergestellten Enzymen detaillierter untersucht.

Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften

Im Hinblick auf die vielfältigen Anwendungsgebiete von α -Amylasen erfolgt die Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften, welche die Grundlage zur anwendungsbezogenen Auswahl von Enzymen sein kann. Die Darstellung der Enzyme kann hierbei durch Klonierung und heterologe Expression der Gensequenzen entsprechend den Beispielen 4 und 5 und dem oben gezeigten Vorgehen erfolgen.

Die amyolytische Aktivität wurde mittels des Dinitrosalicylsäure-Tests (DNSS-Test) bestimmt. Dabei wird die Hydrolyse eines komplexen Stärke-Substrates anhand der Zunahme reduzierender Enden des Polysaccharides bestimmt, wobei die Absorption bei 540 nm an umgesetztem DNSS-Reagenz als Maß für die hydrolytische Aktivität dient.

Für den Test wurden in einer 96-Well-Platte für PCR-Thermocycler (0,2 ml "thin-wall plate" #3416, MBP (Molecular BioProducts, San Diego, USA) in die Proben- und Blank-Kavitäten jeweils 25 μl Substratlösung (1% lösliche Stärke Merck p.a. in 180 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 8,6, beziehungsweise in 180 mM des entsprechenden Test-Puffers)

vorgelegt und 5 min bei 50°C, beziehungsweise der jeweiligen Test-Temperatur in einem Thermocycler-Block vorinkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Enzymlösung je Well erfolgte die Substratumsetzung für 15 min bei 50°C, beziehungsweise der jeweiligen Test-Temperatur. Nach Zugabe von 65 µl DNSS-Reagenz (8,8 g Dinitrosalicylsäure, 250 g Kalium-Natrium-Tartrat, 6,3 g Natriumdisulfit, 334 ml 4,5% (w/v) NaOH, 915 ml H₂O) in die Proben- und Blank-Kavitäten sowie der Zugabe von 20 µl Enzymlösung in die Blank-Kavitäten wurde die Testplatte sofort in einen auf 100°C vorgewärmten Thermoblock transferiert und 20 min bei 100°C inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte durch Überführen von je 60 µl des Testansatzes in 200 µl H₂O, welche in einer 96-Well-Meßplatte (PS-Microplate, 96 Well #655101, Greiner) vorgelegt worden waren, und anschließender Bestimmung der Absorption bei 540 nm mittels Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (Spectramax 190, Firma Molecular Devices, Sunnivale, USA) mit H₂O als Referenz. Es wurden jeweils drei Messungen vorgenommen; die Auswertung erfolgte durch Subtraktion des Mittelwertes der 3 Blank-Kavitäten vom Mittelwert der 3 Proben-Kavitäten.

Temperaturstabilität und Temperaturprofil

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität erfolgte eine Vorinkubation der Lösungen rekombinant erhaltener α -Amylasen für 15 min bei verschiedenen Temperaturen und der anschließenden Bestimmung der Restaktivität gemäß der oben beschriebenen Vorgehensweise bei 50°C und 100 mM Tris-Maleat, pH 8,6. Für die α -Amylase aus *Streptomyces sp.* B327B ergab sich eine maximale Stabilität bei 45°C, doch war der Effekt erhöhter Temperaturen bis 61°C mit Restaktivitäten von mehr als 80% relativ moderat. Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt, wobei der optimale Wert von 45°C auf 100% gesetzt worden ist.

Tabelle 6: Temperaturstabilität der α -Amylase aus *Streptomyces sp.* B327*

Temperatur der Vorinkubation [°C]	Restaktivität relativ zu der von 45°C [%]
45	100
50,4	94
55,8	86
61	84
64,7	46

Zur Bestimmung des Temperaturprofils erfolgte die Umsetzung gemäß der oben beschriebenen Vorgehensweise bei verschiedenen Temperaturen und 100 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 8,6. Für die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* ergab sich eine maximale Aktivität bei 41,3°C. Höhere Temperaturen führten bei diesem Enzym zu deutlichen Aktivitätsverlusten (siehe Tabelle 7). Demgegenüber war die Aktivität der Amylase aus *Streptomyces* sp. B327B über den getesteten Temperaturbereich relativ konstant (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7: Temperaturprofil der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327*

Temperatur [°C]	Aktivität relativ zu der von 41,3°C [%]
40	87
41,3	100
50,7	38
56	38
59,8	35

Tabelle 8: Temperaturprofil der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327B.

Temperatur [°C]	Aktivität relativ zu der von 41,3°C [%]
40	103
41,3	100
50,7	117
56	92
59,8	83

Man erkennt, daß die α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327B über einen breiteren Temperaturbereich und bis zu höheren Temperaturen stabiler ist als die aus *Streptomyces* sp. B327*. Die mit der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellten

amylolytischen Enzyme zeichnen sich hinsichtlich ihrer Temperatur-Sensitivität also über eine beachtliche Variabilität aus.

Stabilität gegenüber pH-Wert-Schwankungen

Zur Bestimmung der Aktivität der α -Amylase-Amylasen unter verschiedenen pH-Wert-Bedingungen wurde die Stärke-Substratlösung im pH-Bereich von 6,0 bis 8,6 mit dem entsprechend eingestellten 180 mM Tris-Maleat-Puffer angesetzt; für pH 8,6 und den darüber liegenden pH-Bereich wurde sie mit 180 mM Glycin-NaOH-Puffer angesetzt. Nach Verdünnung der Substratlösung ergaben sich unter Testbedingungen die gewünschten pH-Werte und Pufferkonzentrationen von 100 mM Tris-Maleat-, beziehungsweise 100 mM Glycin-NaOH-Puffer. Durch Messung bei pH 8,6 in beiden Puffersystemen konnten Einflüsse des Puffersystems ausgeglichen werden. Die Bestimmung der amylolytischen Aktivität unter den jeweiligen pH-Werten erfolgte wie oben angegeben bei 50°C. Die erhaltenen Ergebnisse sind in folgender Tabelle 9 zusammengestellt. Die Aktivitäten bei pH 6,5 der beiden α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B327* und B327 wurden jeweils auf 100% gesetzt; die jeweils nachfolgenden Werte sind auf diese bezogen.

Tabelle 9: Amylolytische Aktivität der α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B327* und dem Actinomycetales-Isolat *Streptomyces* sp. B327B bei alkalischen pH-Werten.

pH-Wert der Vorinkubation	Relative Aktivität der α -Amylase aus <i>St. sp.</i> B327* [%]	Relative Aktivität der α -Amylase aus <i>St. sp.</i> B327B [%]
6,5	100	100
8,6	38	129
10	21	84
12	13	43

Gegenüber der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* ist die aus *Streptomyces* sp. B327 in einem stärker alkalischen Medium stabiler und weist auch bis zu sehr hohen pH-Werten eine höhere Stabilität, beziehungsweise höhere amylolytische Aktivität auf.

Stabilität gegenüber Tensiden

Zur Bestimmung der Stabilität gegenüber Tensiden wurden zwei Aktivitäts-Meßreihen vorgenommen. In der ersten wurde die α -Amylase wie oben beschrieben mit einer Stärke-Substratlösung mit 0,018 % (w/v) Natriumdocecylsulfat (SDS) vorinkubiert, so daß sich nach Verdünnung eine Konzentration von 0,01% SDS im Testansatz ergab. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wiederum bei 50°C und 100 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 8,6. Setzt man diese Werte jeweils auf 100%, so weisen beide untersuchten α -Amylasen in Abwesenheit von SDS geringere Aktivitäten auf: die der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* verfügt ohne SDS über eine Aktivität von 94,2% und die aus *Streptomyces* sp. B327B über eine von 89%. Dies zeigt, daß beide stichprobenartig ausgewählten Vertreter der neuen Gruppe von α -Amylasen eine ausreichende Stabilität in Anwesenheit einer für viele Anwendungen typischen Tensidkonzentration besitzen.

Zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität in Anwesenheit von potentiell stabilisierenden zweiwertigen Ionen, beziehungsweise in Anwesenheit von Komplexbildnern wurden stichprobenartig ausgewählte Enzyme mit 3,6 mM CaCl_2 -haltiger Stärke-Substratlösung (1% Stärke) inkubiert oder mit einer 1,8 mM EDTA enthaltenden Stärke-Substratlösung, so daß sich im wie oben beschrieben durchgeführten Test Endkonzentrationen von 2 mM Ca^{2+} , beziehungsweise 1 mM EDTA ergaben. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte wiederum bei 50°C und 100 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 8,6.

Setzt man die Aktivitäten beider Enzyme bei 2 mM CaCl_2 jeweils auf 100%, so sank die Aktivität der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327* in Anwesenheit von 1 mM EDTA auf 91%. Die der α -Amylase aus *Streptomyces* sp. B327B sinkt in Anwesenheit von 1 mM EDTA auf 57%. Dies zeigt, daß beide Enzyme in Gegenwart von Tensiden und von Komplexbildnern bemerkenswert hohe Restaktivitäten aufweisen. Allerdings reagieren beide Enzyme deutlich unterschiedlich und divers auf diese Einflüsse, wie die verschiedene Aktivität in Anwesenheit von Komplexbildnern zeigt.

Die Ergebnisse dieses Beispiels zeigen zum einen, daß die gefundenen erfindungsgemäßen Enzyme nicht allein aufgrund ihrer DNA- und Protein-Sequenzen als α -Amylasen anzusehen sind, sondern tatsächlich auch über eine Stärke-spaltende Aktivität verfügen. Die Abweichungen beider untersuchter Enzyme hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Reaktionsbedingungen können als Beleg dafür angesehen werden, daß die vorliegende Erfindung über die grundlegende Übereinstimmung hinaus ein breites Spektrum an amylolytischen Enzymen mit individuellen Unterschieden zur Verfügung stellt.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Position der potentiell konservierten Aminosäuresequenzblöcke („Sequenzanker“ A-E) in α -Amylasen (Glykosylhydrolasen Familie 13, E.C. 3.2.1.1), abgeleitet aus α -Amylase-Sequenzen von Actinomycetales, und die relative Lage der erfindungswesentlichen in Tabelle 3 zusammengestellten und im Sequenzprotokoll angegebenen PCR-Primer (Beispiel 1).
Beispielhaft dargestellt sind die 567 Aminosäuren, beziehungsweise 1701 bp umfassenden Aminosäure-, beziehungsweise DNA-Sequenzen der α -Amylase aus *Streptomyces griseus* (GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), Accession-Number X57568) mit den konservierten Domänen A bis E, die sich über folgende Aminosäure-Positionen erstrecken: A: 58-91, B: 94-141, C: 155-207, D: 295-345, E: 392-427.

Figur 2: Größenanalyse der Reaktionsprodukte der erfindungsgemäßen PCR der Primerkombinationen GEX024 / GEX026 (**Figur 2 A**) und GEX29 / GEX031 (**Figur 2 B**) an Streptomyceten-DNA (Beispiel 1).

Als Matrize dienten hier Präparationen genomischer DNA von folgenden 20 zufällig ausgewählten *Streptomyces sp.*-Stämmen:

1: B101A, 2: B114C, 3: B134, 4: B135A, 5: B138A, 6: B152A, 7: B153B, 8: B161A, 9: B156B1, 10: B157C, 11: B158A, 12: B160B, 13: B161A, 14: B373, 15: B375, 16: B380, 17: B390, 18: B392A, 19: B392A, 20: B394.

Die Reaktionsprodukte (1/10 des Reaktionsvolumens) wurden jeweils in einem 2,5%igen Agarosegel aufgetrennt; beide teilweise vorhandenen Produkte von ca. 300 bp und ca. 500 bp Größe wurden über Sequenzierung als Amylase-Sequenzen identifiziert.

Marker (M): 100 bp DNA Leiter (in bp von oben nach unten: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100).

Figur 3: Consensus-Sequenz von α -Amylasen aus 231 Stämmen der Gattung *Streptomyces* (SEQ ID NO. 2, 4 und 34 bis 262) mit entsprechenden Varianten für jede Position (Beispiel 3).

Der Consensus-Sequenz liegt ein Alignment mit dem Programm Clustal X®, Version 1.64b zugrunde (Standardeinstellungen; beschrieben in: Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994), „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice“, *Nucleic Acids Res.*, Band 22, Seiten 4673-4680). Die Aminosäurepositionen 1-7 und 94-100 sind durch die PCR-Primersequenzen (GEX024/GEX026 und GEX029/031) abhängig von der Selektivität der durchgeführten PCR weitgehend vorgegeben.

Es handelt sich um eine alternative Darstellung der in SEQ ID NO. 263 angegebenen Consensus-Sequenz.

Figur 4: Schematische Darstellung des für die Expressions-Genbanken verwendeten Plasmidvektors pUC18 (GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), Accession-Number L08752; Beispiel 4).

Der Vektor wurde jeweils mit dem Restriktionsenzym *AccI* linearisiert, um *AccI*-fragmentierte, genomische Streptomyces-DNA aufzunehmen.

ORI: Replikationsursprung; *lacI*: Gen für den *lac*-Repressor; *lacZ*-alpha: Gen für das α -Peptid der β -Galactosidase; Ampicillin^R: Das Ampicillin-Resistenzgen der β -Lactamase.

Figur 5: Alignment der beiden vollständigen, erfindungsgemäßen α -Amylasen aus *Streptomyces sp.* B 327* und *Streptomyces sp.* B400B mit den nächstähnlichen, am 24.1.2001 in GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) gefundenen Sequenzen von α -Amylasen (Beispiel 4).

Es handelt sich dabei um die α -Amylase aus *Streptomyces albus* (U51129), die über die Länge des vollständigen Proteins zu der Aminosäuresequenz der α -Amylase aus B327* eine Identität von 80% aufweist, und um die α -Amylase aus *Streptomyces sp.* (U08602), die zu der aus *Streptomyces sp.* B400B einen entsprechenden Identitätswert von 76,8% besitzt (vergleiche Tabellen 2 und 3).

Figur 6: Der für die Expression von Amylasen in *Streptomyces lividans* TK 24 verwendete Plasmid-Vektor pAX5a (Beispiel 5).

Darin bedeuten:

pUC19 ori: Replikationsursprung in *E. coli*; Ampicillin^R, Ampicillinresistenzgen (beta-Lactamase); Thiostrepton^R, Thiostreptonresistenzgen; pIJ101, Replicon Replikationsursprung in *Streptomyces*; *ermE*, *ermE*-up-Promotor von *S. erythraea* (beschrieben in: Faß S.H., Engels, J.W. 1996, „Influence of Specific Signal Peptide Mutations on the Expression and Secretion of the alpha-Amylase Inhibitor Tendamistat in *Streptomyces lividans*“, *J. Biol. Chem.*, Band 271 (Nummer 25), Seiten 15244-15252). Unter Ersatz der Tendamistatsequenz können zu klonierende Gene über *SpeI*- (5'-Ende) und *EcoRI*- (3'-Ende) Erkennungsstellen in pAX5a inseriert und darin, ausgehend vom konstitutiven *ermE*-Promotor exprimiert werden.

Figur 7: Nachweis der amylytischen Aktivität der erfindungsgemäßen α -Amylasen aus *Streptomyces* sp. B 327* und *Streptomyces* sp. B400B nach deren heterologer Expression in *Escherichia coli*.

Nach heterologer Expression der entsprechenden Gensequenzen in *Escherichia coli* (Beispiel 4), dem Aufbringen der transformierten Wirtszellen auf LB_{Amp}-Agarplatten mit 1% löslicher Stärke und anschließender Färbung der Platten mittels Lugolscher Lösung sind an den Abbauhöfen die Kolonien zu erkennen, deren Zellen die eingeschleusten Gensequenzen exprimieren.

Für diese Abbildung wurden Proben von aus den Transformationsansätzen durch Vereinzelung von abgeleiteten Klonen aufgetragen:

1. Positiv-Kontrolle: Expressionsstamm mit der α -Amylase aus *Streptomyces griseus* in pUC18);
2. Negativ-Kontrolle (pUC18 ohne Insert-DNA);
3. Probe eines Amylase-positiven Klons, der genomische DNA aus *Streptomyces* sp. B400B enthält;
4. und 5. Proben zweier aus derselben Transformation erhaltener genomischer Klone aus *Streptomyces* sp. B327*;
6. bis 8. Proben dreier aus derselben Transformation erhaltener genomischer Klone aus *Streptomyces* sp. B327;
9. bis 12. Proben von vier aus derselben Transformation erhaltenen genomischen Klonen aus *Streptomyces griseus*.

Patentansprüche

1. Amylolytisches Protein, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% beschrieben wird, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht.
2. Amylolytisches Protein, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 34 bis SEQ ID NO. 262 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.
3. Amylolytisches Protein, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 45, 83, 97, 98, 101, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 116, 232, 234, 236, 238, 239 und 241 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% identisch ist oder in jeder homologen Position unmittelbar auf eine dieser Sequenzen zurückgeführt werden kann, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.
4. Amylolytisches Protein, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 2, 4 und 208 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 95%, bevorzugt zu 97,5%, besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.
5. Amylolytisches Protein, dessen Aminosäuresequenz in jeder einzelnen homologen Position auf eine der beiden Sequenzen SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 8 durch einen konservierten Austausch, vorzugsweise unmittelbar zurückgeführt werden kann.

6. Amylolytisches Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 85% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 31 bis 461.
7. Amylolytisches Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 95% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 31 bis 461, besonders bevorzugt in den Positionen 210 bis 300.
8. Amylolytisches Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 31 bis 461, besonders bevorzugt in den Positionen 210 bis 300.
9. Amylolytisches Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 80% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 30 bis 448, besonders bevorzugt in den Positionen 200 bis 296.
10. Amylolytisches Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 90% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 30 bis 448, besonders bevorzugt in den Positionen 200 bis 296.
11. Amylolytisches Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID NO. 8 angegebenen Aminosäuresequenz identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 30 bis 44, besonders bevorzugt in den Positionen 200 bis 296.
12. Fragment eines amylytischen Proteins oder amylytisches, durch Deletionsmutation erhältliches Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Amylolytisches, durch Insertionsmutation erhältliches oder amylytisches chimäres Protein, welches wenigstens in einem eine amylytische Aktivität verleihenden Teil aus einem Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 12 besteht, besonders aus einem maturen Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 12, ganz besonders aus einem Teil, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der SEQ ID NO. 263 entspricht.

14. Amylytisches Derivat eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. Amylytisches Protein oder Derivat, das wenigstens eine antigene Determinante mit einem der in den Ansprüchen 1 bis 14 genannten Proteine oder Derivate gemeinsam hat.
16. Amylytisches Protein oder Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet, daß** es aus einem natürlichen Organismus, insbesondere aus einem Mikroorganismus erhältlich ist.
17. Amylytisches Protein oder Derivat gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei dem Mikroorganismus um ein gram-positives Bakterium handelt.
18. Amylytisches Protein oder Derivat gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei dem gram-positiven Bakterium um eines der Ordnung Actinomycetales handelt.
19. Amylytisches Protein oder Derivat gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um eine *Streptomyces*-Spezies handelt.
20. Amylytisches Protein oder Derivat gemäß Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um *Streptomyces* sp. B327* oder um *Streptomyces* sp. B400B handelt.
21. Nukleinsäure, die für ein amylytisches Protein codiert, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% beschrieben wird, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 entspricht.
22. Nukleinsäure, die für ein amylytisches Protein codiert, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 34 bis SEQ ID NO. 262 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders

bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

23. Nukleinsäure, die für ein amylolytisches Protein codiert, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 45, 83, 97, 98, 101, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 116, 232, 234, 236, 238, 239 und 241 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 98%, bevorzugt zu 99%, besonders bevorzugt zu 100% identisch ist oder in jeder homologen Position unmittelbar auf eine dieser Sequenzen zurückgeführt werden kann, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht.

24. Nukleinsäure, die für ein amylolytisches Protein codiert, dessen Aminosäuresequenz einen Teil enthält, der mit einer der in SEQ ID NO. 2, 4 und 208 angegebenen Aminosäuresequenzen zu 95%, bevorzugt zu 97,5%, besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 8 bis 93 gemäß der Consensus-Sequenz von SEQ ID NO. 263 entspricht, ganz besonders bevorzugt eine Nukleinsäure mit einer in SEQ ID NO. 1 oder 3 angegebenen Nukleotidsequenz.

25. Nukleinsäure, die für ein amylolytisches Protein codiert, dessen Aminosäuresequenz in jeder einzelnen homologen Position auf eine der beiden Sequenzen SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 8 durch einen konservierten Aminosäure-Austausch, vorzugsweise unmittelbar zurückgeführt werden kann.

26. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 5 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 85% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 91 bis 1383, besonders bevorzugt in den Positionen 628 bis 900.

27. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 5 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 92,5% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 91 bis 1383, besonders bevorzugt in den Positionen 628 bis 900.

28. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 5 angegebenen Nukleotidsequenz identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 91 bis 1383, besonders bevorzugt in den Positionen 628 bis 900.
29. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 85% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 88 bis 1374, besonders bevorzugt in den Positionen 598 bis 888.
30. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleotidsequenz mindestens zu 90% identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 88 bis 1374, besonders bevorzugt in den Positionen 598 bis 888.
31. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, deren Sequenz mit der in SEQ ID NO. 7 angegebenen Nukleotidsequenz identisch ist, vorzugsweise in den Positionen 88 bis 1374, besonders bevorzugt in den Positionen 598 bis 888.
32. Für eines der in den Ansprüchen 12 bis 15 bezeichneten amylolytischen Proteine oder Fragmente codierende Nukleinsäure.
33. Oligonukleotid mit einer der in SEQ ID NO. 9 bis 33 angegebenen Sequenzen, insbesondere mit einer der in SEQ ID NO. 9 bis 12 angegebenen Sequenzen.
34. Für ein amylolytisches Protein codierende Nukleinsäure, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie in einem der in den Ansprüchen 16 bis 20 bezeichneten Organismen natürlicherweise enthalten ist und vorzugsweise von diesem natürlicherweise zur Proteinsynthese genutzt wird.
35. Natürlicher Organismus, der für eines der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 263, vorzugsweise unter SEQ ID NO. 34 bis 262, besonders bevorzugt unter SEQ ID NO. 2, 4, 6 oder 8 bezeichneten Proteine oder Proteinfragmente codierende Nukleinsäuren enthält.

36. Organismus nach Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Mikroorganismus ist, vorzugsweise ein Bakterium, besonders bevorzugt ein gram-positives Bakterium.
37. Organismus nach Anspruch 36, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei dem gram-positiven Bakterium um eines der Ordnung Actinomycetales, insbesondere um eines der Gattung Streptomyces handelt.
38. Organismus nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei den Mitgliedern der Gattung Streptomyces um *Streptomyces sp. 327** oder *Streptomyces sp. B400B*, insbesondere um einen der beiden Stämme DSM 13990 und DSM 13991 handelt.
39. PCR-basiertes Verfahren zur Identifizierung und/oder Gewinnung neuer Amylasen aus einer Sammlung von Organismen oder Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet, daß** PCR-Primer verwendet werden, die jeweils eine variable 3'-Region aufweisen und eine 5'-Region mit hoher Homologie zu Bereichen aus bekannten Amylasen.
40. Verfahren nach Anspruch 39, **dadurch gekennzeichnet, daß** die erhaltenen Gene oder Genfragmente sequenziert werden.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, **dadurch gekennzeichnet, daß** von den erhaltenen Genen oder Genfragmenten Peptide abgeleitet werden, die über ein immunchemisches Verfahren auf ein Epitop von einer bekannten Amylase, vorzugsweise einem Protein oder Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 getestet werden.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 41, **dadurch gekennzeichnet, daß** von den erhaltenen Genen oder Genfragmenten Peptide abgeleitet werden, die auf einen Beitrag zu einer amylytischen Aktivität, vorzugsweise auf vollständig von diesen Peptiden ausgeübte amylytische Aktivität getestet werden.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 42, **dadurch gekennzeichnet, daß** die 3'-Region mindestens eines PCR-Primers hochvariabel ist und/oder die 5'-Region

mindestens eines PCR-Primers mit einem Bereich aus einer bekannten Amylase hochhomolog ist.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 43, **dadurch gekennzeichnet, daß** die 5'-Region mindestens eines PCR-Primers aus einem Sequenzbereich abgeleitet ist, der einer konservierten Amylasedomäne entspricht, vorzugsweise eines Bereichs, der den Aminosäurepositionen (A) 58-91, (B) 94-141, (C) 155-207, (D) 295-345 oder (E) 392-427 der α -Amylase aus *Streptomyces griseus*, besonders bevorzugt einer der Domänen β 4 oder β 7 der $(\alpha\beta)_8$ -Barrelstruktur entspricht.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 44, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein, vorzugsweise zwei PCR-Primer eingesetzt werden, die sich aus einer der Aminosäuresequenzen eines Proteins oder Fragments gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 ableiten lassen.

46. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 45, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein, vorzugsweise zwei PCR-Primer eingesetzt werden, die sich aus einer der Nukleotidsequenzen gemäß einem der Ansprüche 21 bis 34 unmittelbar ergeben.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 46, **dadurch gekennzeichnet, daß** mindestens ein Primer eine der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 9 bis 33, insbesondere eine der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 9 bis 12 angegebenen Sequenzen enthält.

48. Verfahren nach Anspruch 47, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Primer in der Kombination SEQ ID NO. 9 mit SEQ ID NO. 10 oder SEQ ID NO. 11 mit SEQ ID NO. 12 eingesetzt werden.

49. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 48, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei der eingesetzten Matrizen-DNA um isolierte Nukleinsäuren von Organismen, Zellkulturen, Isolaten oder kultivierten Einzelstämmen handelt, oder um isolierte Nukleinsäuren von einer Summe von Organismen, Zellkulturen, Isolaten, kultivierten Einzelstämmen oder isolierten Nukleinsäuren.

50. Verfahren nach Anspruch 49, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei der eingesetzten Matrizen-DNA um isolierte Nukleinsäuren von Mikroorganismen, vorzugsweise von Bakterien und besonders bevorzugt von gram-positiven Bakterien handelt.

51. Verfahren nach einem der Ansprüche 49 oder 50, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um Mitglieder der Ordnung Actinomycetales, insbesondere um solche der Gattung *Streptomyces* handelt.

52. Verfahren nach einem der Ansprüche 49 bis 51, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei den Mitgliedern der Gattung *Streptomyces* um *Streptomyces sp.* 327* oder *Streptomyces sp.* B400B, insbesondere um einen der beiden Stämme DSM 13990 und DSM 13991 handelt.

53. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 52, **dadurch gekennzeichnet, daß** die erhaltenen Gene oder Genfragmente in eine Expressionsgenbank eingebracht werden, die anschließend auf amylytische Proteine oder Fragmente amylytischer Proteine getestet wird, vorzugsweise durch Hybridisierung von Nukleinsäuren, durch ein immunchemisches Verfahren oder über einen Aktivitätstest.

54. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 53, **dadurch gekennzeichnet, daß** die isolierte DNA in einen Expressionsvektor eingebracht wird, welcher Transkriptions- und Translationskontrollelemente und optional ein oder mehrere Fragmente eines Amylase-Gens bereitstellt, so daß sich im positiven Falle insgesamt eine Amylase-Aktivität ergibt.

55. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 54, **dadurch gekennzeichnet, daß** der Aktivitätstest aus folgenden Schritten besteht:

- (a) Durchmustern einer Genbank, vorzugsweise einer mit vollständigen Genen, mithilfe des erhaltenen PCR-Fragments oder einer hiervon abgeleiteten Sonde,
- (b) Expression der auf diese Weise identifizierten Gene oder Genfragmente und
- (c) Messung des Beitrags zu einer amylytischen Aktivität der durch diese Expression erhaltenen Proteine oder Proteinfragmente.

56. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 55, **dadurch gekennzeichnet, daß** die nach der PCR erhaltenen Nukleinsäuren oder die vollständigen Gene vor dem Aktivitätstest in Klonierungsvektoren eingebracht und in Wirtszellen transformiert werden.
57. Verfahren nach Anspruch 56, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich bei den Wirtszellen um Stämme der Gattungen Escherichia oder Streptomyces oder Bacillus handelt.
58. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 57, das an so vielen verschiedenen PCR-Matrizen durchgeführt oder wiederholt wird, daß mindestens zwei verschiedene Aminosäure-Sequenzen mit einer gemeinsamen Consensus-Sequenz erhalten werden, insbesondere über einzelne Domänen, Teilaktivitäten, Strukturelemente oder vollständige Gene und/oder Proteine.
59. Verfahren nach Anspruch 58, **dadurch gekennzeichnet, daß** eine Consensus-Sequenz mit Sequenzidentitäten mindestens zweier enthaltener Sequenzen von mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 40%, besonders bevorzugt mindestens 50% erhalten wird.
60. Verwendung eines Proteins oder Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Identifizierung eines amylolytischen Proteins, vorzugsweise in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 59.
61. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 21 bis 34 zur Identifizierung und/oder Gewinnung einer neuen Amylase, vorzugsweise in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 59.
62. Verwendung eines nach einem Verfahren der Ansprüche 39 bis 59 erhaltenen Proteins zur Fusion oder Verknüpfung mit einem anderen Protein, insbesondere zur Entwicklung eines neuen Enzyms.
63. Verwendung einer nach einem Verfahren der Ansprüche 37 bis 57 erhaltenen Nukleinsäure zur Fusion mit einer anderen Nukleinsäure, insbesondere zur Entwicklung eines neuen Enzyms.

64. Verwendung nach Anspruch 62 oder 63 zur gezielten Fusion, insbesondere unter Ausnutzung hochhomologer Bereiche der Aminosäuresequenzen, gemeinsamer Restriktionsschnittstellen der Nukleinsäuren oder über PCR-basierte Fusion.

65. Verwendung nach Anspruch 62 oder 63 in einem statistischen Rekombinationsverfahren, insbesondere unter Ausnutzung hochhomologer Bereiche der Aminosäuresequenzen, gemeinsamer Restriktionsschnittstellen der Nukleinsäuren oder über PCR-basierte Fusion.

66. Vektor, der einen in den Ansprüchen 21 bis 34 bezeichneten Nukleinsäurebereich enthält.

67. Klonierungsvektor gemäß Anspruch 66.

68. Expressionsvektor gemäß Anspruch 66.

69. Wirtszelle, die eines der in Ansprüchen 1 bis 20 bezeichneten Proteine oder Derivate exprimiert oder zu dessen Expression angeregt werden kann, vorzugsweise unter Einsatz eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 68.

70. Wirtszelle gemäß Anspruch 69, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie ein Bakterium ist, insbesondere eines, das das gebildete Protein oder Derivat ins umgebende Medium sekretiert.

71. Wirtszelle gemäß Anspruch 70, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie ein gram-positives Bakterium ist.

72. Wirtszelle gemäß Anspruch 71, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie der Gattung *Bacillus*, vorzugsweise der Species *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* oder *Bacillus alcalophilus* angehört.

73. Wirtszelle gemäß Anspruch 71, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie der Ordnung Actinomycetales, insbesondere der Gattung *Streptomyces*, vorzugsweise der Species *Streptomyces lividans*, besonders bevorzugt *S. lividans* TK24, oder der Spezies

Streptomyces sp. 327* oder *Streptomyces* sp. B400B angehört, insbesondere einem der beiden Stämme DSM 13990 oder DSM 13991.

74. Wirtszelle gemäß Anspruch 70, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie ein gram-negatives Bakterium ist.

75. Wirtszelle gemäß Anspruch 74, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie der Gattung *Escherichia*, bevorzugt der Spezies *Escherichia coli*, besonders bevorzugt einem der Stämme *E. coli* JM 109, *E. coli* DH 100B oder *E. coli* DH 12S angehört.

76. Wirtszelle gemäß Anspruch 69, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie eine eukaryontische Zelle ist, insbesondere eine, die das gebildete Protein posttranslational modifiziert.

77. Verfahren zur Herstellung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 unter Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 21 bis 34 und/oder unter Verwendung eines Vektors gemäß einem der Ansprüche 66 bis 68 und/oder unter Verwendung einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 69 bis 76 oder unter Verwendung einer Zelle, die dieses natürlicherweise bildet, insbesondere einer gemäß einem der Ansprüche 35 bis 38.

78. Wasch- oder Reinigungsmittel, **dadurch gekennzeichnet, daß** es ein Protein oder Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 enthält.

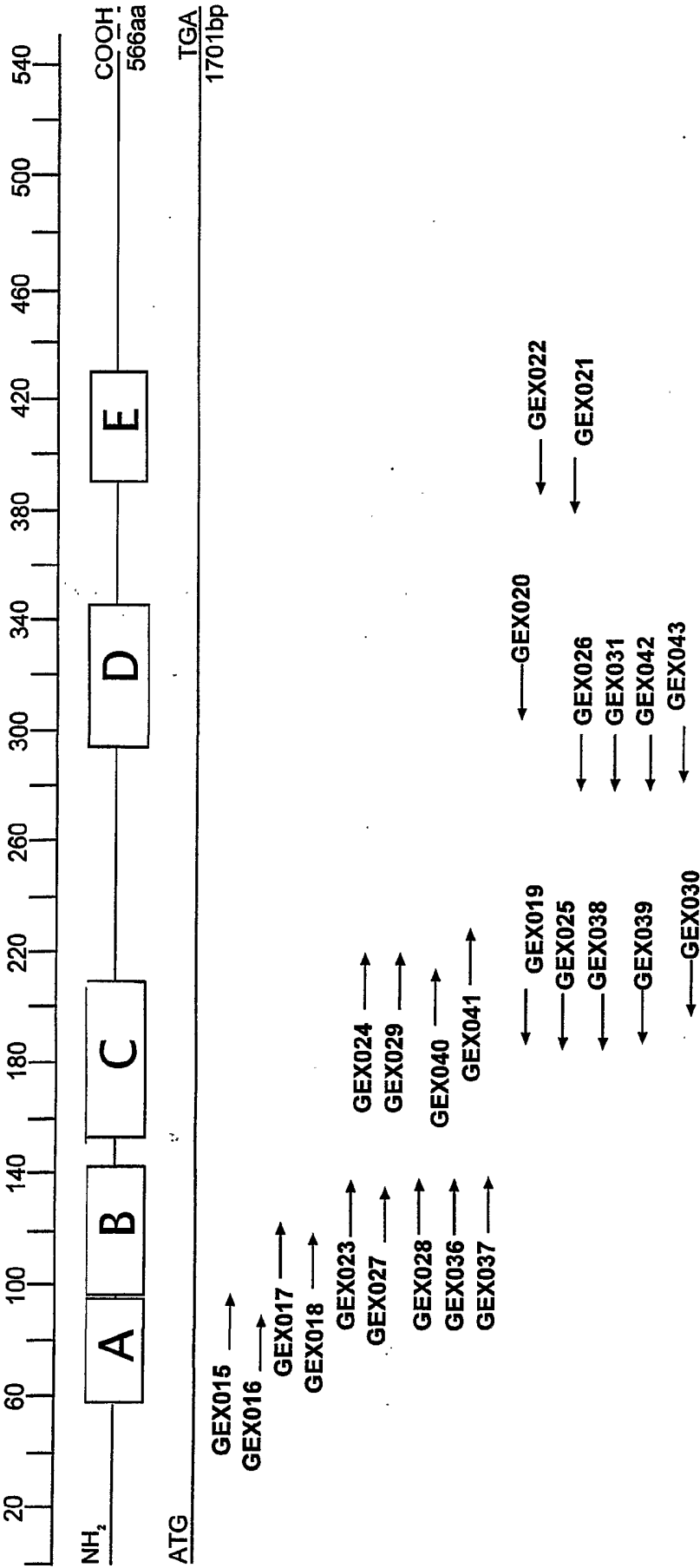
79. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung, insbesondere zum Entschlichten von Baumwolle.

80. Verfahren zur Stärkeverflüssigung, insbesondere zur Ethanolproduktion, **dadurch gekennzeichnet, daß** darin ein Protein oder Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 eingesetzt wird.

81. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Herstellung von linearen und/oder kurzkettigen Oligosacchariden.

82. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Hydrolyse von Cyclodextrinen.
83. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Freisetzung von niedermolekularen Verbindungen aus Polysaccharidträgern oder Cyclodextrinen.
84. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Herstellung von Lebensmitteln und/oder Lebensmittelbestandteilen.
85. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Herstellung von Tierfutter und/oder Tierfutterbestandteilen.
86. Verwendung eines Proteins oder Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 zur Auflösung stärkehaltiger Klebeverbindungen.
87. Temporäres Klebeverfahren, **dadurch gekennzeichnet, daß** darin ein Protein oder Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 eingesetzt wird.

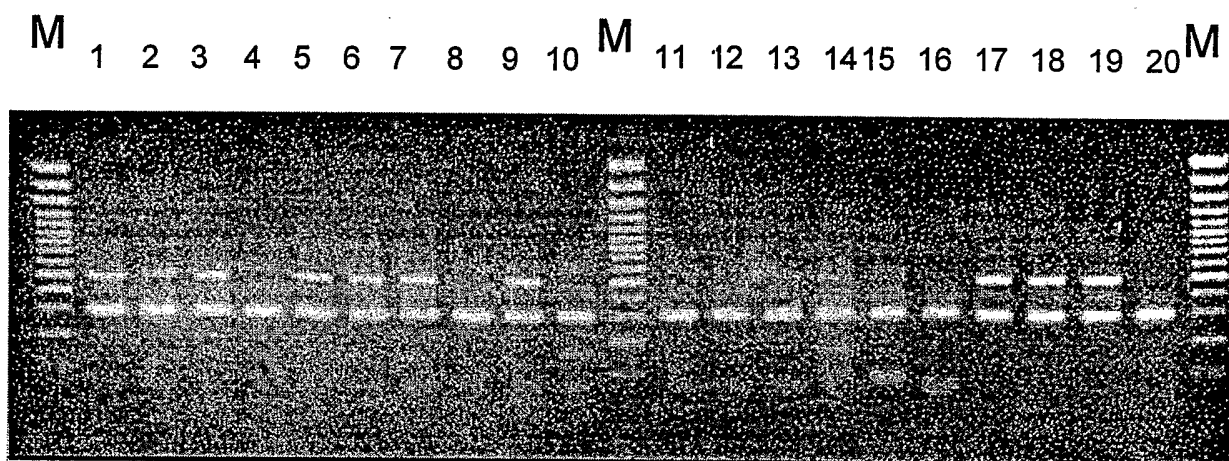
Figur 1



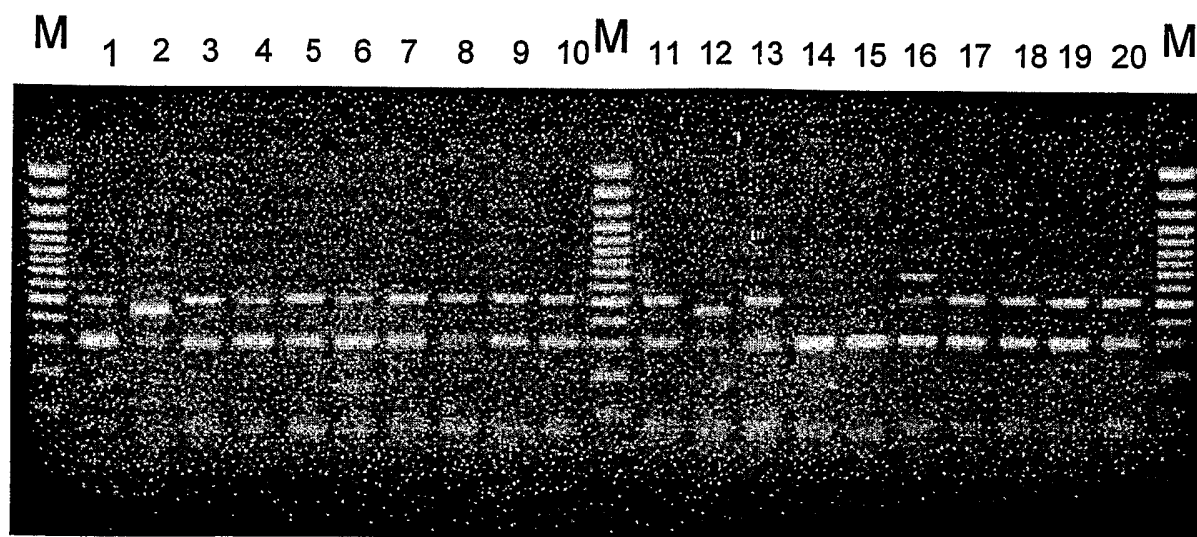
2 / 11

Figur 2

Figur 2 A



Figur 2 B



3 / 11

Figur 3 / Teil 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
V	D	G	F	R	X ₀	D	X ₁	X ₂	X ₃	H	X ₄	X ₅
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
X ₁₉	X ₂₀	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇	X ₂₈	X ₂₉	X ₃₀	X ₃₁
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇	X ₃₈	X ₃₉	X ₄₀	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
X ₄₅	X ₄₆	X ₄₇	X ₄₈	X ₄₉	X ₅₀	X ₅₁	X ₅₂	X ₅₃	X ₅₄	X ₅₅	X ₅₆	X ₅₇
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
X ₅₈	X ₅₉	X ₆₀	X ₆₁	X ₆₂	X ₆₃	X ₆₄	X ₆₅	X ₆₆	L	X ₆₇	X ₆₈	X ₆₉
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
X ₇₀	X ₇₁	X ₇₂	X ₇₃	X ₇₄	X ₇₅	X ₇₆	X ₇₇	X ₇₈	X ₇₉	X ₈₀	X ₈₁	X ₈₂
92	93	94	95	96	97	98	99	100				
X ₈₃	X ₈₄	V	D	N	H	D	T	X ₈₅				

Position	Aminosäure
1	V
2	D
3	G
4	F
5	R
6	X ₀ = I oder L
7	D
8	X ₁ = A oder T oder G
9	X ₂ = A oder S
10	X ₃ = K oder R

Figur 3 / Teil 2

Position	Aminosäure
11	H
12	X ₄ = M oder I
13	X ₅ = S oder P oder D oder A
14	X ₆ = A oder T oder S oder E oder V
15	X ₇ = D oder A oder E oder T oder G oder S
16	X ₈ = D oder G
17	X ₉ = V oder L oder P oder I
18	X ₁₀ = A oder T oder E oder N oder Q
19	X ₁₁ = A oder N oder D oder H oder T oder P
20	X ₁₂ = I oder V
21	X ₁₃ = K oder E oder W oder R oder L
22	X ₁₄ = G oder S oder P oder A oder T
23	X ₁₅ = K oder R
24	X ₁₆ = M oder L oder V oder P
25	X ₁₇ = S oder R oder T oder G oder N oder A oder D oder K oder -
26	X ₁₈ = D oder N oder S oder K oder R
27	X ₁₉ = P oder R oder T oder Q oder G oder V
28	X ₂₀ = G oder D oder S oder N oder TAGGE oder TSGAE oder YPAWGGGK
29	X ₂₁ = V oder A oder T oder P oder -
30	X ₂₂ = F oder Y oder H
31	X ₂₃ = W oder R oder I oder L
32	X ₂₄ = V oder K oder F
33	X ₂₅ = T oder Q oder H oder L oder M
34	X ₂₆ = E oder G
35	X ₂₇ = V oder A oder T
36	X ₂₈ = I oder T oder M oder Y oder N
37	X ₂₉ = H oder Y oder F oder G oder P oder A
38	X ₃₀ = G oder A oder S oder W oder D
39	X ₃₁ = G oder A oder D oder S
40	X ₃₂ = G oder N oder T
41	X ₃₃ = E oder P oder I
42	X ₃₄ = A oder T oder P oder S
43	X ₃₅ = V oder I oder A oder T

5 / 11

Figur 3 / Teil 3

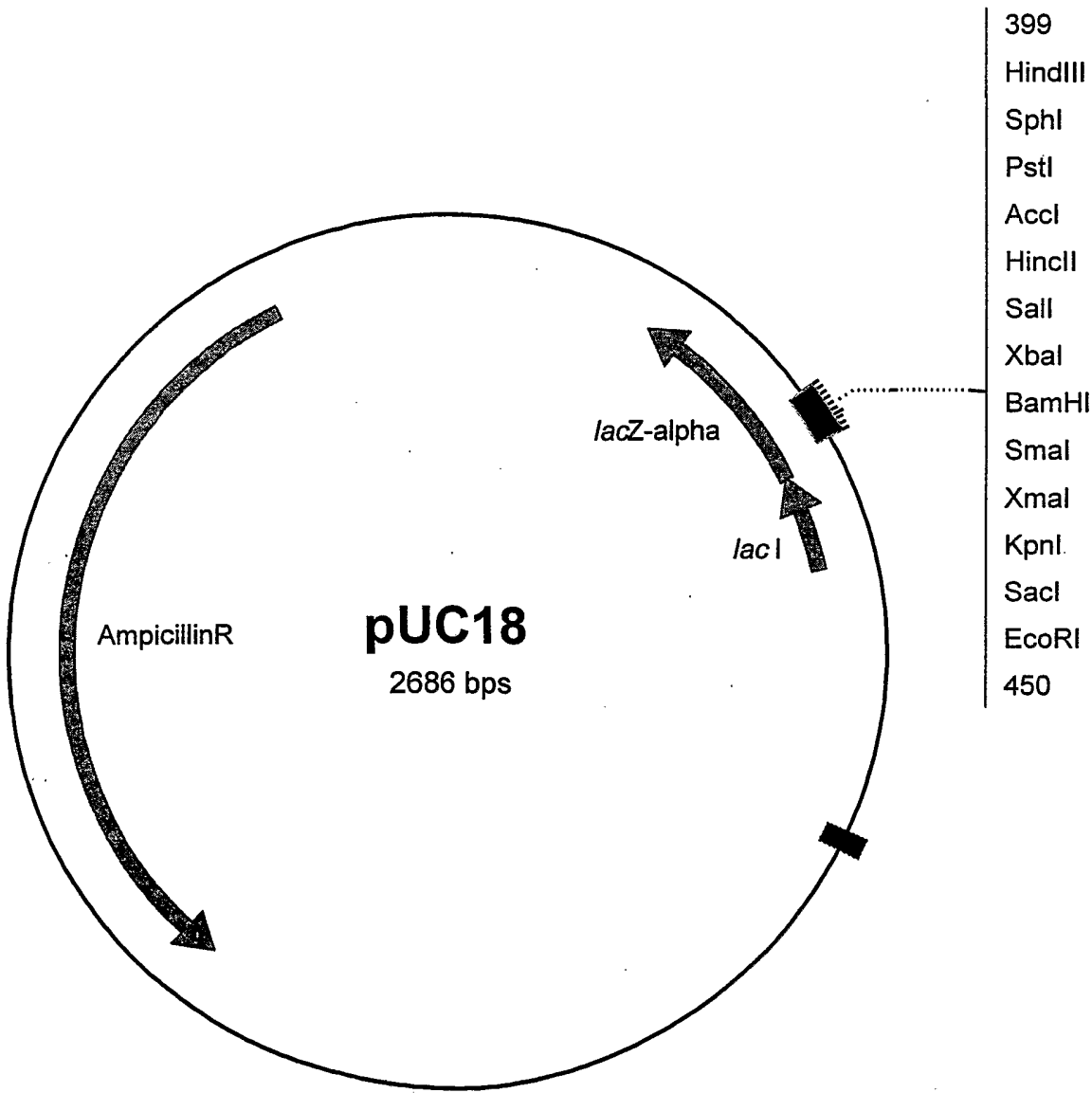
Position	Aminosäure
44	X ₃₆ = Q oder S oder G
45	X ₃₇ = P oder S oder -
46	X ₃₈ = E oder D oder T oder G oder S oder A oder Q oder -
47	X ₃₉ = E oder D oder S
48	X ₄₀ = Y oder H
49	X ₄₁ = T oder L oder Y oder V oder A
50	X ₄₂ = S oder G oder D oder R oder T oder N oder H
51	X ₄₃ = I oder S oder N oder A oder T oder L
52	X ₄₄ = G oder C
53	X ₄₅ = D oder S
54	X ₄₆ = V oder A oder S
55	X ₄₇ = D oder Q oder H oder L oder T
56	X ₄₈ = E oder D
57	X ₄₉ = F oder L oder S
58	X ₅₀ = R oder S oder C oder H oder D oder T oder Q
59	X ₅₁ = Y oder H
60	X ₅₂ = G oder A oder S oder H
61	X ₅₃ = G oder S oder Y oder R oder W oder K
62	X ₅₄ = H oder D oder S oder G oder Q oder R oder K
63	X ₅₅ = L oder V oder I
64	X ₅₆ = K oder S oder A
65	X ₅₇ = S oder R oder Q oder H
66	X ₅₈ = A oder V oder I oder T oder S oder D oder M
67	X ₅₉ = F oder V oder L
68	X ₆₀ = Q oder T oder R oder N oder D oder G oder H oder L oder A
69	X ₆₁ = G oder N oder Q oder R oder S oder D oder -
70	X ₆₂ = G oder E oder -
71	X ₆₃ = G oder N oder R oder H oder S oder K oder D oder Q
72	X ₆₄ = L oder P oder I oder V
73	X ₆₅ = P oder A oder T oder S oder K
74	X ₆₆ = G oder Q oder Y oder H oder E oder D oder N
75	L
76	X ₆₇ = R oder N oder S oder E oder T
77	X ₆₈ = S oder N oder K oder T oder Y oder G
78	X ₆₉ = I oder V oder Y oder F oder L

6 / 11

Figur 3 / Teil 4

Position	Aminosäure
79	X ₇₀ = A oder G oder S oder D oder P
80	X ₇₁ = D oder E oder V oder S
81	X ₇₂ = G oder D oder A oder S oder -
82	X ₇₃ = G oder W oder -
83	X ₇₄ = G oder V oder A oder -
84	X ₇₅ = K oder Y oder H oder R oder F oder L
85	X ₇₆ = L oder M oder I oder V oder P oder T
86	X ₇₇ = A oder G oder N oder S oder T oder P oder K oder Q oder E
87	X ₇₈ = G oder S oder N oder Y oder A
88	X ₇₉ = A oder D oder G oder S oder T oder P oder N
89	X ₈₀ = S oder K oder V oder A oder F oder T oder G oder Q oder R oder E oder -
90	X ₈₁ = A oder S oder P
91	X ₈₂ = R oder G oder S oder N oder A oder V
92	X ₈₃ = T oder V oder S
93	X ₈₄ = Y oder F oder W
94	V
95	D
96	N
97	H
98	D
99	T
100	X ₈₅ = E oder Q

Figur 4



8 / 11

Figur 5 / Teil 1

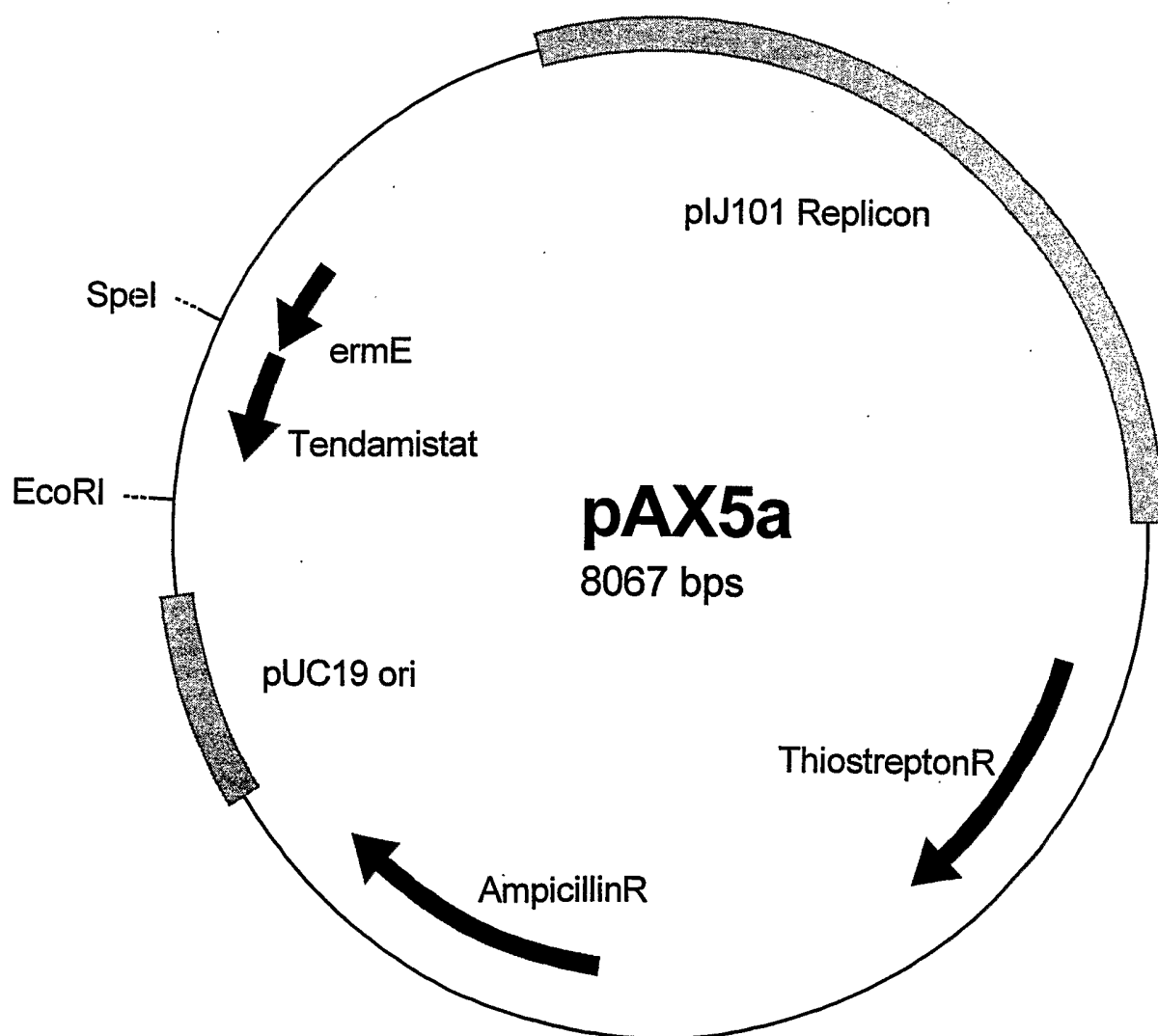
1	80
U511129	(1) --MASRTLSCALALAAAATAVLAAPATVAHASPPGTDVTAFLFEWDYASVAKECTSTLGPAGYGYVQVSPPAEHIQGSQ
B327*	(1) -MISRWTASAVATAAAFAAAVALPAPQAAAYASPPGTDVTAFLFEWNFAVAKECTNTLGPAGYGSVQVSPPAEHIQGSQ
U08602	(1) MQHRRFLIGGTLAGVLTVAGLTTLAPWQSQAATPPGEKTVTVMFERPYADVASACTDQLGPAGYGYVQVSPATEHIQGDQ
B400B	(1) --MSSRAARATLAGLLAAGGLTVLAPWPSQAATPPGEKTVTATLFEWKYDAVATACTDTLGPAGYGYVEVSPATEHIQGDQ
81	160
U511129	(79) WWTSYQPVSYSYKIAGRLGDRRAAFRSMVNTCHAAAGVKVVVDVFINHMSAGSGTGTGGSSYTKYDYPGLYSAPDFDDCTAEIT
B327*	(80) WWTSYQPVSYSYKIAGRLGDATAFKNMVGTCCHAAAGVKVVVDVFINHMSAGSGTGTGGSSYTKYNYPGLYSSYDMDCTSTIT
U08602	(81) WWTSYQPVSYSYRIAGRLGDRDGFAMVDACHSAGVKVVVADAVINHHMAAGSGTGTGGTAYTKYDYPGYFGDADFHTCRTAIK
B400B	(79) WWTSYQPVSYSYRIAGRLGDRDGSFAAMVESCHAAAGVRVVADAVINHHMAAGSGTGTGGTSTYTKYDYPGTFQDQDFHACRKDIA
161	240
U511129	(159) DYQDRWNVQHCELVGLADLDTGEEYVRQTIAGYMNDDLSSLGVDGFRIDAAKHI PAEDLANIKSRLSNPNAYWKQEVYIGA
B327*	(160) DYTNRGNVQNCCELVGLADLDTGEEYVRATIAGYLNSLLGYGVDGFRIDAAKHI PATDLANIKSRLTNPSVYWKQEVYIGS
U08602	(161) DYTDRGDVQNCCELVGLSLDLDTGKDEVIRSTIAAYLDGLRSMGVDFRIDAAKHHMAADDVA-IQGQDERPPGSGSPEVIQGG
B400B	(159) NYGDRGDVQNCCELVGLADLDTGSDAVRTTIAAYLSDLRSLGVDGFRIDAAKHMSADDVAAIKGKMSDP-GFWVTEVIHGG

Figur 5 / Teil 2

241 320
U51129 (239) GEAVQGEYTGTDVQEFRRYAYDLKRVFTQEHLAYLKNYGEDWGYLSSTTAGVFVDNHDTERNGSTLNYKNDATYTLANV
B327* (240) GEAVQPTGYTGNGDVQEFRRYAYDLKRVFNENLAYLKNYGEGWGYLNSVAGVFVDNHDTERNGSTLNYKDGANYTLANV
U08602 (240) GEAVQPEEYTEIGDVDEFRRYGGHLKSAFQGGGIAQLKAVADR--KLGASARTFVDNWDTERNGSTLTYKDGAAAYTLANV
B400B (238) GEAVQPEEYTSIGDVDEFRRYGGHLKSAFQGGGLPGLKSIADG--KLAGASARTFVDNWDTERNGSTLTHKDGAAAYTLANV
321 400
U51129 (319) FMLAWPYGAPDINSYEWSDPDAGPPDGGHVDACWQNGWKQHKWPEIASMVAFRNATRGEVPTDWDDGADAI AFGRGS
B327* (320) FMLAYPYGAPDINSYEWSDTDAGPPNNGSVSACWQDGWKQCQHAWPEILLRMVAFRNATRGESVTNWWNDNGGDAIAFGRGA
U08602 (318) FMLASPYGSPNVYSYEWSDADAGPPSGA-----DGWTDTHAQQTITGLVGFERNVAVGSAELTDWWDNNGGSALAFGRGD
B400B (316) FMLASPYGSPNVFSGYTWTDKDGAPPPNGGAAD-CGSGAWTCTHAQQQAVTGMVGFHNNAVAGAEITDWDDGSSALAFARAG
401 469
U51129 (399) KGFVAINHESATVQRTYQTSLPAGTYCDVQ-----SNTTVTVDSAGRFTAALGPD TALALHTGRTSC
B327* (400) KGYVAINHESGSLSRITYQTSLPAGTYCNVQ-----NNTSVTVGSNGQFTATLGSNTALAIYAGKANC
U08602 (391) KGFVALNNADDALTETFTTSLPAGTYCNVAAAASPDCCDGNVTTVGDDGAVQATVPARGALALHTGAQAG
B400B (395) KGFVAVNNGDAELNRTFTTTLPLAGTYCNVVAAAPDSCDNGTTVADDGTATITVPARGAVALHT-----

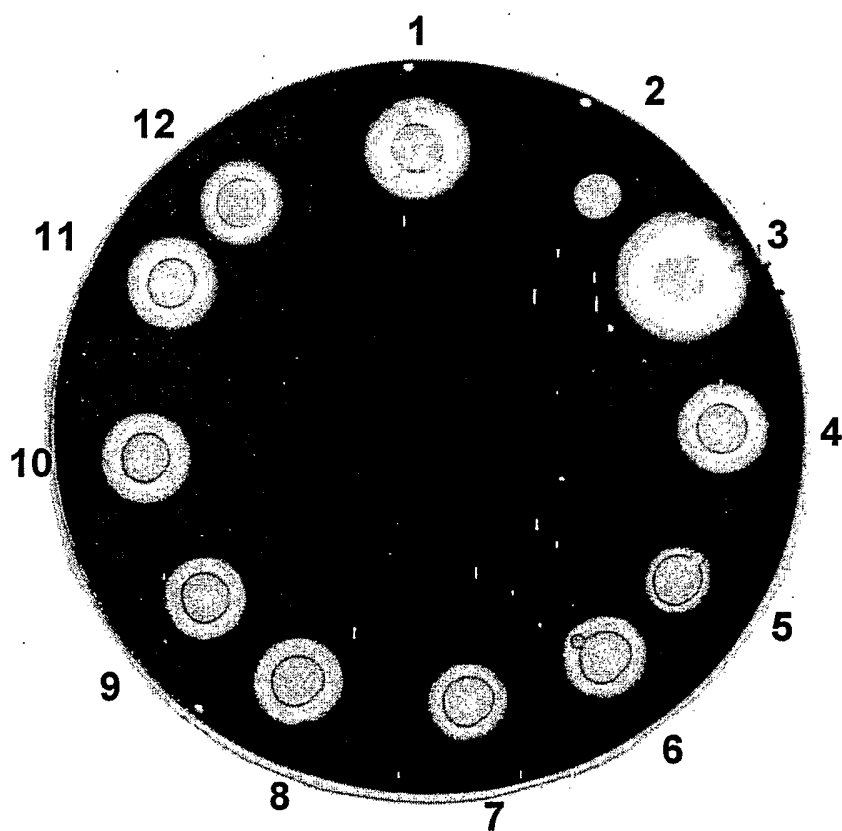
10 / 11

Figur 6



11 / 11

Figur 7



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien

<120> Eine neue Gruppe von Alpha-Amylasen sowie ein Verfahren zur Identifizierung und Gewinnung neuer Alpha-Amylasen

<130> H 4890 PCT

<140>

<141>

<150> DE 10131441.8

<151> 2001-06-29

<160> 263

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 302

<212> DNA

<213> Streptomyces sp. B327*

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(301)

<400> 1

c gtc gac ggc ttc cgc atc gac acg gcc aag cac atc ccg gcg acc gac 49
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Thr Asp
1 5 10 15

ctc gcc aac atc aag tcg cgt ctg acg aac ccc tcc gtc tac tgg aag 97
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
20 25 30

cag gag gtc atc tac ggc agc ggg gag gcc gtc cag ccc acc gag tac 145
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

acg ggc aac ggg gac gtc cag gag ttc cgc tac gcc tac gac ctc aag 193
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

cgc gtc ttc aac aac gag aac ctc gcc tat ctg aag aac tac ggc gag 241
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80

ggc tgg ggg tac ctg aac agc tcg gtg gcc ggc gtc tac gtc gac aac 289
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

cac gac acc gag c 302
His Asp Thr Glu
100

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B327*

<400> 2

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Thr	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Ser	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Val	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 3

<211> 293

<212> DNA

<213> Streptomyces sp. B400B

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(292)

<400> 3

c	gtc	gac	ggc	ttc	cgc	atc	gac	gcc	gcc	aag	cac	atg	tcc	gcc	gac	gac	49
	Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Ser	Ala	Asp	Asp	
	1				5					10					15		

gtc	gcc	gcg	atc	aag	ggg	aag	atg	agc	gac	ccg	ggg	ttc	tgg	gtc	acc	97
Val	Ala	Ala	Ile	Lys	Gly	Lys	Met	Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Trp	Val	Thr	
			20					25					30			

gag	gtc	atc	cac	ggc	ggg	gga	gag	gcg	gtc	cag	ccg	gag	gag	tac	acc	145
Glu	Val	Ile	His	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Glu	Glu	Tyr	Thr	
		35					40				45					

tcg	atc	ggg	gac	gcc	gac	gag	ttc	cgt	tac	ggc	ggc	cac	ctc	aag	tcc	193
Ser	Ile	Gly	Asp	Ala	Asp	Glu	Phe	Arg	Tyr	Gly	Gly	His	Leu	Lys	Ser	
	50					55					60					

gcc	ttc	cag	ggc	ggc	ggc	ctg	ccc	ggc	ctg	aag	tcg	atc	gcc	gac	ggc	241
Ala	Phe	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	Gly	
	65					70				75					80	

aaa	ctg	gcc	ggc	gcc	tcc	gcc	cgt	acg	tac	gtg	gac	aac	cac	gac	acc	289
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```
<210> 4
<211> 97
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B400B
```

```
<400> 4
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ser Ala Asp Asp
      1              5              10              15
```

Val Ala Ala Ile Lys Gly Lys Met Ser Asp Pro Gly Phe Trp Val Thr
20 25 30

Glu Val Ile His Gly Gly Gly Glu Ala Val Gln Pro Glu Glu Tyr Thr
35 40 45

Ser Ile Gly Asp Ala Asp Glu Phe Arg Tyr Gly Gly His Leu Lys Ser
50 55 60

Ala Phe Gln Gly Gly Gly Leu Pro Gly Leu Lys Ser Ile Ala Asp Gly
65 70 75 80

Lys Leu Ala Gly Ala Ser Ala Arg Thr Tyr Val Asp Asn His Asp Thr
85 90 95

Glu

```
<210> 5
<211> 1386
<212> DNA
<213> Streptomyces sp. B327*
```

```
<220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (1386)
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> INIT MET
```

```
<220>
<221> mat_peptide
<222> (91)
```

```

<400> 5
gtg ata tcg aga tgg acc gca tcc gct gtc gcc acg gcc gcc gcg ttc    48
Val Ile Ser Arg Trp Thr Ala Ser Ala Val Ala Thr Ala Ala Ala Phe
-30                      -25                      -20                      -15

```

gcc gcc gcg gtg gcc ctg ccg gcc ccc cag gcc gcc tac gcc tcc ccg	96
Ala Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Pro Gln Ala Ala Tyr Ala Ser Pro	
-10 -5 -1 1	
ccc ggt acc aag gac gtc acc gcc gtc ctc ttc gag tgg aac ttc gcc	144
Pro Gly Thr Lys Asp Val Thr Ala Val Leu Phe Glu Trp Asn Phe Ala	
5 10 15	
tcc gtc gcc aag gag tgc acc aac acc ctc ggc ccc gcc gga tac ggc	192
Ser Val Ala Lys Glu Cys Thr Asn Thr Leu Gly Pro Ala Gly Tyr Gly	
20 25 30	
tcc gtg cag gtc tcc ccg ccc gcc gag cac atc cag ggc tca cag tgg	240
Ser Val Gln Val Ser Pro Pro Ala Glu His Ile Gln Gly Ser Gln Trp	
35 40 45 50	
tgg acc tcg tac cag ccg gtc agc tac aag atc gcg ggg cgc ctc ggt	288
Trp Thr Ser Tyr Gln Pro Val Ser Tyr Lys Ile Ala Gly Arg Leu Gly	
55 60 65	
gac gcc acc gcc ttc aag aac atg gtc ggc acc tgc cac gcg gcc ggg	336
Asp Ala Thr Ala Phe Lys Asn Met Val Gly Thr Cys His Ala Ala Gly	
70 75 80	
gtg aag gtc gtc gtc gac acc gtc atc aac cac atg tcc gcg ggc agc	384
Val Lys Val Val Val Asp Thr Val Ile Asn His Met Ser Ala Gly Ser	
85 90 95	
ggc acc ggt acc ggc gga tcg tcg tac acg aag tac aac tac ccc ggc	432
Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Lys Tyr Asn Tyr Pro Gly	
100 105 110	
ctg tac tcc tcg tac gac atg gac gac tgc acg tcg acc atc acc gac	480
Leu Tyr Ser Ser Tyr Asp Met Asp Asp Cys Thr Ser Thr Ile Thr Asp	
115 120 125 130	
tac acc aac cgc ggc aac gtc cag aac tgc gaa ctc gtc ggc ctc gcc	528
Tyr Thr Asn Arg Gly Asn Val Gln Asn Cys Glu Leu Val Gly Leu Ala	
135 140 145	
gac ctg gac acc ggc gag gag tac gtc cgc gcc acc atc gcc ggc tac	576
Asp Leu Asp Thr Gly Glu Glu Tyr Val Arg Ala Thr Ile Ala Gly Tyr	
150 155 160	
ctg aac tcg ctg ctc ggc tac ggc gtc gac ggc ttc cgc atc gac gcg	624
Leu Asn Ser Leu Leu Gly Tyr Gly Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala	
165 170 175	
gcc aag cac atc ccg gcg acc gac ctc gcc aac atc aag tcg cgt ctg	672
Ala Lys His Ile Pro Ala Thr Asp Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu	
180 185 190	
acg aac ccc tcc gtc tac tgg aag cag gag gtc atc tac ggc agc ggg	720
Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly	
195 200 205 210	
gag gcc gtc cag ccc acc gag tac acg ggc aac ggg gac gtc cag gag	768
Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu	
215 220 225	

ttc cgc tac gcc tac gac ctc aag cgc gtc ttc aac aac gag aac ctc	816
Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu	
230 235 240	
gcc tat ctg aag aac tac ggc gag ggc tgg ggg tac ctg aac agc tcg	864
Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Ser	
245 250 255	
gtg gcc ggc gtc ttc gtc gac aac cac gac acc gag cgc aac ggc tcc	912
Val Ala Gly Val Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Arg Asn Gly Ser	
260 265 270	
acg ctc aac tac aag gac ggc gcg aac tac acc ctc gcc aac gtc ttc	960
Thr Leu Asn Tyr Lys Asp Gly Ala Asn Tyr Thr Leu Ala Asn Val Phe	
275 280 285 290	
atg ctc gcc tac ccg tac ggc gcc ccg gac atc aac tca ggc tac gag	1008
Met Leu Ala Tyr Pro Tyr Gly Ala Pro Asp Ile Asn Ser Gly Tyr Glu	
295 300 305	
tgg tcc gac acg gac gcg ggc ccg ccc aac aac ggc tcc gtg agc gcc	1056
Trp Ser Asp Thr Asp Ala Gly Pro Pro Asn Asn Gly Ser Val Ser Ala	
310 315 320	
tgt tgg cag gac ggc tgg aag tgt cag cac gcc tgg ccg gag atc ctc	1104
Cys Trp Gln Asp Gly Trp Lys Cys Gln His Ala Trp Pro Glu Ile Leu	
325 330 335	
cgc atg gtc gcc ttc cgc aac gcc acc cgc ggt gag tcg gtc acc aac	1152
Arg Met Val Ala Phe Arg Asn Ala Thr Arg Gly Glu Ser Val Thr Asn	
340 345 350	
tgg tgg gac aac ggc ggc gac gcg atc gcc ttc ggg cgg ggc gcc aag	1200
Trp Trp Asp Asn Gly Gly Asp Ala Ile Ala Phe Gly Arg Gly Ala Lys	
355 360 365 370	
ggc tat gtc gcc atc aac cac gag tcc ggc agc ctg agc cgg acc tac	1248
Gly Tyr Val Ala Ile Asn His Glu Ser Gly Ser Leu Ser Arg Thr Tyr	
375 380 385	
cag acc tcg ctg ccc gcc ggc acg tac tgc aac gtg cag aac aac acg	1296
Gln Thr Ser Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Cys Asn Val Gln Asn Asn Thr	
390 395 400	
agc gtg acg gtc ggc tcc aac ggt cag ttc acg gcc acg ctc ggg tcc	1344
Ser Val Thr Val Gly Ser Asn Gly Gln Phe Thr Ala Thr Leu Gly Ser	
405 410 415	
aac acg gca ctg gcg atc tac gcg ggc aag gcc aac tgc tga	1386
Asn Thr Ala Leu Ala Ile Tyr Ala Gly Lys Ala Asn Cys	
420 425 430	

<210> 6

<211> 461

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B327*

<400> 6

```

Val Ile Ser Arg Trp Thr Ala Ser Ala Val Ala Thr Ala Ala Ala Phe
 1           5           10           15
Ala Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Pro Gln Ala Ala Tyr Ala Ser Pro
 20           25           30
Pro Gly Thr Lys Asp Val Thr Ala Val Leu Phe Glu Trp Asn Phe Ala
 35           40           45
Ser Val Ala Lys Glu Cys Thr Asn Thr Leu Gly Pro Ala Gly Tyr Gly
 50           55           60
Ser Val Gln Val Ser Pro Pro Ala Glu His Ile Gln Gly Ser Gln Trp
 65           70           75           80
Trp Thr Ser Tyr Gln Pro Val Ser Tyr Lys Ile Ala Gly Arg Leu Gly
 85           90           95
Asp Ala Thr Ala Phe Lys Asn Met Val Gly Thr Cys His Ala Ala Gly
 100          105          110
Val Lys Val Val Val Asp Thr Val Ile Asn His Met Ser Ala Gly Ser
 115          120          125
Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Lys Tyr Asn Tyr Pro Gly
 130          135          140
Leu Tyr Ser Ser Tyr Asp Met Asp Asp Cys Thr Ser Thr Ile Thr Asp
 145          150          155          160
Tyr Thr Asn Arg Gly Asn Val Gln Asn Cys Glu Leu Val Gly Leu Ala
 165          170          175
Asp Leu Asp Thr Gly Glu Glu Tyr Val Arg Ala Thr Ile Ala Gly Tyr
 180          185          190
Leu Asn Ser Leu Leu Gly Tyr Gly Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala
 195          200          205
Ala Lys His Ile Pro Ala Thr Asp Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu
 210          215          220
Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly
 225          230          235          240
Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu
 245          250          255
Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu
 260          265          270
Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Ser
 275          280          285
Val Ala Gly Val Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Arg Asn Gly Ser
 290          295          300
Thr Leu Asn Tyr Lys Asp Gly Ala Asn Tyr Thr Leu Ala Asn Val Phe
 305          310          315          320
Met Leu Ala Tyr Pro Tyr Gly Ala Pro Asp Ile Asn Ser Gly Tyr Glu
 325          330          335
Trp Ser Asp Thr Asp Ala Gly Pro Pro Asn Asn Gly Ser Val Ser Ala
 340          345          350
Cys Trp Gln Asp Gly Trp Lys Cys Gln His Ala Trp Pro Glu Ile Leu
 355          360          365
Arg Met Val Ala Phe Arg Asn Ala Thr Arg Gly Glu Ser Val Thr Asn
 370          375          380
Trp Trp Asp Asn Gly Gly Asp Ala Ile Ala Phe Gly Arg Gly Ala Lys
 385          390          395          400
Gly Tyr Val Ala Ile Asn His Glu Ser Gly Ser Leu Ser Arg Thr Tyr
 405          410          415
Gln Thr Ser Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Cys Asn Val Gln Asn Asn Thr
 420          425          430
Ser Val Thr Val Gly Ser Asn Gly Gln Phe Thr Ala Thr Leu Gly Ser
 435          440          445
Asn Thr Ala Leu Ala Ile Tyr Ala Gly Lys Ala Asn Cys
 450          455          460

```

<210> 7
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> Streptomyces sp. B400B

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1377)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> INIT_MET

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (88)

<400> 7
 ttg agt tcc cgc gcc gca cgc gca acc ctg gcg ggc ctg ctc gcc gcc 48
 Leu Ser Ser Arg Ala Ala Arg Ala Thr Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ala
 -25 -20 -15

ggt ggc ctc acg gtc ctc gcc ccc tgg cct tcc cag gcg acc cca ccg 96
 Gly Gly Leu Thr Val Leu Ala Pro Trp Pro Ser Gln Ala Thr Pro Pro
 -10 -5 -1 1

ggc gag aag acc gtc acc gcc acc ctc ttc gag tgg aag tac gac gcg 144
 Gly Glu Lys Thr Val Thr Ala Thr Leu Phe Glu Trp Lys Tyr Asp Ala
 5 10 15

gtg gcc acc gcc tgc acc gac acc ctg ggc ccg gcc ggc tac ggc tac 192
 Val Ala Thr Ala Cys Thr Asp Thr Leu Gly Pro Ala Gly Tyr Gly Tyr
 20 25 30 35

gtc gag gtc tcg ccc gcc acc gag cac atc cag ggc gac cag tgg tgg 240
 Val Glu Val Ser Pro Ala Thr Glu His Ile Gln Gly Asp Gln Trp Trp
 40 45 50

acc tcg tac cag ccg gtc agc tac cgg atc gcg ggc cgt ctc ggt gac 288
 Thr Ser Tyr Gln Pro Val Ser Tyr Arg Ile Ala Gly Arg Leu Gly Asp
 55 60 65

cgg gac tcc ttc gcc gcg atg gtg gag agc tgc cac gcg gcc ggg gtc 336
 Arg Asp Ser Phe Ala Ala Met Val Glu Ser Cys His Ala Ala Gly Val
 70 75 80

cgg gtc gtg gcg gac gcc gtg atc aac cac atg gcc gcc ggc tcc ggg 384
 Arg Val Val Ala Asp Ala Val Ile Asn His Met Ala Ala Gly Ser Gly
 85 90 95

acc ggg acg ggc ggc acc tcg tac acc aag tac gac tac ccc ggc acg 432
 Thr Gly Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Thr Lys Tyr Asp Tyr Pro Gly Thr
 100 105 110 115

ttc cag gac cag gac ttc cac gcc tgc cgc aag gac atc gcg aac tac 480

Phe	Gln	Asp	Gln	Asp	Phe	His	Ala	Cys	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala	Asn	Tyr	
				120					125					130		
ggc	gac	cgc	ggc	gac	gtc	cag	aac	tgc	gaa	ctg	gtc	ggc	ctc	gcg	gac	528
Gly	Asp	Arg	Gly	Asp	Val	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Val	Gly	Leu	Ala	Asp	
			135					140					145			
ctg	gac	acc	ggc	agc	gac	gcc	gta	cgc	acg	acg	atc	gcc	gcc	tac	ctc	576
Leu	Asp	Thr	Gly	Ser	Asp	Ala	Val	Arg	Thr	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	
		150					155					160				
tcc	gac	ctc	cgc	tcc	ctg	ggc	gtc	gac	ggc	ttc	cgc	atc	gac	gcc	gcc	624
Ser	Asp	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	
	165					170					175					
aag	cac	atg	tcc	gcc	gac	gac	gtc	gcc	gcg	atc	aag	ggg	aag	atg	agc	672
Lys	His	Met	Ser	Ala	Asp	Asp	Val	Ala	Ala	Ile	Lys	Gly	Lys	Met	Ser	
180					185					190					195	
gac	ccg	ggg	ttc	tgg	gtc	acc	gag	gtc	atc	cac	ggc	ggg	gga	gag	gcg	720
Asp	Pro	Gly	Phe	Trp	Val	Thr	Glu	Val	Ile	His	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala	
				200					205					210		
gtc	cag	ccg	gag	gag	tac	acc	tcg	atc	ggg	gac	gtc	gac	gag	ttc	cgt	768
Val	Gln	Pro	Glu	Glu	Tyr	Thr	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Phe	Arg	
			215					220					225			
tac	ggc	ggc	cac	ctc	aag	tcc	gcc	ttc	cag	ggc	ggc	ggc	ctg	ccc	ggc	816
Tyr	Gly	Gly	His	Leu	Lys	Ser	Ala	Phe	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	
		230					235					240				
ctg	aag	tcg	atc	gcc	gac	ggc	aaa	ctg	gcc	ggc	gcc	tcc	gcc	cgt	acg	864
Leu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	Gly	Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	
	245					250					255					
ttc	gtc	gac	aac	tgg	gac	acc	gag	cgc	aac	ggc	tcc	acc	ctc	acc	cac	912
Phe	Val	Asp	Asn	Trp	Asp	Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Ser	Thr	Leu	Thr	His	
260					265					270					275	
aag	gac	ggc	gcc	gcc	tac	acc	ctg	gcc	aac	gtc	ttc	atg	ctg	gcc	tcg	960
Lys	Asp	Gly	Ala	Ala	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asn	Val	Phe	Met	Leu	Ala	Ser	
				280					285					290		
ccc	tac	ggc	tcc	ccg	aac	gtc	ttc	tcc	ggc	tac	acc	tgg	acc	gac	aag	1008
Pro	Tyr	Gly	Ser	Pro	Asn	Val	Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr	Trp	Thr	Asp	Lys	
			295					300					305			
gac	gcc	ggc	ccg	ccg	aac	ggc	ggc	gcg	gcc	gac	tgc	ggc	tcc	ggc	gcg	1056
Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Cys	Gly	Ser	Gly	Ala	
		310					315					320				
tgg	acc	tgc	acg	cac	gcc	cag	cag	gcg	gtc	acc	ggc	atg	gtc	ggc	ttc	1104
Trp	Thr	Cys	Thr	His	Ala	Gln	Gln	Ala	Val	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Phe	
		325				330					335					
cac	aac	gcc	gtc	gcg	ggc	gcg	gag	ctg	acc	gac	tgg	tgg	gac	gac	ggc	1152
His	Asn	Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Glu	Leu	Thr	Asp	Trp	Trp	Asp	Asp	Gly	
340					345					350					355	

```

tcc tcc gcc ctc gcc ttc gcc cgc gcg ggc aag ggc ttt gtc gcc gtc 1200
Ser Ser Ala Leu Ala Phe Ala Arg Ala Gly Lys Gly Phe Val Ala Val
360 365 370

aac aac ggc gac gcg gag ctg aac cgc acc ttc acg acg acg ctg ccg 1248
Asn Asn Gly Asp Ala Glu Leu Asn Arg Thr Phe Thr Thr Thr Leu Pro
375 380 385

gcg ggc acg tac tgc aat gtg gtc gcc gcg gcc ccc gac tcc tgc gac 1296
Ala Gly Thr Tyr Cys Asn Val Val Ala Ala Ala Pro Asp Ser Cys Asp
390 395 400

ggc aac ggg acc acg gtc gcg gac gac ggc acg gcg acg atc acg gtc 1344
Gly Asn Gly Thr Thr Val Ala Asp Asp Gly Thr Ala Thr Ile Thr Val
405 410 415

ccg gcg cgc gga gcg gtg gcg ctg cac acc tag 1377
Pro Ala Arg Gly Ala Val Ala Leu His Thr
420 425 430

```

<210> 8

<211> 458

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B400B

<400> 8

```

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

```

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

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> PCR-Primer (GEX024)

<400> 9
 cgtcgacggc ttccgsatcg acrc

24

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> PCR-Primer (GEX026)

<400> 10
 gctcgggtgtc gtggttgtcs acgwa

25

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX029)

<400> 11
cggcgctcgac ggctkscgbn tsga 24

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX031)

<400> 12
gctgggtgtc gtggttgtcs acsma 25

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX015)

<400> 13
ggtggacgtc ctaccagccs gt 22

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX016)

<400> 14
gcacccgcag gagcacrycs agg 23

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX017)

<400> 15
cgcggccggc gtsaagrt 18

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX018)

<400> 16
tggtcaacac ctgccacgms gc 22

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX019)

<400> 17
cgcggcgtcg atgckgaagm mgtc 24

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX020)

<400> 18
ggagccgtac ggccasgcsa gcatga 26

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX021)

<400> 19
cccttgctcg cgcgsscga sgc 23

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX022)

<400> 20
ggcgtcctcg tggttgawsg csac 24

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX023)

<400> 21
ggctctacgcc gacgtcgtsw wcaacca 27

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX025)

<400> 22
ggcgtcgtatg cggaascgt c 21

<210> 23
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX027)

-----<400> 23
gcgtccaggt ctacgtcgac rysgtshtsa a 31

<210> 24
<211> 29
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX028)

<400> 24
caggtctacg tcgacgtcgt shsaacca 29

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> PCR-Primer (GEX030)

<400> 25
cggcggggat gtgctksrsc rmgtsa 27

<210> 26
<211> 24
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX036)

<400> 26

gtacgccgac gccgtnwtha ayca

24

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX037)

<400> 27

gtacgccgac gccgtnwtha aycaya

26

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX038)

<400> 28

ggcggcgctcg atcckraanc crtc

24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX039)

<400> 29

cttggcggcg tcgatnckra ancc

24

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX040)

<400> 30

tcttgctcgg cgtggayggn ttymg

25

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX041)

<400> 31

ccggatcgac gccgynaarc ayat

24

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX042)

<400> 32

cgctcggtgt cgtggtntc nacvma

26

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> PCR-Primer (GEX043)

<400> 33

cgttcgctc ggtgtogyrr ttntcnac

28

<210> 34

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1002

<400> 34

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Asp	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Thr	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Arg	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				

Gln	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Phe	Met	Pro	Ser	Ser	Lys	Ala	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His Asp Thr Glu

100

<210> 35

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1003B

<400> 35

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Asp	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Thr	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Arg	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				

Gln	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Phe	Met	Pro	Ser	Ser	Lys	Ala	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 36

<211> 97

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1006

<400> 36

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Ser	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Val	Ala	Ala	Val	Lys	Gly	Lys	Met	Arg	Asp	Pro	Gly	Tyr	Trp	Val	Gln
			20					25					30		

Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Asp	Glu	Tyr	Thr
		35					40					45			

Gly	Ile	Gly	Asp	Val	Asp	Glu	Phe	Arg	Tyr	Gly	Ser	His	Leu	Lys	Ser
50						55					60				

Ala	Phe	Gln	Gly	Gly	Asn	Ile	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Asp	Gly
65					70					75					80

Lys	Leu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ala	Arg	Thr	Tyr	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr
				85					90					95	

Glu

<210> 37
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1008A1

<400> 37
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Glu Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Thr Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Thr Gly Asp Ala Gln Glu Phe Arg Tyr Ser Trp Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ala Gly Gly Lys Ala Ser Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 38
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1009A

<400> 38
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 39
 <211> 100
 <212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1010

<400> 39

```

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

```

<210> 40

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1011

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1012B

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1014A1

<400> 42
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Arg Asn Glu Arg Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Ser Val Ala Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 43
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1017C

<400> 43
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

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

<210> 44
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1019

<400> 44
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Arg Asn Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 45
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B101A

<400> 45
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asp Pro Asp Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Ile Phe Thr Gly Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Val Gly Glu
 65 70 75 80
 Ala Trp Gly Tyr Met Pro Ser Asp Lys Ser Asn Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 46
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B101B

<400> 46
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Ser Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 47
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B102

<400> 47
 Gly Ser Lys His Met Pro Ala Ala Asp Ile Ala Ala Ile Lys Ala Lys
 1 5 10 15
 Leu Asn Arg Ser Ala Tyr Leu Val Gln Glu Val Asn Tyr Gly Ala Gly
 20 25 30
 Glu Pro Ile Gln Pro Thr Glu Tyr Thr Gly Asn Gly Asp Val His Glu
 35 40 45

```
<210> 48
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B1020C
```

```

<400> 48
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Glu Asp
  1          5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
          20          25          30
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
          35          40          45
Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
  50          55          60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65          70          75          80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Thr Thr Ala Gly Val Phe Val Asp Asn
          85          90          95
His Asp Thr Glu
          100

```

```
<210> 49
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B1022A
```

```

<400> 49
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
  1                               5          10          15
Leu Ala Pro Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Thr Asn Val Tyr Trp Lys
          20          25          30
Gln Glu Val Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
          35          40          45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
          50          55          60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Ser Glu
  65          70          75          80

```

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Ser Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 50

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1028

<400> 50

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Thr Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Val Lys Ala Lys Leu Ser Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

Gln Glu Thr Ile Tyr Ser Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gln Glu Tyr
 35 40 45

Leu Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Gln Ser Glu Arg Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Pro Gly Asp Arg Ala Ser Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 51

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1029

<400> 51

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Asp Glu Tyr
 35 40 45

Ala Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Ser Leu Lys
 50 55 60

Gln Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Asn Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Pro Ser Ser Lys Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 52
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B1030A

<400> 52
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Asp Glu Tyr
35 40 45
Ala Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Ser Leu Lys
50 55 60
Gln Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Asn Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Phe Met Pro Ser Ser Lys Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 53
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B1035B

<400> 53
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Glu Asp Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asp Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Thr Ile Gly Ala Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
35 40 45
Tyr Asn Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe His Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Thr Gly Glu Lys Leu Ala Glu Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Ala Trp Gly Tyr Val Pro Ser Gly Lys Ala Ser Val Phe Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 54
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1036

<400> 54
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Asn Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Pro Gly Asn Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 55
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1037A

<400> 55
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Gln Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ala Ser Gly Gln Ser Ala Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 56
 <211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1039A

<400> 56

```

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

```

<210> 57

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B103A

<400> 57

```

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

```

<210> 58

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1041A1

<400> 58

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Lys	Pro	Asp	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Arg	Asn	Glu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Met	Asn	Ser	Ser	Val	Ala	Gly	Val	Phe	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 59

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1043A

<400> 59

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Ala	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Ala	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

His	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Thr	Val	Ser	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

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

Arg	Val	Phe	Asn	Gly	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
65					70					75					80

Ala	Trp	Gly	His	Leu	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 60

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1044C

<400> 60

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Ala	Thr	Glu	Asp
1				5					10					15	

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

<210> 61
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1045

<400> 61
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Ser Val Ala Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 62
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1046A

<400> 62
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asp Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

```

<400> 63
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Ala Asp
  1          5          10          15
Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
          20          25          30
His Glu Ala Met Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Thr Glu Tyr
          35          40          45
Val Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
  50          55          60
Arg Val Phe Asn Gly Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
  65          70          75          80
Ala Trp Gly His Leu Pro Ser Asp Glu Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
          85          90          95
His Asp Thr Glu
          100

```

```
<400> 64
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Xaa Ala Ala Asp
 1               5               10              15
Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
      20              25              30
His Glu Ala Met Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Thr Glu Tyr
      35              40              45
```

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

Arg Val Phe Asn Gly Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Ala Trp Gly His Leu Pro Ser Asp Glu Ala Ala Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 65
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1049A

<400> 65
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45

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

Arg Val Phe Gly Ser Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 66
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1050A

<400> 66
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45

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

Arg Val Phe Gly Ser Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 67
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1052A2

<400> 67
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 68
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B1053

<400> 68
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ile Lys Ala Lys Val Gly Asn Gly Ser Thr Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Gln Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Xaa Phe Gly Glu
 65 70 75 80

```
<210> 69
<211> 97
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B1059
```

```
<210> 70
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B1060
```

<400> 70															
Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Gly	Asp
1				5					10					15	
Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		
His	Glu	Ala	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			
Leu	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Gln	Val	Phe	Leu	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
65					70					75					80
Gly	Trp	Gly	Phe	Met	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His Asp Thr Glu
100

<210> 71

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1061B

<400> 71

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Pro Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30

His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
35 40 45

Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Gly Leu Lys
50 55 60

Gln Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Arg Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 72

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1065

<400> 72

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
20 25 30

His Glu Ala Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
35 40 45

Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
50 55 60

Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 73

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1067A

<400> 73

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

His	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

Leu	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Gly	Arg	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				

Gln	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Phe	Met	Glu	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 74

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1068

<400> 74

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Gly	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

His	Glu	Ala	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

Leu	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				

Gln	Val	Phe	Leu	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Phe	Met	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 75

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1069B

<400> 75

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Thr	Ala	Ile	Lys	Ala	Lys	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

Gln	Glu	Ala	Ile	His	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Gln	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Lys	Asn	Phe	Asp	Glu
	65				70					75					80

Asp	Trp	Gly	His	Met	Gln	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 76

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B106C

<400> 76

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
	65				70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 77

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B107

<400> 77

```

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

```

<210> 78

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1070A

<400> 78

```

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

```

<210> 79

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1071

<400> 79

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp

```

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

<210> 80

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B1072A

<400> 80

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

<210> 81

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B108

<400> 81

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp	1	5	10	15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Phe Trp Lys				

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

<210> 82

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B109A

<400> 82

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

<210> 83

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B114C

<400> 83

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr

35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 84
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B115

<400> 84
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ala Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Ser Ala Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 85
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B117A1

<400> 85
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Ser Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys

50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 86
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B118

<400> 86
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Gly Asn Pro Asp Val His Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Leu Thr Gly Gly Ser Leu Ala His Leu Arg Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ala Ser Asp Arg Ser Asn Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 87
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B119E

<400> 87
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Glu Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Gln Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Thr Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Thr Gly Asp Ala Gln Glu Leu Arg Tyr Ser Trp Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu

```
<210> 88
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B120alt
```

```
<400> 88
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
  1                    5              10                15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
    20                  25                 30
His Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
   35                   40               45
Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
  50                     55           60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65                      70             75                80
Gly Trp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
   85                          90                95
His Asp Thr Glu
     100
```

```
<210> 89
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B123
```

```

<400> 89
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1          5          10          15
Leu Thr Ala Ile Lys Ala Xaa Val Gly Asp Gly Gly Thr Tyr Trp Lys
          20          25          30
Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
          35          40          45
Leu Gly Thr Cys Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
          50          55          60
Arg Val Phe Gln Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
  65          70          75          80
Asp Trp Gly His Met Gln Ser Gly Arg Ser Ala Val Phe Val Asp Asn

```

85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 90
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B124

<400> 90
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45
Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 91
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B125C

<400> 91
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
35 40 45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu

100

<210> 92
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B126A

<400> 92
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ala Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Thr Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Phe Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 93
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B127A

<400> 93
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Lys Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 94
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B128B

<400> 94
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Xaa Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 95
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B130B

<400> 95
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Leu Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Leu Gln Ser Glu Lys Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ala Trp Gly Tyr Met Pro Ser Ala Gln Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 96
 <211> 100
 <212> PRT

<213> Streptomyces sp. B131

<400> 96

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1              5              10              15

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

Met Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
              35              40              45

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

Arg Val Leu Gln Asn Glu Lys Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
              65              70              75              80

Ser Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
              85              90              95

His Asp Thr Glu
              100

```

<210> 97

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B134

<400> 97

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1              5              10              15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
              20              25              30

Leu Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
              35              40              45

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

Arg Ile Val Gln Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
              65              70              75              80

Ala Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
              85              90              95

His Asp Thr Glu
              100

```

<210> 98

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B135A

<400> 98

```

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

```

```

<210> 99
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B137

```

```

<400> 99
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
 1              5              10              15
Pro Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
              20              25              30
His Glu Ala Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu His
      35              40              45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
      50              55              60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
      65              70              75              80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
              85              90              95
His Asp Thr Glu
              100

```

```

<210> 100
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B138

```

```

<400> 100
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1              5              10              15

```

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

<210> 101
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B138A

<400> 101
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asp Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe His Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Asn Ser Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 102
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B138A2

<400> 102
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asp Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30

```
<210> 103
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B140
```

```
<400> 103
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
   1              5          10         15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
      20           25        30
Leu Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
     35            40       45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
    50           55       60
Arg Ile Val Gln Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
   65             70       75          80
Ala Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
      85          90         95
His Asp Thr Glu
      100
```

```
<210> 104
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B141
```

```
<400> 104
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1          5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
      20          25          30
Leu Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
      35          40          45
```

```
<210> 105
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B142
```

```

<400> 105
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ser Lys His Met Pro Ala Asp Asp
  1          5          10          15
Leu Ala Ala Ile Lys Gly Lys Leu Ala Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
          20          25          30
His Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
          35          40          45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Gly Leu Lys
          50          55          60
Gln Val Phe Thr Gly Gly Ser Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
  65          70          75          80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
          85          90          95
His Asp Thr Glu
          100

```

```
<210> 106
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B143
```

```

<400> 106
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Gly
 1          5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
      20          25          30
Leu Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
      35          40          45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
      50          55          60

```

Arg Ile Val Gln Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ala Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 107
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B148A

<400> 107
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Xaa Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ala Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Phe Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 108
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B152A

<400> 108
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Ile Phe Gly Ser Glu Lys Leu Ser His Leu Ser Thr Phe Gly Glu
 65 70 75 80

```
<210> 109
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B153(B)
```

```

<400> 109
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Ala Asp
  1           5           10           15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asp Pro Asn Val Tyr Trp Lys
          20           25           30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
      35           40           45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
  50           55           60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
  65           70           75           80
Ala Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
          85           90           95
His Asp Thr Glu
          100

```

```
<210> 110
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B154A
```

```

<400> 110
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
  1          5          10          15
Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
          20          25          30
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
          35          40          45
Thr Ser Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
          50          55          60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65          70          75          80
Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85          90          95

```

His Asp Thr Glu
100

<210> 111
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B156B

<400> 111

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asp Pro Asn Val Tyr Trp Lys
20 25 30

His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
35 40 45

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

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80

Ala Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 112
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B157C

<400> 112

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
20 25 30

Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

Thr Ser Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 113

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B158A

<400> 113

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 114

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B159

<400> 114

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

His	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Thr	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 115

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B160B

<400> 115

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

<210> 116

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B161A

<400> 116

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

<210> 117

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B166B

<400> 117

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1              5              10              15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Asn Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
          20              25              30

Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
          35              40              45

Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
          50              55              60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
          65              70              75              80

Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Ser Gly Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85              90              95

His Asp Thr Glu
          100

```

<210> 118

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B168

<400> 118

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1              5              10              15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
          20              25              30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
          35              40              45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
          50              55              60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
          65              70              75              80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85              90              95

His Asp Thr Glu
          100

```

<210> 119

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B179

<400> 119

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1              5              10              15

```

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

<210> 120
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B181C

<400> 120
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 121
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B183B

<400> 121
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ile Lys Ala Lys Val Gly Asn Gly Ser Thr Tyr Trp Lys
 20 25 30

Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Gln Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ala Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 122
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B184

<400> 122
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ile Lys Ala Lys Val Gly Asn Gly Ser Thr Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Gln Asn Gly Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ala Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 123
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B185(B)

<400> 123
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

```
<210> 124
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B186A
```

```

<400> 124
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1                               5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
      20                25      30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
      35                40      45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg His Ala Arg Asp Leu Lys
      50                55      60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
      65                70      75      80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
      85                90      95
His Asp Thr Glu
      100

```

```
<210> 125
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B187A
```

```

<400> 125
Val  Asp  Gly  Phe  Arg  Ile  Asp  Thr  Ala  Lys  His  Met  Ala  Ala  Gly  Asp
   1              5              10              15

Leu  Ala  Asn  Ile  Lys  Ser  Arg  Leu  Thr  Asn  Pro  Asn  Val  Tyr  Trp  Lys
           20              25              30

His  Glu  Ala  Ile  Tyr  Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Val  Ser  Pro  Ala  Glu  Tyr
           35              40              45

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

```

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 126
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B187A2

<400> 126
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 127
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B194A

<400> 127
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ser Asp
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Ile Lys Ala Arg Met Ser Asn Pro Asn Val Phe Trp Val
 20 25 30
 His Glu Val Ile Gly Ala Ala Gly Glu Pro Ile Gln Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Ser His Glu Phe Asp Tyr Ala Arg Gln Leu Lys
 50 55 60
 Arg Asp Phe Asp Gly Gln Ile Lys Asn Leu Arg Tyr Ile Gly Asp Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Pro Tyr Asp Arg Ala Gly Val Phe Val Asp Asn His Asp Thr
 85 90 95

Glu

<210> 128

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B194B1

<400> 128

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 129

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B196A2C

<400> 129

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Asp
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 130

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B196B

<400> 130

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Asp
65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 131

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B197B

<400> 131

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Xaa Tyr
35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Asp
65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 132
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B198C2

<400> 132

```

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

```

<210> 133
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B200B

<400> 133

```

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

```

<210> 134

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B201A

<400> 134

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asp	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asp	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

His	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 135

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B202A

<400> 135

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

His	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Xaa	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Thr	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 136

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B202B

<400> 136

```

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

```

<210> 137

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B206A

<400> 137

```

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

```

<210> 138

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B207

<400> 138

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp

```

```
<210> 139
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B208B
```

```

<400> 139
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
  1          5          10          15
Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
          20          25          30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
          35          40          45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
  50          55          60
Arg Val Phe Gly Ser Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
  65          70          75          80
Ser Trp Gly Tyr Met Pro Ser Gly Gln Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
          85          90          95
His Asp Thr Glu
          100

```

```
<210> 140
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B209B
```

```
<400> 140
Val  Asp  Gly  Phe  Arg  Ile  Asp  Thr  Ala  Lys  His  Ile  Pro  Ala  Ala  Asp
   1             5             10             15
Leu  Ala  Asn  Ile  Lys  Ser  Arg  Leu  Ser  Asn  Pro  Gly  Val  Tyr  Trp  Lys
```

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

<210> 141
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B210

<400> 141
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 142
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B211A

<400> 142
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr

35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 143
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B212B1

<400> 143
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 144
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B213

<400> 144
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Arg Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Thr Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys

50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 145
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B214B

<400> 145
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Xaa Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Trp Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60
 Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 146
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B214C

<400> 146
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60
 Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu

65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Phe Val Asp Asn

 85 90 95

His Asp Thr Glu

 100

<210> 147
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B215

<400> 147

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp

1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys

 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr

 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys

 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu

65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn

 85 90 95

His Asp Thr Glu

 100

<210> 148
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B218D2

<400> 148

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp

1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys

 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr

 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys

 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Val

65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn

85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 149
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B219A

<400> 149
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45
Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu
100

<210> 150
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B220B

<400> 150
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45
Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu

100

<210> 151

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B221A

<400> 151

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Asp Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 152

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B222(B)

<400> 152

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
 35 40 45

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

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Xaa Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 153

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B223A

<400> 153

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Gly	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Thr	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 154

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B224(A)

<400> 154

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

His	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Thr	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 155

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B225B

<400> 155

```

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

```

<210> 156

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B226B

<400> 156

```

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

```

<210> 157

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B227B2

<400> 157

```
<210> 158
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B228B
```

```

<400> 158
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1          5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Asn Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
          20          25          30
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
          35          40          45
Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50          55          60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65          70          75          80
Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Ser Gly Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85          90          95
His Asp Thr Glu
          100

```

```
<210> 159
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B230B1
```

<400> 159
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Thr Glu Asp
1 5 10 15

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

<210> 160

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B231A

<400> 160

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

<210> 161

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B233C

<400> 161

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Thr Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Val Lys Ala Lys Leu Ser Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

```
<210> 162
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B234
```

[illegible]

```
<210> 163
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B235A
```

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Ala	Thr	Glu	Asp
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Val	Lys	Ala	Lys	Leu	Ser	Lys	Pro	Asp	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		
Gln	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Gln	Glu	Tyr
		35					40					45			

```
<210> 164
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B237A
```

```

<400> 164
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
  1          5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
      20          25          30
His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
      35          40          45
Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
      50          55          60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65          70          75          80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ala Gly Val Phe Val Asp Asn
      85          90          95
His Asp Thr Glu
      100

```

```
<210> 165
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B238A
```

```

<400> 165
Val  Asp  Gly  Phe  Arg  Ile  Asp  Ala  Ala  Lys  His  Ile  Pro  Ala  Ala  Asp
  1          5          10          15

Leu  Ala  Asn  Ile  Lys  Ser  Arg  Leu  Ser  Asn  Pro  Gly  Val  Tyr  Trp  Lys
          20          25          30

His  Glu  Val  Ile  Tyr  Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Val  Gln  Pro  Thr  Glu  Tyr
          35          40          45

Thr  Gly  Ser  Gly  Asp  Val  Gln  Glu  Phe  Arg  Tyr  Ala  Tyr  Asp  Leu  Lys
  50          55          60

```

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 166
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B240A

<400> 166
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 167
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B241B2

<400> 167
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Thr Ser Gly Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 168

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B242A1

<400> 168

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Pro Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Ala Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45

Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60

Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 169

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B243C

<400> 169

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asp Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30

Gln Glu Val Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe His Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Asn Ser Ser Ala Gly Val Xaa Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 170
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B244B2

<400> 170
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Thr Glu Asp
1 5 10 15
Leu Ala Ala Val Lys Ala Lys Leu Ser Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Thr Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gln Glu Tyr
35 40 45
Leu Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Gln Ser Glu Arg Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Leu Pro Gly Asp Arg Ala Ser Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 171
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B246

<400> 171
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45
Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 172

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B247A

<400> 172

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Ile	Ala	Thr	Glu	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Ala	Val	Lys	Ala	Lys	Leu	Ser	Lys	Pro	Asp	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

Gln	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Gln	Glu	Tyr
		35					40					45			

Leu	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Gln	Ser	Glu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Gly	Asp	Arg	Ala	Ser	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 173

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B248B2

<400> 173

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

His	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

Leu	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Gly	Arg	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				

Gln	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Phe	Met	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 174

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B249A

<400> 174

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

<210> 175

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B249C

<400> 175

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

<210> 176

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B250A2

<400> 176

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 177

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B251B

<400> 177

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 178

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B252A

<400> 178

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

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

<210> 179
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B253

<400> 179
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Asp Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Arg Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Ser Ser Ser Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 180
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B253A

<400> 180
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30

```
<210> 181
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B255B2
```

[illegible]

```
<210> 182
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B256A
```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asp Pro Gly Val Tyr Trp Lys
20 25 30

Gln Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

```
<210> 183
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B259A
```

```

<400> 183
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
  1                               5                               10                               15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Gly Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
                               20                               25                               30
Gln Glu Ala Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
                               35                               40                               45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Tyr Asp Leu Lys
                               50                               55                               60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65                               70                               75                               80
Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
                               85                               90                               95
His Asp Thr Glu
                               100

```

```
<210> 184
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B261
```

```

<400> 184
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Glu Asp
 1          5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
          20          25          30
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
          35          40          45
Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
          50          55          60

```

Arg Val Phe Thr Gln Gly Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Asp Trp Gly Tyr Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 185
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B278

<400> 185
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ala Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Ser Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Gln Ala Ala Val Tyr Xaa Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 186
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B279

<400> 186
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

```
<210> 187
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B280C
```

```
<400> 187
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Gly Asp
  1          5      10
Leu Ala Pro Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
    20      25
Gln Glu Val Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
    35      40      45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
    50      55      60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
   65      70      75      80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Ser Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
     85      90      95
His Asp Thr Glu
    100
```

```
<210> 188
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B284A
```

```
<400> 188
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1          5          10         15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Lys Pro Gly Val Tyr Trp Lys
      20          25         30
Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
    35          40         45
Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
   50          55         60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65          70         75         80
Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
      85          90         95
```

His Asp Thr Glu
100

<210> 189
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B286A

<400> 189
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Val Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu
100

<210> 190
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B287

<400> 190
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
35 40 45
Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
50 55 60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu
100

<210> 191

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B292A

<400> 191

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Asn	Ala	Phe	Trp	Lys
		20						25					30		

Leu	Glu	Ala	Ile	His	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

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

Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
	65				70					75					80

Ala	Trp	Gly	Tyr	Met	Pro	Ser	Gly	Gln	Ser	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 192

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B3001org

<400> 192

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Ile	Ala	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Ser	Glu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Leu	Asn	Asn	Phe	Gly	Glu
	65				70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Ile	Pro	Gly	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 193

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B3002org

<400> 193

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Ile	Ala	Thr	Glu	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Ala	Val	Lys	Ala	Lys	Leu	Ser	Lys	Pro	Asp	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

Gln	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Gln	Glu	Tyr
		35					40					45			

Leu	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys
50						55					60				

Arg	Val	Phe	Gln	Ser	Glu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Gly	Asp	Arg	Ala	Ser	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 194

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B3003org

<400> 194

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Ile	Asp	Thr	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys
			20					25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Ala	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
50						55					60				

Arg	Val	Phe	Thr	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ser	Val	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 195

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B3017

<400> 195

```

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

```

<210> 196

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B306

<400> 196

```

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

```

<210> 197

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B308

<400> 197

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp

```

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

<210> 198

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B311

<400> 198

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

<210> 199

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B315

<400> 199

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	
Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys

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

<210> 200
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B317

<400> 200
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60
 Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 201
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B318

<400> 201
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Asn Glu Ala Val Ser Pro Thr Glu Tyr

```
<210> 202
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B319
```

```
<210> 203
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B320A
```

```

<400> 203
Val  Asp  Gly  Phe  Arg  Ile  Asp  Ala  Ala  Lys  His  Ile  Ala  Ala  Ala  Asp
   1          5          10          15
Leu  Ala  Asn  Ile  Lys  Ser  Arg  Leu  Thr  Asn  Pro  Gly  Val  Tyr  Trp  Lys
          20          25          30
Gln  Glu  Val  Ile  Tyr  Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Val  Gln  Pro  Thr  Glu  Tyr
          35          40          45
Thr  Gly  Asn  Gly  Asp  Val  Gln  Glu  Phe  Cys  Tyr  Gly  Tyr  Asp  Leu  Lys

```

50 55 60
 Arg Val Phe Asn Ser Glu Lys Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 204
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B321

<400> 204
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Ala Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Gly Asn Pro Asp Val His Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Leu Thr Gly Gly Ser Leu Ala His Leu Arg Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ala Ser Asp Arg Ser Asn Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 205
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B322A

<400> 205
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu

```
<210> 206
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B323
```

```

<400> 206
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1           5           10           15
Leu Ala Asn Ile Lys Thr Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
      20           25           30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
      35           40           45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
      50           55           60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
      65           70           75           80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
      85           90           95
His Asp Thr Glu
      100

```

```
<210> 207
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B326
```

```

<400> 207
Val  Asp  Gly  Phe  Arg  Ile  Asp  Thr  Ala  Lys  His  Ile  Pro  Ala  Ala  Asp
  1          5          10          15
Leu  Ala  Asn  Ile  Lys  Ser  Arg  Leu  Ser  Asn  Pro  Gly  Val  Tyr  Trp  Lys
          20          25          30
Gln  Glu  Ala  Ile  Phe  Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Val  Gln  Pro  Ser  Glu  Tyr
          35          40          45
Thr  Gly  Thr  Gly  Asp  Val  Gln  Glu  Phe  Arg  Tyr  Ala  Tyr  Asp  Leu  Lys
      50          55          60
Arg  Val  Phe  Asn  Asn  Glu  Asn  Leu  Ala  Tyr  Leu  Lys  Asn  Tyr  Gly  Glu
  65          70          75          80
Gly  Trp  Gly  Tyr  Met  Ser  Ser  Gly  Val  Ser  Gly  Val  Tyr  Val  Asp  Asn

```

85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 208
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B327B

<400> 208
Val Asp Gly Phe Xaa Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Thr Ala Ile Lys Ala Lys Val Gly Asp Gly Gly Thr Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Ser Glu Tyr
35 40 45
Leu Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Gln Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Asp Trp Gly His Met Gln Ser Gly Arg Ser Ala Val Phe Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu
100

<210> 209
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B335org

<400> 209
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Thr Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
35 40 45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
50 55 60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu

100

<210> 210
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B345

<400> 210

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

<210> 211
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B346

<400> 211

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

<210> 212
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B347

<400> 212
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Asn Ala Ile Trp Ala Lys Leu Asp Asp Thr Thr Ala Gly Gly Glu
 20 25 30
 Pro Tyr Ile Phe Gln Glu Val Tyr Pro Gly Ser Thr Pro Ala Ala Ser
 35 40 45
 Asp Tyr Tyr Ser Ala Gly Asp Val Leu Asp Phe Thr Tyr Ala Ser Arg
 50 55 60
 Val Lys Ser Ala Phe Gln Gly Asn Val Ser Asp Leu Glu Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Val Leu Pro Pro Ala Asn Ser Val Ser Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 213
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B348

<400> 213
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Arg His Ile Asp Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Arg Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Arg Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 214
 <211> 100
 <212> PRT

<213> Streptomyces sp. B350

<400> 214

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1              5              10              15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
          20              25              30

Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
          35              40              45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50              55              60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65              70              75              80

Gly Trp Gly Tyr Met Lys Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85              90              95

His Asp Thr Glu
          100

```

<210> 215

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B352

<400> 215

```

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1              5              10              15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
          20              25              30

Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
          35              40              45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50              55              60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65              70              75              80

Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85              90              95

His Asp Thr Glu
          100

```

<210> 216

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B353

<400> 216

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

<210> 217

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B354

<400> 217

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

<210> 218

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B355

<400> 218

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1 5 10 15

```

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

His Asp Thr Glu
      100

```

<210> 219
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B356

```

<400> 219
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
  1                      5                      10                      15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
      20                      25                      30
Gln Glu Val Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
      35                      40                      45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
      50                      55                      60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
      65                      70                      75                      80
Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
      85                      90                      95

His Asp Thr Glu
      100

```

<210> 220
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B357

```

<400> 220
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Val Gly Asp
  1                      5                      10                      15
Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Gly Ser Pro Asp Val His Trp Lys
      20                      25                      30

```

His Glu Ala Ile His Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60
 Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 221
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B358

<400> 221
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala His Ile Lys Ser Arg Leu Thr Arg Pro Asp Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile His Gly Asp Gly Glu Ala Val Ser Pro Gly Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg His Ala Arg Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Gln Arg Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Leu Pro Ser Ala Lys Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 222
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B359

<400> 222
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Arg Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 223
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B360

<400> 223
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Asp Thr Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30

Gln Glu Val Ile His Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
 35 40 45

Thr Arg Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Ser Ser Ser Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 224
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B361

<400> 224
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Val Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Asn Ala Ile Arg Ala Lys Leu Asp Asp Thr Thr Ser Gly Ala Glu
 20 25 30

Pro Tyr Ile Phe Gln Glu Val Tyr Pro Gly Ala Thr Pro Ala Ala Ser
 35 40 45

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

Val Lys Ser Ala Phe Gln Gly Asn Val Ser Asp Leu Glu Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Val Leu Thr Pro Ala Asn Ser Val Ser Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 225
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B362

<400> 225
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Xaa Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 226
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B363org

<400> 226
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Gly Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gly Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Thr Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asp Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

His Asp Thr Glu
100

<213> Streptomyces sp. B366

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Thr Ser Val Tyr Trp Lys
20 25 30

Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

Arg Val Phe Asn Ser Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<213> Streptomyces sp. B368

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Asp	Thr	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu Ala Thr Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
20 25 30

Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

Thr Arg Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 229

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B370

<400> 229

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
1 5 10 15

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

His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

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

Gln Thr Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Asn Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Phe Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 230

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B371

<400> 230

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
20 25 30

Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45

Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
85 90 95

His Asp Thr Glu
100

<210> 231
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B372

<400> 231
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Ser Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 232
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B373

<400> 232
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Asp Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Gly Val Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 233
 <211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B374B

<400> 233

```

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

```

<210> 234

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B375

<400> 234

```

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

```

<210> 235

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B376

<400> 235

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Met	Asp	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Ser	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Val	Ile	His	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Ala	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 236

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B380

<400> 236

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Asp	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Val	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Glu	Tyr
		35					40					45			

Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Gln	Glu	Phe	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Leu	Lys
	50					55					60				

Arg	Val	Phe	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Glu
65					70					75					80

Gly	Trp	Gly	Tyr	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 237

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B382

<400> 237

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Ala	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

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

<210> 238
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B390

<400> 238
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Thr Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60
 Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 239
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B392A

<400> 239
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

```
<210> 240
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B393
```

```

<400> 240
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Thr Glu Asp
  1                               5          10          15

Leu Ala Ala Val Lys Ala Lys Leu Ser Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
      20                      25          30

Gln Glu Thr Ile Tyr Ser Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gln Glu Tyr
      35                      40          45

Leu Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Arg Asp Leu Lys
  50                      55          60

Arg Val Phe Gln Ser Glu Arg Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65                      70          75          80

Gly Trp Gly Tyr Leu Pro Gly Asp Arg Ala Ser Val Tyr Val Asp Asn
      85          90          95

His Asp Thr Glu
      100

```

```
<210> 241
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B394
```

```
<400> 241
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Ala Thr Glu Asp
 1          5          10          15
Leu Ala Ala Val Lys Ala Lys Leu Ser Lys Pro Asp Val Tyr Trp Lys
      20          25          30
Gln Glu Thr Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Gln Glu Tyr
      35          40          45
```

```
<210> 242
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B395
```

```

<400> 242
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Asp Thr Ala Asp
  1                               5                               10                               15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
                               20                               25                               30
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
                               35                               40                               45
Thr Arg Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
                               50                               55                               60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65                               70                               75                               80
Gly Trp Gly Tyr Leu Ser Ser Thr Ser Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
                               85                               90                               95
His Asp Thr Glu
                               100

```

```
<210> 243
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B396(A)
```

```

<400> 243
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Asp Thr Ala Asp
 1             5             10             15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Lys Pro Gly Val Tyr Trp Lys
          20             25
Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
      35             40             45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
    50             55             60

```

Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Ser Val Ala Gly Val Phe Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 244
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B400

<400> 244
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Thr Ser Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80
 Gly Trp Gly Tyr Met Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Xaa Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 245
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B4006

<400> 245
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Asp Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Ala Tyr Trp Lys
 20 25 30
 Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45
 Thr Arg Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60
 Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

```
<210> 246
<211> 103
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B4006B
```

```

<400> 246
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Glu Gly Asp
  1                               5                               10                               15
Leu Gln Ala Ile Leu Ser Arg Leu Lys Asn Val Tyr Pro Ala Trp Gly
                               20                               25                               30
Gly Gly Lys Pro Tyr Ile Phe Gln Glu Val Ile Ala Asp Ser Thr Ile
                               35                               40                               45
Ser Thr Gly Ser Tyr Thr His Leu Gly Ser Val Thr Glu Ser Gln Tyr
                               50                               55                               60
His Arg Asp Ile Ser His Ala Phe Ala Asn Gly Asn Ile Ala His Leu
  65                               70                               75                               80
Thr Gly Leu Gly Ser Gly Leu Thr Pro Ser Asp Lys Ala Val Val Tyr
                               85                               90                               95
Val Asp Asn His Asp Thr Glu
                               100

```

```
<210> 247
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B400A
```

```

<400> 247
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
  1           5          10          15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
          20          25          30
His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
          35          40          45
Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
  50          55          60
Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
  65          70          75          80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
          85          90          95

```

His Asp Thr Glu
100

<210> 248
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B400A2

<400> 248
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Ile Pro Ala Thr Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Ser Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Gln Glu Val Ile Tyr Gly Ser Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
35 40 45
Thr Gly Asn Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
50 55 60
Arg Val Phe Asn Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Ser Val Ala Gly Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu
100

<210> 249
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B400B3

<400> 249
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
1 5 10 15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
20 25 30
His Glu Ala Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
35 40 45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
50 55 60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
65 70 75 80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
85 90 95
His Asp Thr Glu
100

<210> 250
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B400C

<400> 250

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

<210> 251
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B400C2

<400> 251

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

<210> 252

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B400D

<400> 252

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	Pro	Gly	Ala	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Ala	Ile	His	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

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

Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
	65					70				75					80

Ala	Trp	Gly	His	Met	Pro	Ser	Gly	Arg	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 253

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B400D2

<400> 253

Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Xaa	Ala	Lys	His	Met	Pro	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	

Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	Pro	Gly	Ala	Tyr	Trp	Lys
		20						25					30		

Gln	Glu	Ala	Ile	His	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			

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

Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu
	65					70				75					80

Ala	Trp	Gly	His	Met	Pro	Ser	Gly	Arg	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Asn
				85					90					95	

His	Asp	Thr	Glu
			100

<210> 254

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B400E

<400> 254

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Ser Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Ala Ile Phe Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45

Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
 50 55 60

Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 255

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B400G

<400> 255

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Ile Glu Ser Arg Leu Ser Asn Pro Gly Val Tyr Trp Lys
 20 25 30

His Glu Val Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Gln Pro Thr Glu Tyr
 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Ala Tyr Asp Leu Lys
 50 55 60

Arg Val Phe Thr Asn Glu Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asn Tyr Gly Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Gly Tyr Leu Asn Ser Gly Val Ser Gly Val Tyr Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Glu
 100

<210> 256

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B400G2

<400> 256

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Xaa Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp

```

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

```

```

<210> 257
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B400I

```

```

<400> 257
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Thr Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
  1              5              10              15
Leu Ala Asn Ile Lys Ser Arg Leu Thr Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
      20              25              30
His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
      35              40              45
Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys
      50              55              60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu
      65              70              75              80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Ser Ala Val Tyr Val Asp Asn
      85              90              95
His Asp Thr Glu
      100

```

```

<210> 258
<211> 100
<212> PRT
<213> Streptomyces sp. B400J

```

```

<400> 258
Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Val Ala Asp
  1              5              10              15
Leu Asn Ala Ile Trp Ala Lys Leu Asp Asn Thr Thr Ser Gly Ala Glu

```

20 25 30
 Pro Tyr Ile Phe Gln Glu Val Tyr Pro Gly Ser Thr Pro Ala Ala Ser
 35 40 45
 Asp Tyr Tyr Ser Ala Gly Asp Val Leu Asp Phe Ser Tyr Ala Ser Lys
 50 55 60
 Val Lys Ser Ser Phe Gln Gly Asn Ile Ser Asp Leu Glu Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Ala Leu Thr Pro Ala Asn Ser Val Ser Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 259
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B400K

<400> 259
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Asn Ala Ile Trp Ala Lys Leu Asp Asn Thr Thr Ser Gly Ala Glu
 20 25 30
 Pro Tyr Ile Phe Gln Glu Val Tyr Pro Gly Ser Thr Pro Ala Ala Ser
 35 40 45
 Asp Tyr Tyr Ser Ala Gly Asp Val Leu Asp Phe Ser Tyr Ala Ser Lys
 50 55 60
 Val Lys Ser Ser Phe Gln Gly Asn Ile Ser Asp Leu Glu Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Ala Leu Thr Pro Ala Asn Ser Val Ser Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 260
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sp. B400L

<400> 260
 Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Asn Ala Ile Trp Ala Lys Leu Asp Asn Thr Thr Ser Gly Ala Glu
 20 25 30
 Pro Tyr Ile Phe Gln Glu Val Tyr Pro Gly Ser Thr Pro Ala Ala Ser

35 40 45
 Asp Tyr Tyr Ser Ala Gly Asp Val Leu Asp Phe Ser Tyr Ala Ser Lys
 50 55 60
 Val Lys Ser Ser Phe Gln Gly Asn Ile Ser Asp Leu Glu Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Ala Leu Thr Pro Ala Asn Ser Val Ser Tyr Val Asp Asn
 85 90 95
 His Asp Thr Glu
 100

<210> 261

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B402.

<400> 261

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

<210> 262

<211> 100

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. B907

<400> 262

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Met Pro Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Asn Ile Lys Thr Arg Leu Ala Asn Pro Asn Val Tyr Trp Lys
 20 25 30
 His Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Glu Ala Val Ser Pro Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Gly Ser Gly Asp Val Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Arg Ser Leu Lys

50		55		60
Gln Val Phe Leu Asn Glu Asn Leu Ala His Leu Lys Asn Phe Gly Glu				
65		70		75
				80
Gly Trp Gly Phe Met Glu Ser Gly Lys Pro Gly Val Tyr Val Asp Asn				
	85		90	95
His Asp Thr Glu				
	100			

<210> 263
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)
 <223> Ile or Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)
 <223> Ala or Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)
 <223> Lys or Arg

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)
 <223> Met or Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (13)
 <223> Ser or Pro or Asp or Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (14)
 <223> Ala or Thr or Ser or Glu or Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)
 <223> Asp or Ala or Glu or Thr or Gly or Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)
 <223> Asp or Gly

<220>
 <221> VARIANT

<222> (17)
<223> Val or Leu or Pro or Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (18)
<223> Ala or Thr or Glu or Asn or Gln

<220>
<221> VARIANT
<222> (19)
<223> Ala or Asn or Asp or His or Thr or Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (20)
<223> Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (21)
<223> Lys or Glu or Trp or Arg or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)
<223> Gly or Ser or Pro or Ala or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)
<223> Lys or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)
<223> Met or Leu or Val or Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (25)
<223> Ser or Arg or Thr or Gly or Asn or Ala or Asp or
Lys or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (26)
<223> Asp or Asn or Ser or Lys or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)
<223> Pro or Arg or Thr or Gln or Gly or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)
<223> Gly or Asp or Ser or Asn or Thr-Ala-Gly-Gly-Glu or
Thr-Ser-Gly-Ala-Glu or

Tyr-Pro-Ala-Trp-Gly-Gly-Gly-Lys

<220>

<221> VARIANT

<222> (29)

<223> Val or Ala or Thr or Pro or none

<220>

<221> VARIANT

<222> (30)

<223> Phe or Tyr or His

<220>

<221> VARIANT

<222> (31)

<223> Trp or Arg or Ile or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (32)

<223> Val or Lys or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (33)

<223> Thr or Gln or His or Leu or Met

<220>

<221> VARIANT

<222> (34)

<223> Glu or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (35)

<223> Val or Ala or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (36)

<223> Ile or Thr or Met or Tyr or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (37)

<223> His or Tyr or Phe or Gly or Pro or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (38)

<223> Gly or Ala or Ser or Trp or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (39)

<223> Gly or Ala or Asp or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (40)
<223> Gly or Asn or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (41)
<223> Glu or Pro or Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (42)
<223> Ala or Thr or Pro or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (43)
<223> Val or Ile or Ala or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (44)
<223> Gln or Ser or Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (45)
<223> Pro or Ser or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (46)
<223> Glu or Asp or Thr or Gly or Ser or Ala or Gln or
none

<220>
<221> VARIANT
<222> (47)
<223> Glu or Asp or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (48)
<223> Tyr or His

<220>
<221> VARIANT
<222> (49)
<223> Thr or Leu or Tyr or Val or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (50)
<223> Ser or Gly or Asp or Arg or Thr or Asn or His

<220>
<221> VARIANT
<222> (51)
<223> Ile or Ser or Asn or Ala or Thr or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (52)
<223> Gly or Cys

<220>
<221> VARIANT
<222> (53)
<223> Asp or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (54)
<223> Val or Ala or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (55)
<223> Asp or Gln or His or Leu or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (56)
<223> Glu or Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (57)
<223> Phe or Leu or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (58)
<223> Arg or Ser or Cys or His or Asp or Thr or Gln

<220>
<221> VARIANT
<222> (59)
<223> Tyr or His

<220>
<221> VARIANT
<222> (60)
<223> Gly or Ala or Ser or His

<220>
<221> VARIANT
<222> (61)
<223> Gly or Ser or Tyr or Arg or Trp or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (62)
<223> His or Asp or Ser or Gly or Gln or Arg or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (63)
<223> Leu or Val or Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (64)
<223> Lys or Ser or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (65)
<223> Ser or Arg or Gln or His

<220>
<221> VARIANT
<222> (66)
<223> Ala or Val or Ile or Thr or Ser or Asp or Met

<220>
<221> VARIANT
<222> (67)
<223> Phe or Val or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (68)
<223> Gln or Thr or Arg or Asn or Asp or Gly or His or
Leu or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (69)
<223> Gly or Asn or Gln or Arg or Ser or Asp or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (70)
<223> Gly or Glu or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (71)
<223> Gly or Asn or Arg or His or Ser or Lys or Asp or
Gln

<220>
<221> VARIANT
<222> (72)
<223> Leu or Pro or Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (73)
<223> Pro or Ala or Thr or Ser or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (74)
<223> Gly or Gln or Tyr or His or Glu or Asp or Asn

<220>

<221> VARIANT
<222> (76)
<223> Arg or Asn or Ser or Glu or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (77)
<223> Ser or Asn or Lys or Thr or Tyr or Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (78)
<223> Ile or Val or Tyr or Phe or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (79)
<223> Ala or Gly or Ser or Asp or Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (80)
<223> Asp or Glu or Val or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (81)
<223> Gly or Asp or Ala or Ser or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (82)
<223> Gly or Trp or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (83)
<223> Gly or Val or Ala or none

<220>
<221> VARIANT
<222> (84)
<223> Lys or Tyr or His or Arg or Phe or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (85)
<223> Leu or Met or Ile or Val or Pro or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (86)
<223> Ala or Gly or Asn or Ser or Thr or Pro or Lys or
Gln or Glu

<220>
<221> VARIANT
<222> (87)
<223> Gly or Ser or Asn or Tyr or Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (88)
 <223> Ala or Asp or Gly or Ser or Thr or Pro or Asn

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (89)
 <223> Ser or Lys or Val or Ala or Phe or Thr or Gly or
 Gln or Arg or Glu or none

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (90)
 <223> Ala or Ser or Pro

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (91)
 <223> Arg or Gly or Ser or Asn or Ala or Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (92)
 <223> Thr or Val or Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (93)
 <223> Tyr or Phe or Trp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (100)
 <223> Glu or Gln

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)
 <223> Ala or Thr or Gly

<220>
 <223> Consensus-Sequenz

<400> 263
 Val Asp Gly Phe Arg Xaa Asp Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Asp Asn
 85 90 95

His Asp Thr Xaa
 100