



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117836407 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 05

(21) 申请号 202280055812.9

(22) 申请日 2022.08.11

(30) 优先权数据

63/232,122 2021.08.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074866 2022.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/019222 EN 2023.02.16

(71) 申请人 比奥梅蒂斯科技公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·杨 X·张 K·奥 G·班纳吉

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(51) Int.Cl.

C12N 9/18 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

权利要求书23页 说明书66页

序列表(电子公布) 附图51页

(54) 发明名称

聚对苯二甲酸乙二醇酯的酶促降解

(57) 摘要

本公开提供了变体酶用于聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的酶促降解。

1A. 组合物, 其包含与SEQ ID NO:1相比的变体Bhr-PETase, 其中所述变体相比于SEQ ID NO:1包含选自下组的氨基酸位置处的至少一个氨基酸取代: 27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197, 其中所述变体Bhr-PETase与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性并且具有PETase活性。

1B. 组合物, 其包含与SEQ ID NO:1相比的变体Bhr-PETase, 其中所述变体相比于SEQ ID NO:1包含位置27处的氨基酸取代以及选自下组的氨基酸位置处的至少一个进一步的氨基酸取代: 1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197, 其中所述变体Bhr-PETase与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性并且具有PETase活性。

1C. 组合物, 其包含与SEQ ID NO:1相比的变体Bhr-PETase, 其中所述变体相比于SEQ ID NO:1包含选自下组的氨基酸位置处的至少一个氨基酸取代: 27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197, 其中所述变体Bhr-PETase与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性并且具有等于或大于野生型Bhr-PETase (SEQ ID NO:1) 的PETase活性。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述氨基酸取代位于选自下组的氨基酸位置: 27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255和258。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述氨基酸取代位于选自下组的氨基酸位置: 27、2、17、20、21、23、24、40、46、49、55、57、77、83、97、101、102、109、110、114、117、135、136、139、140、142、143、149、161、163、164、167、184、185、195、222、227、228、229、249、250和251。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述氨基酸取代位于选自下组的氨基酸位置: 8、126、137、165、169、172、191、192和197。

5. 根据权利要求1、2、3或4所述的组合物,其中所述氨基酸取代选自下组: S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、S1A、S1G、S1M、S1R、N2E、N2F、N2L、N2R、N2S、Q5E、N9A、N9E、N9S、R12K、S13L、S13R、A14K、A14S、L15I、T16E、T17A、T17C、T17G、T17H、T17I、T17K、T17L、T17M、T17N、T17Q、T17R、T17S、D18R、P20D、P20E、P20I、P20Q、P20T、F21W、F21Y、S22A、S22I、S22K、S22P、S22R、S22V、V23L、V23T、A24D、A24G、A24H、A24N、A24S、A24T、A24V、T25A、T25F、T25H、T25Q、T25R、T25V、Y26C、Y26K、Y26L、Y26T、R30K、S32K、S32M、S32Q、S32Y、V33G、V33Q、V33T、S34R、V40T、G46E、G46L、G46N、G46R、G46S、T48N、T48S、L49G、G53A、I54V、A55C、A55I、A55L、A55M、A55T、A55V、M56I、M56L、S57C、S57E、S57F、S57I、S57L、S57M、S57T、S57V、Y60A、Y60H、Y60I、A62T、A68F、L70M、R72P、L74W、H77Q、I82F、I82L、I82M、V83I、V83L、V83T、N85D、N87F、N87H、N87I、N87K、N87L、N87M、N87Q、N87R、N87V、N87W、N87Y、S88K、S88T、L90F、L90K、L90Y、F92G、F92I、F92K、F92L、F92N、F92Q、F92V、F92Y、A97C、A97E、A97F、A97G、A97L、A97P、A97Q、A97S、A97T、A97V、S98A、S98D、S98E、S98L、S98M、S98N、S98Q、S98T、S98V、S101A、S101C、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、S101Y、A102V、N105D、R108C、R108E、R108H、R108K、R108N、R108P、R108Q、R108S、R108T、R108V、T109A、T109F、T109G、T109K、T109L、T109N、T109R、T109Y、S110D、S110G、S110H、S110K、S110N、S110R、S113A、S113K、S113N、S113P、S113Q、S113R、S113T、S113Y、A114K、A114L、A114S、A114V、A117F、A117G、A117L、A117N、A117Q、A117S、A117T、A117Y、L119I、L119M、A121S、N122A、N122E、N122H、N122P、N122R、N122S、A125S、A127M、A127S、A127V、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、R138E、R138L、I139A、I139T、S140A、Q142D、Q142E、Q142H、Q142L、Q142W、I143N、I143R、T145S、K147F、K147G、K147N、K147Q、G149A、G149C、G149D、G149N、G149S、G149T、G149V、V150I、V150L、T153L、H156N、T157A、T157G、D158E、D158I、D158K、D158L、T160K、T160Q、T160R、T160S、T160V、F161V、F161W、N162E、N162H、N162P、N162R、T163I、T163S、P164E、P164H、P164N、P164R、P164S、P164T、Q167I、Q167T、Q167V、V170L、E173R、A174K、A174R、V177A、P179Q、S181A、S181C、S181R、Q182T、A184C、A184G、A184S、I185A、I185E、I185G、I185L、I185Q、I185R、I185S、I185Y、Q189I、Q189L、Q189V、N190S、S193E、S193F、S193H、S193K、S193N、S193P、S193T、S193V、T194G、T194S、T195F、V198A、V200L、D203N、D203R、D203V、N204A、N204K、N204R、N204S、T206G、T206K、T206L、T206P、T206R、F208G、F208L、F208R、F208T、A209V、N211F、N211I、N211L、N211M、N211V、S212F、S212L、S212M、P213N、P213R、A216L、A216P、A216S、A216T、A216V、I217S、S218A、V219F、V219I、V219K、V219L、V219R、T221S、I222L、S223A、S223C、M225L、L227R、W228F、V229C、V229I、V229L、N231L、N231Q、N231S、R236C、R236E、R236H、R236K、R236Q、Q237R、N241P、V242T、N243P、A246D、A246K、A246S、A246T、D249I、D249M、D249N、D249S、D249T、F250I、F250L、F250V、F250Y、R251A、R251E、R251I、R251K、R251L、R251Q、R251T、R251V、S252T、N253S、N253Y、N254R、R255E、R255G、R255L、R255M、R255S、R255V、R255W、R255Y、Q258P、P8T、L31M、

G38D、S95N、V126I、L137M、V165I、I169C、I169L、I169V、A172T、L191F、L191V、P192A、K197L、K197R、K197T、K197V和K197Y。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述氨基酸取代选自下组:S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、S1A、S1G、S1M、S1R、N2R、Q5E、N9A、N9E、N9S、R12K、S13L、S13R、A14K、A14S、L15I、T16E、T17A、T17C、T17G、T17H、T17K、T17L、T17Q、T17S、D18R、P20T、F21W、S22A、S22I、S22K、S22P、S22R、S22V、V23L、V23T、A24S、A24V、T25A、T25F、T25H、T25Q、T25R、T25V、Y26K、Y26L、Y26T、R30K、S32K、S32M、S32Q、S32Y、V33G、V33Q、V33T、S34R、V40T、G46L、G46S、T48N、T48S、L49G、G53A、I54V、A55L、A55V、M56I、M56L、S57I、S57M、S57V、Y60A、Y60H、Y60I、A62T、A68F、L70M、R72P、L74W、H77Q、I82F、I82L、I82M、V83T、N85D、N87F、N87H、N87I、N87K、N87L、N87M、N87R、N87V、N87W、N87Y、S88K、S88T、L90F、L90K、L90Y、F92G、F92I、F92K、F92L、F92N、F92Q、F92V、F92Y、A97F、A97G、S98A、S98D、S98E、S98L、S98M、S98N、S98Q、S98T、S98V、S101A、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、A102V、N105D、R108C、R108E、R108H、R108K、R108N、R108P、R108Q、R108S、R108T、R108V、T109F、T109K、T109L、T109N、T109R、S110G、S110H、S110R、S113A、S113K、S113N、S113P、S113Q、S113R、S113T、S113Y、A114K、A114L、A114S、A114V、A117G、A117N、A117Q、A117S、L119I、L119M、A121S、N122A、N122E、N122H、N122P、N122R、N122S、A125S、A127M、A127S、A127V、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、R138E、R138L、I139A、I139T、S140A、Q142L、Q142W、I143N、I143R、T145S、K147F、K147G、K147N、K147Q、G149A、G149C、G149S、G149V、V150I、V150L、T153L、H156N、T157A、T157G、D158E、D158I、D158K、D158L、T160K、T160Q、T160R、T160S、T160V、F161W、N162E、N162H、N162P、N162R、T163S、P164S、Q167T、Q167V、V170L、E173R、A174K、A174R、V177A、P179Q、S181A、S181C、S181R、Q182T、A184S、I185L、I185Y、Q189I、Q189L、Q189V、N190S、S193E、S193F、S193H、S193K、S193N、S193P、S193T、S193V、T194G、T194S、T195F、V198A、V200L、D203N、D203R、D203V、N204A、N204K、N204R、N204S、T206G、T206K、T206L、T206P、T206R、F208G、F208L、F208R、F208T、A209V、N211F、N211I、N211L、N211M、N211V、S212F、S212L、S212M、P213N、P213R、A216L、A216P、A216S、A216V、I217S、S218A、V219F、V219I、V219K、V219L、V219R、T221S、I222L、S223A、S223C、M225L、L227R、W228F、V229C、V229I、N231L、N231Q、N231S、R236C、R236E、R236K、R236Q、Q237R、N241P、V242T、N243P、A246D、A246K、A246S、A246T、D249T、F250I、F250Y、R251I、R251K、R251V、S252T、N253Y、N254R、R255E、R255G、R255L、R255M、R255S、R255V、R255W、R255Y和Q258P。

7. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述氨基酸取代选自下组:S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、N2R、T17A、T17C、T17G、T17H、T17K、T17L、T17Q、T17S、P20T、F21W、V23L、V23T、A24S、A24V、V40T、G46L、G46S、L49G、A55L、A55V、S57I、S57M、S57V、H77Q、V83T、A97F、A97G、S101A、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、A102V、T109F、T109K、T109L、T109N、T109R、S110G、S110H、S110R、A114K、A114L、A114S、A114V、A117G、A117N、A117Q、A117S、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、I139A、I139T、S140A、Q142L、Q142W、I143N、I143R、G149A、G149C、G149S、G149V、F161W、T163S、P164S、Q167T、Q167V、A184S、I185L、I185Y、T195F、I222L、L227R、W228F、V229C、V229I、D249T、F250I、F250Y、R251I、R251K和R251V。

8. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述氨基酸取代选自下组:N2E、2F、N2L、N2S、

P8T、T17I、T17M、T17N、T17R、P20D、P20E、P20I、P20Q、F21Y、A24D、A24G、A24H、A24N、A24T、Y26C、L31M、G38D、G46E、G46N、G46R、A55C、A55I、A55M、A55T、S57C、S57E、S57F、S57L、S57T、V83I、V83L、N87Q、S95N、A97C、A97E、A97L、A97P、A97Q、A97S、A97T、A97V、S101C、S101Y、T109A、T109G、T109Y、S110D、S110K、S110N、A117F、A117L、A117T、A117Y、V126I、L137M、Q142D、Q142E、Q142H、G149D、G149N、G149T、F161V、T163I、P164E、P164H、P164N、P164R、P164T、V165I、Q167I、I169C、I169L、I169V、A172T、A184C、A184G、I185A、I185E、I185G、I185Q、I185R、I185S、L191F、L191V、P192A、K197L、K197R、K197T、K197V、K197Y、A216T、V229L、R236H、D249I、D249M、D249N、D249S、F250L、F250V、R251A、R251E、R251L、R251Q、R251T和N253S。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述变体Bhr-PETase酶在所述位置的一个、所述位置的两个、所述位置的三个、所述位置的四个、所述位置的五个、所述位置的六个、所述位置的七个、所述位置的八个、所述位置的九个、所述位置的十个、所述位置的十一个、所述位置的十二个、所述位置的十三个、所述位置的十四个、所述位置的十五个、所述位置的十六个、所述位置的十七个、所述位置的十八个、所述位置的十九个或所述位置的二十个处具有一个或多个氨基酸取代。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述变体Bhr-PETase包含选自下组的氨基酸取代组:A102V/T136M、A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K、D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E、D18R/I139A/F161W/W228F、D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P、D18R/I54V/I82F/R108T/V150I/N253Y/N254R、D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I、D18R/M56I/I139A/L227R/W228F、D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L、D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203N/N254R、D18R/N85D/R108T/L119I/N190S/T194S、D18R/V40T/I139A/D203N、D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N、D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N、G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P、I143R/Q167T/V198A/W228F、I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N、L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N、M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P、M56I/S88T/R108T/N190S/L227R、N204A/Q237R、N9A/D18R/M56I/N85D/L119I/N254R、N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L、N9A/S22A/Q167T、N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L、N9S/T25H、Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y、Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q、R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N、S101F/T136A、S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T、S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E、S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E、S22A/I54V/R72P/F92Q/V150I/V200L、S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S、S22I/Y26K、S27T/I82L/P213N、S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T、S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/T145S/P213N、S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A、S32Y/A62T、S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P、S98Q/A209V、T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200L、T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L、T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N、T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T、T16E/D18R/M56I/V150I/S218A/V219K、T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/

N190S/T194S、T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S、T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167T/D203N、T16E/D18R/S88T/R108T/W228F、T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P、T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N、T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L、T17A/I82L/F92Y/P213N、T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/S140A/I143N/G149A/Q167V、T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T、T17A/Q167V、T17A/S27T、T17A/S27T/I82L、T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N、T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/S27T/I82L/P213N、T17A/S27T/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/I82L/S252T、T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N、T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N、T17A/S27T/T48S、T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N、T17A/S27T/T48S/A135G/S140A、T17A/S27T/T48S/I82L、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y、T17A/S27T/T48S/P213N、T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V、T17A/T48S/I82L、T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T、T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V、T17A/T48S/P213N、T17K/A125S、V177A/A216L、L90F/F92G/D158L/A174R/D203V、V23L/A24V/S32K/N87F/F92Y/A125S/T136A、P20T/L90Y/F92L/S101M/D158E/A174K/I222L、D18R/S32K/Y60H/L90F、P20T/F21W/A24V/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136A、Y60H/S101A/A114K/A117Q/D203R/I222L、S32Q/F92G/S101Q/A114K/Q142W/D158I/D203R/I222L、T17G/L90F/F92L/T109R/A114K/D158E/D203V/I222L、R12K/S32K/F92L/T136A/D158E/A174R、L90F/F92G/T109K/A125S/A174K、S32K/L90F/F92L/T109K/A114K/Q142W、V23T/S32Q/N87I/L90F/F92Y/S101N/A114V/Q142W/A174R/D203R/I222L/V229I、S32Q/F92G/A114V/D203V、R12K/S32K/L90Y/F92L/T136A/A174K/D203V/I222L、R12K/A14K/V23T/L90Y/F92G/S101A/D203R、T17G/S32M/L90Y/F92Y/D203R/A216P、S32Q/F92L/A114V/A125S、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/A114K/A125S/T136V/D158E/A174K/D203V/I222L、R12K/F21W/S32K/F92L/T109K/A125S/T136V/D158E/D203R、T17Q/L90Y/F92L/A174K/D203V/I222L、F21W/F92L/S101A/A117Q/D203R、T17A/S32M/Y60H/Q142L/D203V/I222L、R12K/Y60H/L90F/S101R/A114V/A117N/D158E、T17S/D18R/L90Y/F92G/A114V/A117Q/D203R、L90Y/F92L/S101A/S110R/A125S/Q142W/A174R/A216P、S32M/S110R/A125S/D158E、R12K/V23L/A24V/F92G/T136V/D203R、A24V/S32Q/F92L/T136V、S32K/L90Y/F92G/A114K/D203V、S32M/L90F/F92G/A114V/A117N/A125S/A174K/D203R、R12K/T17A/V23L/A24V/L90F/F92G/S101N/A125S/Q142W/D158I/D203R、P20T/F21W/Y60I/S101A/T109K/A174K、T17C/L90Y/F92L/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R、T17Q/L90F/F92G/S101M/A117Q/T136A/D158I/A174R、V23L/L90F/F92G/A125S/D203V/I222L、T17C/L90Y/F92L/A125S/T136V/D158E/A174K、V23L/S32Q/Y60I/A117Q/T136A/A174K/V229C、V23T/L90F/F92Y/D203V、R12K/A24V/Y60H/A174R、T17G/P20T/Y60I/F92G/D203V、L90Y/F92L/S110R/A125S/D158E/D203V、T17Q/L90Y/F92L/T109L/T136A/D158E/A174R/D203V/V229C、R12K/V23T/A24V/S32Q/F92G/D158L/A174R/

D203R、S32M/N87Y/L90F/F92G/A174K/D203V、T17S/V23L/S32Q/L90F/F92L/A114K/A117N/A125S/T136V/D158E/D203V/V229I、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/T109L/S110R、A14K/S32M/L90Y/S101R/A114V/T136A/A216P、P20T/F21W/L90Y/F92G/A125S/A174K/V229I、V23L/S32K/L90F/F92L/S101R/T109R/T136V/I222L、A24V/F92L/Q142L/A216P、F92G/A125S/T136A/D158E/A216P、N87R/F92G/A117N/D203V/A216P、R12K/A14K/F92G/S110R/A117N/A125S/A174R/D203R、S32Q/N87F/L90F/F92G/S101M/A114V/A117Q/D203V、T17Q/A24V/N87M/F92G/A114K/A117N/D158E/D203R/I222L、N2R/S32Q/L90F/F92G/Q142L/D203V、A14K/S32Q/L90F/F92G/A114K/A117N/A174R/D203V/A216P/I222L、R12K/P20T/D158E/D203R/I222L、N2R/A14K/T17A/L90F/F92G/S101H/A174R/D203V、T17G/A24V/L90F/F92G/Q142W、S32K/L90Y/F92Y/S101A、V23T/N87I/F92G/A125S/T136A/D158L/D203R、T17S/N87L/V229I、A24T/L90F/F92L/A125S/T136A/D203V、R12K/A14K/F92G/T109R/T136A/Q142L/D158E/A174K/D203R/I222L、A24V/S32Q/Y60A/T136A、D18R/S32Q/N87H/L90Y/F92G/S101K/Q142L/D158I/A174R、T17A/F21W/S32K/N87F/L90F/F92Y/S101Q/T136A/D203R、A24V/L90F/F92G/A114V/A117N/T136V/Q142L/D203V/V229C、T17Q/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/T136V/Q142L/D203V/A216P、S32Q/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136V、Y60H/N87K/A114K/A117Q/D158E/A174K/A216P、P20T/L90Y/T109K/T136A/D158I/D203R、T17L/Y60A/D203V、N2R/S32Q/L90Y/F92Y/T109K/D203V、T17H/A24V/S32Q/L90Y/F92L/S101H/A114K/D158I/A174R/D203V、N2R/S32M/F92Y/T109K/S110R/I222L、P20T/F92Y/S101K/A125S/D158E/D203R、R12K/A14K/P20T/F21W/S32M/F92L、R12K/A14K/V23T/A24V/L90F/F92L/S101W/T136A/D203V、T17L/S32K/F92L/T109L/A114V/T136V/D158L/R236H、P20T/F21W/S32Q/N87F/F92L/D158E/D203V、F21W/L90F/F92G/S101A/A114V/A125S/T136V/Q142L/D203V/A216P、P20T/F21W/S32K/F92G/A125S/V229I、V23T/A24V/L90Y/F92G/A125S/T136V/D203V、P20T/S32K/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R/A216P、V23L/L90F/F92L/T136A/D203R/I222L、R12K/A14K/A24V/N87L/L90Y/A125S/T136V/A216P、P20T/F21W/L90Y/A125S、N2R/L90Y/A114K/A117Q/D203V/V229I、F21W/S32K/L90Y/A125S/D158E/A216P/V229I、S27L/T136V、S27L/P8T/T17Q/F21W/S101A/T136V/Q142L、S27L/N2R/T17L、S27L/V23T/A24V/T136A/Q142W、S27L/F21W/T136V、S27L/T17Q/T109K/A114K/T136V/V229I、S27L/T17Q、S27L/T136V/I222L/V229C、S27L/T17A/A114V/A117N/T136A、S27L/亲本、S27L/N2R/T136A、S27L/N2R/T17A、S27L/T17C/S101A/T136V、S27L/P20T/T136A、S27L/T136V/Q142W/V229I、S27L/T109K/T136V/I222L/V229I、S27L/T17L/S101H/A117N/Q142L/I222L/V229I、S27L/S101Q/T109L/A117N/T136A/Q142L、S27L/T109K/S110R/S193N/S252T/R255M、S27L/S22R/Y26K/R236Q、S27L/L90F/F92L/S98E/S113Y/A114K/T136A/D158E/S181R/T206G/S212M/V219I、S27L/N9S/S22P/T48N/L90Y/F92G/T109K/S110R/T136A/Q189V/N211F/R236Q、S27L/T17A/Y26L/T48N/I82M/S101D/R236Q、S27L/Y26T/S101D/D158E/V219I/S252T、S27L/S13R/S98E/T136V/S181R/T206G/V229I/N231S、S27L/F21W/F92L/S98N/S193P/I222L、S27L/S1G/Y26K/L90Y/S113Y/A114V/T136A/Q189V/N204R/N211L/R236Q、S27L/S22K/I82L/L90Y/F92G/R108S/A117N/D158E/S193N、S27L/S1G/N9S/T48S/L90Y/S98T/S101A/S113N/A114K/L119M/S193N/T206G/S252T、S27L/N9E/R12K/S22P/V23L/T160R/D203R/I222L、S27L/N9E/R12K/S22P/V23T/T48S/S98E/R108S/T160S/Q189V/T206G/S212L/V229I、S27L/S1A/N2R/N9S/T48N/L90F/F92L/D203V/

S223A、S27L/N9E/R12K/V23T/I82M/L90Y/F92L/T136V/N204K/N231S/R255M、S27L/S1G/N9S/S22V/I82F/L90Y/F92L/A117N/L119M/Q142L/T206G/S212L/S223A、S27L/N9S/Y60H/R108C/S193P/V219L、S27L/N9E/S22K/S32M/L90F/F92G/R108T/L119M/Q189V/I222L/S223A/R236Q、S27L/T17Q/F92G/S98N/Q142L/Q189L/R236C、S27L/N9E/R12K/Q142W/T160Q/T206G/S212M、S27L/Y26T/S113N/A114V/T136A/D158E/D203R/N211F/R236Q/S252T/R255M、S27L/S1A/T17H/S22V/L90Y/F92G/S98E/A114V/T136A、S27L/N9E/T48S/I82M/L90Y/F92L/N122A/A127S/T160S/A174R/T206G/S212L/R255M、S27L/N9S/S22P/V23L/L90Y/F92G/A125S/T160S/N204R/I222L/S223A/R236Q、S27L/N9E/S22P/T48S/L90Y/F92L/T109R/E173R/A174K/D203V/S223A、S27L/R12K/Y26K/T48N/I82L/L90F/A125S/N211I/A216P、S27L/N9S/R12K/F92Y/T109K/S110R/T160K/Q189L/S223A/S252T/R255M、S27L/S1A/N2R/N9E/R12K/S32K/N87F/R108T/N211I/V219K/R255M、S27L/L90F/F92G/N122A/T136A/T160V/E173R/D203R/S252T、S27L/L90Y/F92G/S98T/T109L/D158I/S193K/V219K/R236Q/S252T、S27L/N9E/R12K/T48N/L90F/S98L/R108Q/A117Q/T136A/T206G/S212F/V219I/V229I/R255L、S27L/S1A/S22V/N87K/R108K/N122E/D158E/S193P/V219I/R255M、S27L/F21W/Y26T/S34R/R108H/L119M/N211M/R236C/S252T、S27L/S1A/N9E/R12K/V23T/T48S/N87H/S101Q/Q189L/N211M/V219I/R236Q/R255M、S27L/N9S/T25Q/L90Y/S101D/T136A/Q142L/Q189L/R236Q、S27L/A14K/I82F/F92G/S98E/R108C/A117N/L119M/Q189V/T206G/I222L/S223A、S27L/T17C/Y26T/N87V/R108C/N122E/T136V/S193P/S252T/R255M、S27L/L90Y/F92G/T109L/N122S/R255M、S27L/R12K/L90Y/T160V/A174R/R236Q、S27L/N9E/R12K/T48N/L90Y/F92G/S98T/S113R/N122R/A127S/T136A/A174K/N204K/S212L、S27L/V23T/L90Y/F92G/S98E/T109L/A125S/T160V/A174K/S181C/S193K/T206G/S212M/R255M、S27L/A24V/F92G/S101D/A114V/A117N/A125S/T136V/D203R、S27L/R12K/S32Q/S101Q、S27L/L90F/F92G/T136V/A174R/D203R、S27L/P20T/S32K/L90Y/D203V、S27L/N2R/A14K/T17S/L90Y/T109K/T136V/A216P、S27L/N2R/V23T/A24V/S32M/L90Y/F92G、S27L/A14K/L90Y/F92L/S101D/A117N/D158I/D203R、S27L/F21W/N87H/A114V/A117N/T136V、S27L/N2R/V23T/A24V/N87M/F92L/S101K/A125S/T136A、S27L/L90Y/F92L/S101N/T109R/S110R/Q142W、S27L/S32M/F92G/A216P、S27L/F21W/L90Y/F92L/A114K/A117N/T136A/D203V、S27L/N2R/V23T/S32M/N87M/F92L/T136A、S27L/R12K/L90F/F92G/S101A/D203V、S27L/A24V/L90F/F92G、S27L/R12K/F92L/S101A/A125S/T136A/D203R、S27L/R12K/V23L/L90F/F92L/A114K/T136A/D158E/D203V/I222L、S27L/L90F/F92G、S27L/A14K/P20T/S32Q/L90Y/A125S/D203V、S27L/T17L/L90F/F92G/A125S/A174R/D203V、S27L/N2R/N87K/A114K/A117Q/T136V/D203V、S27L/N2R/A114K/T136V/D203V、S27L/N2R/T17A/T136V/A216P、S27L/N2R/R12K/N87F/T136V/D158E/A174R、S27L/D203R、S27L/R12K/T17Q/T136V/D203V/A216P、S27L/N87F/T109L/Q142L、S27L/N2R/T17Q/A24V/A114K/A117Q/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/N2R/P20T/F21W/N87M/T109R/A117N/A125S/T136V/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/R12K/V23L/A114K/T136A/D158I/D203V/I222L、S27L/N87Y/T136V/D158E/D203V、S27L/T109K/S110R/D203R、S27L/N2R/T17L/A125S/T136A/D158E、S27L/A24V/D158E/A174K/A216P、S27L/T17G/V23L/N87L/A117Q/A125S/T136V/D158E/V229C、S27L/V23L/N87L/T109R/A114K/A117N/A125S/T136V/Q142L、S27L/N87Y/S101A/A114V/A117Q/T136V/A174K/A216P/I222L、S27L/R12K/T109R/Q142L、

S27L/D203V、S27L/T17G/N87F/S101A/D203V、S27L/T17L/N87M/Q142L/D203V、S27L/N2R/R12K/S101D/A117N/T136A/D203V、S27L/R12K/P20T/F21W/A114K/Q142W/D203R、S27L/N2R/T17G/T109L/S110R/A114K/A117Q/T136V/Q142L/D203R、S27L/N2R、S27L/S32K/L90F/F92G/S101M/A114V/A117N/A125S/T136A/D158E/D203V、S27L/R12K/T17A/F21W/S32Q/Y60H/D203R、S27L/R12K/F92L/S110R/T136V/I222L、S27L/A14K/V23T/A24V/L90Y/F92G/A114V/A117Q/Q142L/A174R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S101D/T109K/A125S/T136A/A174K、S27L/V23T/L90Y/F92G/T136A/D203V/A216P、S27L/T17S/L90Y/F92G/A117N/T136A/D158L、S27L/A14K/V23L/A24V/F92L/Q142W/D203V、S27L/T17L/L90F/F92G/S101K/A174K、S27L/L90F/F92L/A125S/T136V/A174K/D203V/A216P/I222L、S27L/R12K/P20T/S32M/L90F/F92G/S101M/A114V/D203V、S27L/T17A/S32Q/L90F/F92L/T136V/Q142W/A174K/D203R、S27L/R12K/S32M/L90F/F92G/S101W/A114V/D158I/I222L、S27L/P20T/S32M/L90Y/F92L/A114V/A117N/I222L、S27L/T17C/L90Y/F92G/T136A/A174K/D203V、S27L/S32Q/N87Y/F92G/T109K/A114K/A117N/T136V/D203V/V229C、S27L/F21W/L90F/F92G/T136V/A174R、S27L/P20T/N87Y/T136A/D203V/I222L、S27L/A24V/L90Y/F92L/D158I/A174K/D203R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S110R/A114K/T136V/D203R/A216P/V229I、S27L/N87H/F92G/D203R、S27L/R12K/S32K/Y60A/A125S/T136V/D158L、S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92L/T136A、S27L/F92L/A114V/D158E/D203R、S27L/S32Q/L90Y/D203V/V229I、S27L/V23T/S32Q/Y60H/T109K/T136V/A216P/I222L、S27L/A14K/A24V/L90F/F92G/T109K/T136V/D158L/A174R/D203V/I222L/V229I、S27L/R12K/N87F/A174K、S27L/P20T/S32Q/Y60H/T109K/A114V/T136A/A174K、S27L/V23T/A24V/Y60A/A125S/A174R/A216P、S27L/F92Y/D158L/I222L、S27L/V23L/A24V/L90Y/F92G/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92G/S101H/T136A/A174K/D203V/V229C、S27L/S32K/N87H/A125S、S27L/P20T/F21W/F92G/A114V、S27L/T17L/V23L/A24V/L90Y/F92L/A117N/T136V/L137M/Q142L、S27L/P20T/L90Y/D203R、S27L/S110R/Q142L/D158I/D203R/V229I、S27L/P20T/S32Q/L90F/F92L/T109K/S110R/A125S/D203V、S27L/V23T/A24V/L90F/F92G/D158E/D203R、S27L/F92G/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/P20T/L90Y/F92G/T109R/S110R/A125S/D203R、S27L/A14K/L90Y/F92L/D158L/A174R/D203V、S27L/F21W/S32Q/L90Y/F92G/T109L/S110R/A117N/D158I/A174K/D203V、S27L/R12K/A114K/A117N/D158E/D203V、S27L/T17S/N87H/T109R/A114K/A117N/T136V/Q142W/D203V、S27L/N2R/N87Y、S27L/T17S/V23T/A24V/S32Q/Y60H/N87K/T136A/D203R、S27L/P20T/F92Y/T109K/D158E/D203V、S27L/S32K/N87M/F92L/S101M/T109L/S110R/D203V、S27L/L90Y/F92G/T136A/D158E/D203V/A216P/V229I、S27L/A14K/S32M/F92L/A125S、S27L/L90Y/F92G/T136V/D158L/D203V、S27L/A24V/L90Y/F92G/S101A/T109L/S110R/A117Q/A174R/D203R、S27L/P20T/S101D/A114V/T136V/Q142W/D158E/D203R/A216P、S27L/N87Y/F92G/S101Q/A114K/A117N/T136A/D158L/D203R/A216P、S27L/V23T/A24V/N87Y/L90Y/F92L/S101D/T109R/A174K/D203R/A216P、S27L/N2R/P20T/F21W/L90F/F92Y、S27L/L90Y/F92G/D158I/D203V/V229C、S27L/S32Q/F92G/Q142W/I222L、S27L/N2R/R12K/S32M/N87Q/L90F/F92L/I222L、S27L/R12K/S32K/F92L/A114V/A117Q/T136A/D158E/A216P、S27L/L90Y/F92G、S27L/R12K/F21W/S32M/F92G/T136V/Q142L/D203R、S27L/R12K/A14K/L90Y/F92L/A125S/A174K、S27L/A24V/A114V/A117Q/T136V/D203V、S27L/R12K/T17Q/V23L/S32M/L90Y/F92G/S101D/T136V/I222L、S27L/V23T/A24V/S32Q/

F92L/S101N/T109L/S110R/D203R、S27L/P20T/Y60H/N87K/T136A/A174R/D203V、S27L/P20T/F21W/L90Y/F92L/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/T17G/F21W/S32K/L90F/F92G/A125S/T136A/A174K、S27L/T17G/N87Y/T136A/D203V/A216P、S27L/F21W/L90F/F92G/S101D/A117N/T136A/A174K/D203V、S27L/R12K/A14K/A24V/L90Y/D203V、S27L/N2R/L90F/F92G/S101M/Q142L/D158L、S27L/N2R/T17C/A24V/N87K/A174K/A216P、S27L/N87M/Q142L/I222L、S27L/F92L/S98T/R108C/A117Q/A127S/Q142L/Q189V/A216P/R236Q、S27L/S22K/F92L/R108H/A127S/T136A/N211I、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109L/A127S/T136V/N204K/S223A、S27L/T17L/L90Y/F92L/S98M/A174K/D203V/N211M/S212L/S223A、S27L/N87K/S98M/N211M、S27L/N9E/S22P/L90Y/N204K、S27L/S32M/T48S/F92G/A127S/Q142W、S27L/T17S/S22K/L90F/F92L/D158E/D203V/V219I/S252T、S27L/L90F/F92L/A127S/D203V、S27L/T25F/L90Y/F92G/N204R/S223A/N231S/R236C、S27L/F21W/S22V/T48S/L90F/F92L、S27L/S1A/S98T/S113K/A114V/L119M/A127S/Q142W/S193K/V219K/S252T/R255L、S27L/A24V/I82L/L90F/F92G/T109L/L119M/A127S/E173R/N204K、S27L/T17C/Y60H/L90F/A127S/E173R/A174R/N204K、S27L/L90F/F92L/Q142W/D203V/S223A、S27L/P20Q/L90Y/Q142L/S223A、S27L/N9S/Y60A/A216P/R236Q/R255M、S27L/F92G/R108C/S110R/A117Q/T136A/N211M、S27L/S22P/Y60H/S98A/S113K/A114K/T136V/Q189L/S193H、S27L/V23L/S98A/Q142L/N211M、S27L/V23L/Y26L/L31M/T48S/F92G/A174R/N204K/S252T、S27L/S13R/A14K/Y26T/T136A/S181R/N211M/S212M、S27L/F21W/I82F/L90Y/F92G/A127S/N211M、S27L/P20T/Y60H/S98L/T136A/R255L、S27L/P20T/S34R/N87M/D158E/S252T、S27L/T25A/L90F/F92G/Q189L/S193P/V229I、S27L/V219L/I222L、S27L/N9E/T48S/L90F/F92L/S98N/R108H/S110R/S113Y/N211V/S212L/S252T、S27L/L90F/F92Y/S113R/V219I/R255L、S27L/F21W/S22K/T48S/F92G/T109R/A127S、S27L/S1G/A14K/P20T/S32K/T48S/L90Y/F92L/T109L/T160R/V219L/I222L/S252T/R255L、S27L/L90F/F92G/D158E/T160R/S193N/N204K/S223A、S27L/A14K/Y26T/F92L/Q142L/S212L、S27L/S22R/L90Y/F92G/V126I/A127S/A174K/N204K、S27L/P20T/T25A/L90F/F92L/A117N/L119M/S252T/R255L、S27L/T17A/A24V/T48S/L90F/F92G/T109R/A127S/T160K/D203R/S223A、S27L/F21W/T48S/T109L/A127S/V219I/R255L、S27L/A14K/S22P/T48S/L90F/F92L/T109L/A127S/Q142L/A174R/N204K/S223A、S27L/T136A/S212M/N231S、S27L/F21W/L90F/F92G/A127S/S223A、S27L/T48S/L90Y/F92L/R108S/S110R/A127S/T136V/E173R/S223A、S27L/T48S/F92G/S98E/Q142L/Q189V/S193P/N204R/S223A、S27L/T17S/L90F/F92Y/S101K/A127S/T136V/N204R/N211I/V229I/N231S、S27L/N9E/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109R/N204K/R236Q、S27L/N9E/S22R/T48S/F92L/S101N/A127S/E173R/N204R、S27L/S22K/N87F/A117Q/S181C/N204K/N211M/V229I/N231S/R236Q、S27L/N9S/T48S/L90F/F92G/S101N/A127S/N204K/A216P/S252T/R255M、S27L/I82L/S193H/N211M/S212F/S223A、S27L/A14K/P20T/T48S/L90F/F92G/S98N/R108C/T136A/N204K/N211L/S212L/R236Q/S252T、S27L/S13R/T17L/T25Q/L90F/F92G/R108C/A127S/T160R/I222L/R255L、S27L/T48S/L90Y/F92G/T109L/S193N、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92L/S98E/A127S/T136A/N204K/A216P/S223A、S27L/V23L/N87H/F92L/R108C/S110R/N122A/T160S/Q189L/S193P/N204K/S223A/R255L、S27L/F92G/A127S/A174R/S223A/V229I/N231S/R236C、S27L/S1G/L90Y/A127S/E173R/S223A、S27L/F92Y/S98N/Q142W、S27L/P20T/S32M/S34R/T48S/L90Y/F92L/R108K/A127S/Q142W/A174R/N204K/V219I/S252T、S27L/F92G/

A127S/Q189V/S193N/S223A、S27L/S34R/F92G/S110R/D158L/D203V/R255M、S27L/N9E/F21W/T48S/F92G/T109L/A127S/R236C、S27L/S1A/S22P/T48S/L90Y/F92G/A127S/E173R/A174R/N204K/S223A、S27L/S22K/T48S/T160S/N204K、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92G/S98V/R108C/A127S/N211L/S212M/N231S/R236C、S27L/V23L/A24V/A114K/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/V23L/S101H/T109K/A114K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17L/F21W/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17S/T136V/Q142L/I222L/V229C、S27L/T17C/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/P192A/S193H/N204K/S223A/V229I/N231S/R236Q/R255L、S27L/N9E/T48N/N87H/F92L/A174K/Q189L/S193K/N204R/V219I、S27L/A14K/V23L/Y26L/L90F/F92G/S98E/S113K/A114K/T136A/V229I/N231S、S27L/L90Y/F92L/S101D/A117N/Q142L/S193N、S27L/S22K/T25A/L90Y/Q142L/E173R/N204K/S223A、S27L/P20T/L90Y/T109L/A127S/A174K/V229C、S27L/S22V/L90Y/F92L/A117Q/R236C/R255L、S27L/V23L/A24G/Y26T/I82F/L90Y/F92G/R108H/T136A/D158L/T160K/D203V、S27L/A14K/S22K/F92G/A127S/N204K/V229I、S27L/S22V/L90F/F92G/A127S/A174R/A216P/R236C、S27L/V23L/Y60A/S98T/T109L/A127S/T136V/T160Q/N204K/S223A/R255L、S27L/S13R/L90Y/S98L/T160V/Q189L/S193P/A216P/S252T/N253S/R255L、S27L/S22R/I82M/F92L/T109L/A127S/Q142W/Q189L/S223A、S27L/S1G/Y60A/L90F/F92L/N122E/T136A/N204K/S223A/N231S、S27L/S32K/F92G/S98L/R108Q/S110R/R255L、S27L/L90Y/F92G/L119M/A127S/A174R/S252T、S27L/L90F/S110R/S181R/N211F、S27L/A14K/S22P/Y60H/S110R/N122S/D158I/N204K/S223A/R255M、S27L/F92L/S98V/T109L/N122A/E173R/R255L、S27L/S22R/N87L/F92G/R236C、S27L/S32M/S34R/I82L/F92G/N204K/S223A、S27L/A24V/T25Q/Y60I/A127S/A174K/N204K/V219I/S223A/S252T/R255M、S27L/S98V/T136A/N211F、S27L/N9S/L90F/F92L/A127S/N204R/S212M、S27L/S22R/T48S/F92G/R108H/S110R/A127S/E173R/N204K/S223A/R236Q、S27L/A14K/L90Y/F92G/A127S、S27L/A14K/T48S/F92G/E173R/N204R/S223A/N231S、S27L/L90Y/T109R/S113N/V219L/I222L、S27L/N9S/T48S/L90Y/T136A/T206G/S223A、S27L/S22K/T48N/L90F/F92G/N204K/S223A/V229C/N231S、S27L/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/N204R/S223A、S27L/S1G/P20T/S32K/S34R/T48S/N87F/S98A/A127S/T136A、S27L/F21W/S22R/S98E/Q142L/T160V/S223A/S252T/R255L、S27L/P20T/T48S/F92Y/R108K/S110R/A127S/V219L/S223A/V229I/R236Q、S27L/Y26T/L90Y/F92L/A127S/V219L/S252T/R255L、S27L/N9S/F21W/T48S/F92L/A127S/D203V/S212F、S27L/F21W/Y60H/S98E/L119M/D158E/R236Q、S27L/F21W/S22R/L90F/F92L/N122S/Q142W/R236Q、S27L/F21W/T48S/L90F/F92G/T109K、S27L/L90Y/F92L/T109R/A127S/E173R/N204K/S223A、S27L/N9S/F21W/T48S/L90Y/F92G/A127S/N204K/V219I/R255M、S27L/N9E/I82F/L90Y/F92L/S95N/T109L/A127S/A174R/S223A、S27L/L90F/F92L/S98L/N204K/A216P、S27L/A24V/T48S/A117Q/N211M/S212M/S223A、S27L/L90Y/F92G/T109L/A127S/N204R/S223A、S27L/N2R/S32Q/N87K/A125S/V219L、S27L/S22P/T48S/L90F/F92L/S193N/V219L/S223A、S27L/T25Q/L119M/N211M/R236Q、S27L/L90Y/F92G/N122S/A127S/E173R/A216P/R236Q、S27L/P20T/S32K/L90F/F92G/N122E/D158E/T160S/Q189L/S223A/S252T、S27L/N9S/F21W/T48S/N87H/L90F/F92L/S113N/V229C、S27L/T25Q/I82L/L90F/F92G/S98L/S113R/A114V/T136A/S181R、S27L/P20T/R108Q/S110R/D203V/N211I、S27L/S1G/N2R/P20T/

Y26T/S32M/T48S/L90Y/F92L/A127S/N204R/V219L、S27L/A14K/P20T/T48N/L90F/F92G/A117Q/A127S、S27L/N9S/T48N/L90Y/F92L/S98M/T109K/A127S/N204R/N211I/S212L/V219I、S27L/F21W/S22R/T48S/L90F/F92L/R108Q/A174K/N204K/S212F/S223A、S27L/S22R/Y60H/S98T/T136V/S193K/R236Q、S27L/S22K/Y26K/N87Y/L90Y/F92G/T109R/A127S/S252T/R255L、S27L/L90F/F92L/T109L、S27L/F21W/F92L/N204K/S252T/R255L、S27L/V23L/L90Y/F92G/A127S/S193K/N204R/V219I/R236C/R255L、S27L/F21W/L90Y/F92G/A114V/N122S/A127S/N204K/S223A/S252T、S27L/P20T/Y60A/T109L/Q189L/S212L、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92G/N204K、S27L/S22V/S32K/T48S/I82F/F92G/A127S/N204K/S223A、S27L/A55L、S27L/A97V、S27L/F250L、S27L/T109G、S27L/G38D、S27L/A97S、S27L/A55V/A216T、S27L/P20D、S27L/A55V、S27L/T109Y、S27L/V165I、S27L/A184G、S27L/A97E、S27L/A184S、S27L/A97F、S27L/A97T、S27L/K197Y、S27L/A55I、S27L/A97P、S27L/A55M、S27L/P20E、S27L/A117L、S27L/T109L、S27L/K197T、S27L/T136S、S27L/A97L、S27L/T109A、S27L/P20I、S27L/L191V、S27L/A184C、S27L/A97Q、S27L/F250V、S27L/K197V、S27L/A117S、S27L/K197R、S27L/T109K、S27L/A55C、S27L/N2S/V177A、S27L/Q142D、S27L/G149C、S27L/F21Y、S27L/G149A、S27L/P164E、S27L/Y26C、S27L/T17N、S27L/S57M、S27L/D249I、S27L/T17S、S27L/P164T、S27L/Q142L、S27L/D249N、S27L/I185R、S27L/V83L、S27L/G149S、S27L/A24D、S27L/R251V、S27L/V83I、S27L/S110N、S27L/T17M、S27L/F161W、S27L/G46E、S27L/D249T、S27L/T17I、S27L/S57C、S27L/S57T、S27L/S57L、S27L/Q167T、S27L/S57E、S27L/T17K、S27L/G149N、S27L/Q142E、S27L/S57F、S27L/T17A、S27L/P164H、S27L/T17R、S27L/G149T、S27L/R251T、S27L/S101Y、S27L/S57V、S27L/A24T、S27L/I185E、S27L/G46N、S27L/P164N、S27L/P164S、S27L/Q167V、S27L/F161V、S27L/S57I、S27L/G149D、S27L/Q167I、S27L/I185Q、S27L/N2L/T17I/T136S/P164H/D249M、S27L/P20E/F21Y/I139T/P164H/K197T/R251E、S27L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/A24V/S101Q/T109R/A117Q/I222L/V229I、S27L/S110D/A184S/K197T、S27L/T136S/D249T、S27L/F21Y/A184S、S27L/N2F/P20E/S110D/A184S/L191V/R251V、S27L/T17G/V23T/A24V/T109L/A117Q/T136A/I222L/V229I、S27L/P20D/F21Y/A55T/F250L/R251V、S27L/T109R/A117N/I222L/V229C、S27L/F21Y/A55T/T109A/A184S、S27L/V23L/A24V/S101K/A117N/I222L/V229C、S27L/S110K/A117Y/P164R、S27L/I139T/Q142E/I169V、S27L/A24H/R251V、S27L/F21W/A114V/T136A/I222L/V229I、S27L/N2S/A55V/I185Q/R251E、S27L/N2F/S101Y/Q142L/G149T/Q167I/I169C/V229L、S27L/N2F/S101C/A117F/P164S、S27L/Q142H/I185S/R251A、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/G46R/T109K/T136S/D249T、S27L/N2E/G46N/A55V/I185Y/D249I、S27L/V83L/F250V/R251E、S27L/F21W、S27L/S57C/R251E、S27L/V23L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/A24N、S27L/T17A/P20T/S101Q/T109K/S110R/T136A/I222L/V229C、S27L/P164T/V165I/R251E、S27L/F21Y/G46E/A117T/T136S/G149C/R251Q、S27L/G46N/I139T/Q142E/P164T/I185A/V229L/F250V、S27L/V23L/T136A/I222L/V229I、S27L/V23T/A24V/T109K/A114K/A117Q/T136A/I222L/V229C、S27L/F250L/R251Q、S27L/P20E/F21Y/S57T/P164N/A184C/V229C、S27L/P20T/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/V83L/A97S/A184C/D249S、S27L/P20T/S101H/A114V/A117N/I222L/V229I、S27L/N2E/R251L、S27L/P20E/F21Y/S110D/A117S、S27L/T17A/V23T/A24V/T136A、S27L/P20D/S57E/S101C、S27L/N2S/V83L/A184S、S27L/T17S/S101N/T109K/A117N/

T136V/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20D/A55T/A117Y/K197R、S27L/P20T/I222L/V229C、S27L/T17I/A24D/S57I、S27L/N2F、S27L/T109K/A117N/T136V/I222L/V229C、S27L/N2L/A24T、S27L/N2F/P20I/F21Y/R251Q、S27L/N2F/G46E、S27L/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/K197R/R251E、S27L/T17S/R251T、S27L/P20I/F21Y/A117F/I185G/D249N、S27L/T17L/S101M/T109K/S110R/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229C、S27L/V229I、S27L/T17A/F21W/S101Q/I222L/V229C、S27L/T17S/F21W/Q142L、S27L/T17L/T109L/S110R/A117Q/I222L/V229I、S27L/F21W/T136A、S27L/P20E/F21Y/G46E/V83L/A97Q、S27L/P20T/F21W/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17G/F21W/A117N/I222L/V229I、S27L/F21W/T109K/S110R/T136A/V229I、S27L/T17C/T109K/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/T109L/S110R/A117N/I222L/V229I、S27L/A24N/P164S/K197V/R251T、S27L/V23L/A117Q、S27L/A55V/V83L/A117T、S27L/P20D/G46S/A55I/K197T、S27L/A117Y、S27L/F21W/S101M/I222L/V229C、S27L/N2L/T17N/S57C/S110D/A117L/P164N/I185G/V229L/R251T、S27L/N2E/G46S/V83L/T136S/A172T/V229C/D249N、S27L/P20T/T109R/A114K/A117Q/T136V/I222L/V229C、S27L/V23L/A24V/T136A/Q142W/I222L/V229I、S27L/N2L、S27L/T17A/F21W/T109R/S110R/I222L/V229I、S27L/T17C/A114K/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/V23L/I222L/V229C、S27L/S101N/A117Q/I222L、S27L/N2E/P20I/T109L/L191V/K197L/V229C、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2L/G46E/T109K/F161V、S27L/T17S/V229I、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229I、S27L/N2L/A172T、S27L/P20D/F21Y/F250V、S27L/N2L/A24H/A55C/V229L、S27L/N2L/P20E/F21Y/V229L、S27L/V23T/T109L/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20T/F21W/I222L/V229C、S27L/T17H/F21W/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/G46E/A55I/Q142E、S27L/N2F/R251Q、S27L/F21W/Q142L/I222L/V229C、S27L/I222L/V229I、S27L/P20T/S101M/A114V/A117N/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/A24V/S101W/T136A、S27L/N2S/P20D/A97C/A117F/F250L/R251E、S27L/S101M/A114V/A117Q/T136A、S27L/T163I、S27L/S101Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229C、S27L/S101M/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/A24V、S27L/A24D/K197L、S27L/T17H/S110K、S27L/P20T/F21W/V229I、S27L/T17G/P20T/F21W/A117Q/I222L/V229C、S27L/F21W/A24V/A114V/A117Q/Q142W/I222L/V229C、S27L/P20T/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/N2F/D249N/F250L、S27L/V23T/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20E/A24D/D249S/F250V、S27L/A24D/S110K、S27L/T109R/I222L/V229I、S27L/P20E/F21Y/K197T、S27L/T17A/V23L/S101M/T109K/S110R/A114V/A117Q/T136V/V229I、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229I、S27L/P20T/V23T/A24V/T109L/S110R/I222L/V229I、S27L/A24D/L191F/R251Q、S27L/A24D/T136S/F250V、S27L/P20T/F21W/T109L/T136A/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2E/I169L/F250L/R251Q、S27L/N2S/A24N/G46E/A55L/Q142D/V229C/R251L、S27L/N2E/P20E/F250V/R251L、S27L/N2F/P20E、S27L/A24V/V229C、S27L/P20D/F21Y/G46N/S110K/T163I/Q167V、S27L/P20T/T109K/A114K/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/S101D/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/Q142W/I222L/V229C、S27L/A24D/T109L/K197L、S27L/T17Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17A/A24V/S101D/S110R/T136A、S27L/P20T/F21W/T109R/A117Q/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/P20T/F21W/T109K/A117N/I222L/V229C、S27L/P20T/S101M/I222L/V229I、S27L/N2S/A24D/S101Y/P164E/V165I/I185E、S27L/

T17N/A117S/V229L/R251A、S27L/S101W/A114V/T136V/V229C、S27L/P20D/G46N/A55C/S110N/T163I/A184S、S27L/A24H/G46E、S27L/T17H/S101Q/T136V/Q142L/V229C和S27L/V23T/A24V/I222L/V229C。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述变体Bhr-PEase包含选自下组的氨基酸取代组:A102V/T136M、A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K、D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E、D18R/I139A/F161W/W228F、D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P、D18R/I54V/I82F/R108T/V150I/N253Y/N254R、D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I、D18R/M56I/I139A/L227R/W228F、D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L、D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203N/N254R、D18R/N85D/R108T/L119I/N190S/T194S、D18R/V40T/I139A/D203N、D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N、D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N、G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P、I143R/Q167T/V198A/W228F、I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N、L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N、M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P、M56I/S88T/R108T/N190S/L227R、N204A/Q237R、N9A/D18R/M56I/N85D/L119I/N254R、N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L、N9A/S22A/Q167T、N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L、N9S/T25H、Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y、Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q、R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N、S101F/T136A、S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T、S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E、S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E、S22A/I54V/R72P/F92Q/V150I/V200L、S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S、S22I/Y26K、S27T/I82L/P213N、S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T、S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/T145S/P213N、S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A、S32Y/A62T、S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P、S98Q/A209V、T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200L、T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L、T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N、T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T、T16E/D18R/M56I/V150I/S218A/V219K、T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/N190S/T194S、T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S、T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167T/D203N、T16E/D18R/S88T/R108T/W228F、T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P、T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N、T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L、T17A/I82L/F92Y/P213N、T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/S140A/I143N/G149A/Q167V、T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T、T17A/Q167V、T17A/S27T、T17A/S27T/I82L、T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N、T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/S27T/I82L/P213N、T17A/S27T/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/I82L/S252T、T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N、T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N、T17A/S27T/T48S、T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N、T17A/S27T/T48S/A135G/S140A、T17A/S27T/T48S/I82L、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S、T17A/

S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y、T17A/S27T/T48S/P213N、T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V、T17A/T48S/I82L、T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T、T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V、T17A/T48S/P213N、T17K/A125S和V177A/A216L。

12. 根据权利要求10所述的组合物, 其中所述变体Bhr-PEase包含选自下组的氨基酸取代组: A102V/T136M、A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K、D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E、D18R/I139A/F161W/W228F、D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P、D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I、D18R/M56I/I139A/L227R/W228F、D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L、D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203N/N254R、D18R/V40T/I139A/D203N、D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N、D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N、G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P、I143R/Q167T/V198A/W228F、I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N、L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N、M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P、M56I/S88T/R108T/N190S/L227R、N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L、N9A/S22A/Q167T、N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L、Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y、Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q、R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N、S101F/T136A、S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T、S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E、S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E、S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S、S27T/I82L/P213N、S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T、S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/T145S/P213N、S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A、S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P、T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200L、T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L、T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N、T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T、T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/N190S/T194S、T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S、T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167T/D203N、T16E/D18R/S88T/R108T/W228F、T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P、T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N、T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L、T17A/I82L/F92Y/P213N、T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/S140A/I143N/G149A/Q167V、T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T、T17A/Q167V、T17A/S27T、T17A/S27T/I82L、T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N、T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/S27T/I82L/P213N、T17A/S27T/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/I82L/S252T、T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N、T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N、T17A/S27T/T48S、T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N、T17A/S27T/T48S/A135G/S140A、T17A/S27T/T48S/I82L、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S、T17A/

S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y、T17A/S27T/T48S/P213N、T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V、T17A/T48S/I82L、T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T、T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V、T17A/T48S/P213N、T17K/A125S和V177A/A216L。

13. 根据权利要求10所述的组合物, 其中所述变体Bhr-PEase包含选自下组的氨基酸取代组: L90F/F92G/D158L/A174R/D203V、V23L/A24V/S32K/N87F/F92Y/A125S/T136A、P20T/L90Y/F92L/S101M/D158E/A174K/I222L、D18R/S32K/Y60H/L90F、P20T/F21W/A24V/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136A、Y60H/S101A/A114K/A117Q/D203R/I222L、S32Q/F92G/S101Q/A114K/Q142W/D158I/D203R/I222L、T17G/L90F/F92L/T109R/A114K/D158E/D203V/I222L、R12K/S32K/F92L/T136A/D158E/A174R、L90F/F92G/T109K/A125S/A174K、S32K/L90F/F92L/T109K/A114K/Q142W、V23T/S32Q/N87I/L90F/F92Y/S101N/A114V/Q142W/A174R/D203R/I222L/V229I、S32Q/F92G/A114V/D203V、R12K/S32K/L90Y/F92L/T136A/A174K/D203V/I222L、R12K/A14K/V23T/L90Y/F92G/S101A/D203R、T17G/S32M/L90Y/F92Y/D203R/A216P、S32Q/F92L/A114V/A125S、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/A114K/A125S/T136V/D158E/A174K/D203V/I222L、R12K/F21W/S32K/F92L/T109K/A125S/T136V/D158E/D203R、T17Q/L90Y/F92L/A174K/D203V/I222L、F21W/F92L/S101A/A117Q/D203R、T17A/S32M/Y60H/Q142L/D203V/I222L、R12K/Y60H/L90F/S101R/A114V/A117N/D158E、T17S/D18R/L90Y/F92G/A114V/A117Q/D203R、L90Y/F92L/S101A/S110R/A125S/Q142W/A174R/A216P、S32M/S110R/A125S/D158E、R12K/V23L/A24V/F92G/T136V/D203R、A24V/S32Q/F92L/T136V、S32K/L90Y/F92G/A114K/D203V、S32M/L90F/F92G/A114V/A117N/A125S/A174K/D203R、R12K/T17A/V23L/A24V/L90F/F92G/S101N/A125S/Q142W/D158I/D203R、P20T/F21W/Y60I/S101A/T109K/A174K、T17C/L90Y/F92L/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R、T17Q/L90F/F92G/S101M/A117Q/T136A/D158I/A174R、V23L/L90F/F92G/A125S/D203V/I222L、T17C/L90Y/F92L/A125S/T136V/D158E/A174K、V23L/S32Q/Y60I/A117Q/T136A/A174K/V229C、V23T/L90F/F92Y/D203V、R12K/A24V/Y60H/A174R、T17G/P20T/Y60I/F92G/D203V、L90Y/F92L/S110R/A125S/D158E/D203V、T17Q/L90Y/F92L/T109L/T136A/D158E/A174R/D203V/V229C、R12K/V23T/A24V/S32Q/F92G/D158L/A174R/D203R、S32M/N87Y/L90F/F92G/A174K/D203V、T17S/V23L/S32Q/L90F/F92L/A114K/A117N/A125S/T136V/D158E/D203V/V229I、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/T109L/S110R、A14K/S32M/L90Y/S101R/A114V/T136A/A216P、P20T/F21W/L90Y/F92G/A125S/A174K/V229I、V23L/S32K/L90F/F92L/S101R/T109R/T136V/I222L、A24V/F92L/Q142L/A216P、F92G/A125S/T136A/D158E/A216P、N87R/F92G/A117N/D203V/A216P、R12K/A14K/F92G/S110R/A117N/A125S/A174R/D203R、S32Q/N87F/L90F/F92G/S101M/A114V/A117Q/D203V、T17Q/A24V/N87M/F92G/A114K/A117N/D158E/D203R/I222L、N2R/S32Q/L90F/F92G/Q142L/D203V、A14K/S32Q/L90F/F92G/A114K/A117N/A174R/D203V/A216P/I222L、R12K/P20T/D158E/D203R/I222L、N2R/A14K/T17A/L90F/F92G/S101H/A174R/D203V、T17G/A24V/L90F/F92G/Q142W、S32K/L90Y/F92Y/S101A、V23T/N87I/F92G/A125S/T136A/D158L/D203R、T17S/N87L/V229I、A24T/L90F/F92L/A125S/T136A/D203V、R12K/A14K/F92G/T109R/

T136A/Q142L/D158E/A174K/D203R/I222L/A24V/S32Q/Y60A/T136A/D18R/S32Q/N87H/L90Y/F92G/S101K/Q142L/D158I/A174R/T17A/F21W/S32K/N87F/L90F/F92Y/S101Q/T136A/D203R/A24V/L90F/F92G/A114V/A117N/T136V/Q142L/D203V/V229C/T17Q/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/T136V/Q142L/D203V/A216P/S32Q/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136V/Y60H/N87K/A114K/A117Q/D158E/A174K/A216P/P20T/L90Y/T109K/T136A/D158I/D203R/T17L/Y60A/D203V/N2R/S32Q/L90Y/F92Y/T109K/D203V/T17H/A24V/S32Q/L90Y/F92L/S101H/A114K/D158I/A174R/D203V/N2R/S32M/F92Y/T109K/S110R/I222L/P20T/F92Y/S101K/A125S/D158E/D203R/R12K/A14K/P20T/F21W/S32M/F92L/R12K/A14K/V23T/A24V/L90F/F92L/S101W/T136A/D203V/T17L/S32K/F92L/T109L/A114V/T136V/D158L/R236H/P20T/F21W/S32Q/N87F/F92L/D158E/D203V/F21W/L90F/F92G/S101A/A114V/A125S/T136V/Q142L/D203V/A216P/P20T/F21W/S32K/F92G/A125S/V229I/V23T/A24V/L90Y/F92G/A125S/T136V/D203V/P20T/S32K/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R/A216P/V23L/L90F/F92L/T136A/D203R/I222L/R12K/A14K/A24V/N87L/L90Y/A125S/T136V/A216P/P20T/F21W/L90Y/A125S/N2R/L90Y/A114K/A117Q/D203V/V229I/F21W/S32K/L90Y/A125S/D158E/A216P/V229I/S27L/T136V/S27L/P8T/T17Q/F21W/S101A/T136V/Q142L/S27L/N2R/T17L/S27L/V23T/A24V/T136A/Q142W/S27L/F21W/T136V/S27L/T17Q/T109K/A114K/T136V/V229I/S27L/T17Q/S27L/T136V/I222L/V229C/S27L/T17A/A114V/A117N/T136A/S27L/亲本/S27L/N2R/T136A/S27L/N2R/T17A/S27L/T17C/S101A/T136V/S27L/P20T/T136A/S27L/T136V/Q142W/V229I/S27L/T109K/T136V/I222L/V229I/S27L/T17L/S101H/A117N/Q142L/I222L/V229I/S27L/S101Q/T109L/A117N/T136A/Q142L/S27L/T109K/S110R/S193N/S252T/R255M/S27L/S22R/Y26K/R236Q/S27L/L90F/F92L/S98E/S113Y/A114K/T136A/D158E/S181R/T206G/S212M/V219I/S27L/N9S/S22P/T48N/L90Y/F92G/T109K/S110R/T136A/Q189V/N211F/R236Q/S27L/T17A/Y26L/T48N/I82M/S101D/R236Q/S27L/Y26T/S101D/D158E/V219I/S252T/S27L/S13R/S98E/T136V/S181R/T206G/V229I/N231S/S27L/F21W/F92L/S98N/S193P/I222L/S27L/S1G/Y26K/L90Y/S113Y/A114V/T136A/Q189V/N204R/N211L/R236Q/S27L/S22K/I82L/L90Y/F92G/R108S/A117N/D158E/S193N/S27L/S1G/N9S/T48S/L90Y/S98T/S101A/S113N/A114K/L119M/S193N/T206G/S252T/S27L/N9E/R12K/S22P/V23L/T160R/D203R/I222L/S27L/N9E/R12K/S22P/V23T/T48S/S98E/R108S/T160S/Q189V/T206G/S212L/V229I/S27L/S1A/N2R/N9S/T48N/L90F/F92L/D203V/S223A/S27L/N9E/R12K/V23T/I82M/L90Y/F92L/T136V/N204K/N231S/R255M/S27L/S1G/N9S/S22V/I82F/L90Y/F92L/A117N/L119M/Q142L/T206G/S212L/S223A/S27L/N9S/Y60H/R108C/S193P/V219L/S27L/N9E/S22K/S32M/L90F/F92G/R108T/L119M/Q189V/I222L/S223A/R236Q/S27L/T17Q/F92G/S98N/Q142L/Q189L/R236C/S27L/N9E/R12K/Q142W/T160Q/T206G/S212M/S27L/Y26T/S113N/A114V/T136A/D158E/D203R/N211F/R236Q/S252T/R255M/S27L/S1A/T17H/S22V/L90Y/F92G/S98E/A114V/T136A/S27L/N9E/T48S/I82M/L90Y/F92L/N122A/A127S/T160S/A174R/T206G/S212L/R255M/S27L/N9S/S22P/V23L/L90Y/F92G/A125S/T160S/N204R/I222L/S223A/R236Q/S27L/N9E/S22P/T48S/L90Y/F92L/T109R/E173R/A174K/D203V/S223A/S27L/R12K/Y26K/T48N/I82L/L90F/A125S/N211I/A216P/S27L/N9S/R12K/F92Y/T109K/S110R/T160K/Q189L/S223A/S252T/R255M/S27L/S1A/N2R/N9E/R12K/S32K/N87F/R108T/N211I/V219K/R255M/S27L/L90F/F92G/N122A/T136A/

T160V/E173R/D203R/S252T、S27L/L90Y/F92G/S98T/T109L/D158I/S193K/V219K/R236Q/S252T、S27L/N9E/R12K/T48N/L90F/S98L/R108Q/A117Q/T136A/T206G/S212F/V219I/V229I/R255L、S27L/S1A/S22V/N87K/R108K/N122E/D158E/S193P/V219I/R255M、S27L/F21W/Y26T/S34R/R108H/L119M/N211M/R236C/S252T、S27L/S1A/N9E/R12K/V23T/T48S/N87H/S101Q/Q189L/N211M/V219I/R236Q/R255M、S27L/N9S/T25Q/L90Y/S101D/T136A/Q142L/Q189L/R236Q、S27L/A14K/I82F/F92G/S98E/R108C/A117N/L119M/Q189V/T206G/I222L/S223A、S27L/T17C/Y26T/N87V/R108C/N122E/T136V/S193P/S252T/R255M、S27L/L90Y/F92G/T109L/N122S/R255M、S27L/R12K/L90Y/T160V/A174R/R236Q、S27L/N9E/R12K/T48N/L90Y/F92G/S98T/S113R/N122R/A127S/T136A/A174K/N204K/S212L、S27L/V23T/L90Y/F92G/S98E/T109L/A125S/T160V/A174K/S181C/S193K/T206G/S212M/R255M、S27L/A24V/F92G/S101D/A114V/A117N/A125S/T136V/D203R、S27L/R12K/S32Q/S101Q、S27L/L90F/F92G/T136V/A174R/D203R、S27L/P20T/S32K/L90Y/D203V、S27L/N2R/A14K/T17S/L90Y/T109K/T136V/A216P、S27L/N2R/V23T/A24V/S32M/L90Y/F92G、S27L/A14K/L90Y/F92L/S101D/A117N/D158I/D203R、S27L/F21W/N87H/A114V/A117N/T136V、S27L/N2R/V23T/A24V/N87M/F92L/S101K/A125S/T136A、S27L/L90Y/F92L/S101N/T109R/S110R/Q142W、S27L/S32M/F92G/A216P、S27L/F21W/L90Y/F92L/A114K/A117N/T136A/D203V、S27L/N2R/V23T/S32M/N87M/F92L/T136A、S27L/R12K/L90F/F92G/S101A/D203V、S27L/A24V/L90F/F92G、S27L/R12K/F92L/S101A/A125S/T136A/D203R、S27L/R12K/V23L/L90F/F92L/A114K/T136A/D158E/D203V/I222L、S27L/L90F/F92G、S27L/A14K/P20T/S32Q/L90Y/A125S/D203V、S27L/T17L/L90F/F92G/A125S/A174R/D203V、S27L/N2R/N87K/A114K/A117Q/T136V/D203V、S27L/N2R/A114K/T136V/D203V、S27L/N2R/T17A/T136V/A216P、S27L/N2R/R12K/N87F/T136V/D158E/A174R、S27L/D203R、S27L/R12K/T17Q/T136V/D203V/A216P、S27L/N87F/T109L/Q142L、S27L/N2R/T17Q/A24V/A114K/A117Q/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/N2R/P20T/F21W/N87M/T109R/A117N/A125S/T136V/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/R12K/V23L/A114K/T136A/D158I/D203V/I222L、S27L/N87Y/T136V/D158E/D203V、S27L/T109K/S110R/D203R、S27L/N2R/T17L/A125S/T136A/D158E、S27L/A24V/D158E/A174K/A216P、S27L/T17G/V23L/N87L/A117Q/A125S/T136V/D158E/V229C、S27L/V23L/N87L/T109R/A114K/A117N/A125S/T136V/Q142L、S27L/N87Y/S101A/A114V/A117Q/T136V/A174K/A216P/I222L、S27L/R12K/T109R/Q142L、S27L/D203V、S27L/T17G/N87F/S101A/D203V、S27L/T17L/N87M/Q142L/D203V、S27L/N2R/R12K/S101D/A117N/T136A/D203V、S27L/R12K/P20T/F21W/A114K/Q142W/D203R、S27L/N2R/T17G/T109L/S110R/A114K/A117Q/T136V/Q142L/D203R、S27L/N2R、S27L/S32K/L90F/F92G/S101M/A114V/A117N/A125S/T136A/D158E/D203V、S27L/R12K/T17A/F21W/S32Q/Y60H/D203R、S27L/R12K/F92L/S110R/T136V/I222L、S27L/A14K/V23T/A24V/L90Y/F92G/A114V/A117Q/Q142L/A174R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S101D/T109K/A125S/T136A/A174K、S27L/V23T/L90Y/F92G/T136A/D203V/A216P、S27L/T17S/L90Y/F92G/A117N/T136A/D158L、S27L/A14K/V23L/A24V/F92L/Q142W/D203V、S27L/T17L/L90F/F92G/S101K/A174K、S27L/L90F/F92L/A125S/T136V/A174K/D203V/A216P/I222L、S27L/R12K/P20T/S32M/L90F/F92G/S101M/A114V/D203V、S27L/T17A/S32Q/L90F/F92L/T136V/Q142W/A174K/D203R、S27L/R12K/S32M/L90F/F92G/S101W/A114V/D158I/

I222L、S27L/P20T/S32M/L90Y/F92L/A114V/A117N/I222L、S27L/T17C/L90Y/F92G/T136A/A174K/D203V、S27L/S32Q/N87Y/F92G/T109K/A114K/A117N/T136V/D203V/V229C、S27L/F21W/L90F/F92G/T136V/A174R、S27L/P20T/N87Y/T136A/D203V/I222L、S27L/A24V/L90Y/F92L/D158I/A174K/D203R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S110R/A114K/T136V/D203R/A216P/V229I、S27L/N87H/F92G/D203R、S27L/R12K/S32K/Y60A/A125S/T136V/D158L、S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92L/T136A、S27L/F92L/A114V/D158E/D203R、S27L/S32Q/L90Y/D203V/V229I、S27L/V23T/S32Q/Y60H/T109K/T136V/A216P/I222L、S27L/A14K/A24V/L90F/F92G/T109K/T136V/D158L/A174R/D203V/I222L/V229I、S27L/R12K/N87F/A174K、S27L/P20T/S32Q/Y60H/T109K/A114V/T136A/A174K、S27L/V23T/A24V/Y60A/A125S/A174R/A216P、S27L/F92Y/D158L/I222L、S27L/V23L/A24V/L90Y/F92G/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92G/S101H/T136A/A174K/D203V/V229C、S27L/S32K/N87H/A125S、S27L/P20T/F21W/F92G/A114V、S27L/T17L/V23L/A24V/L90Y/F92L/A117N/T136V/L137M/Q142L、S27L/P20T/L90Y/D203R、S27L/S110R/Q142L/D158I/D203R/V229I、S27L/P20T/S32Q/L90F/F92L/T109K/S110R/A125S/D203V、S27L/V23T/A24V/L90F/F92G/D158E/D203R、S27L/F92G/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/P20T/L90Y/F92G/T109R/S110R/A125S/D203R、S27L/A14K/L90Y/F92L/D158L/A174R/D203V、S27L/F21W/S32Q/L90Y/F92G/T109L/S110R/A117N/D158I/A174K/D203V、S27L/R12K/A114K/A117N/D158E/D203V、S27L/T17S/N87H/T109R/A114K/A117N/T136V/Q142W/D203V、S27L/N2R/N87Y、S27L/T17S/V23T/A24V/S32Q/Y60H/N87K/T136A/D203R、S27L/P20T/F92Y/T109K/D158E/D203V、S27L/S32K/N87M/F92L/S101M/T109L/S110R/D203V、S27L/L90Y/F92G/T136A/D158E/D203V/A216P/V229I、S27L/A14K/S32M/F92L/A125S、S27L/L90Y/F92G/T136V/D158L/D203V、S27L/A24V/L90Y/F92G/S101A/T109L/S110R/A117Q/A174R/D203R、S27L/P20T/S101D/A114V/T136V/Q142W/D158E/D203R/A216P、S27L/N87Y/F92G/S101Q/A114K/A117N/T136A/D158L/D203R/A216P、S27L/V23T/A24V/N87Y/L90Y/F92L/S101D/T109R/A174K/D203R/A216P、S27L/N2R/P20T/F21W/L90F/F92Y、S27L/L90Y/F92G/D158I/D203V/V229C、S27L/S32Q/F92G/Q142W/I222L、S27L/N2R/R12K/S32M/N87Q/L90F/F92L/I222L、S27L/R12K/S32K/F92L/A114V/A117Q/T136A/D158E/A216P、S27L/L90Y/F92G、S27L/R12K/F21W/S32M/F92G/T136V/Q142L/D203R、S27L/R12K/A14K/L90Y/F92L/A125S/A174K、S27L/A24V/A114V/A117Q/T136V/D203V、S27L/R12K/T17Q/V23L/S32M/L90Y/F92G/S101D/T136V/I222L、S27L/V23T/A24V/S32Q/F92L/S101N/T109L/S110R/D203R、S27L/P20T/Y60H/N87K/T136A/A174R/D203V、S27L/P20T/F21W/L90Y/F92L/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/T17G/F21W/S32K/L90F/F92G/A125S/T136A/A174K、S27L/T17G/N87Y/T136A/D203V/A216P、S27L/F21W/L90F/F92G/S101D/A117N/T136A/A174K/D203V、S27L/R12K/A14K/A24V/L90Y/D203V、S27L/N2R/L90F/F92G/S101M/Q142L/D158L、S27L/N2R/T17C/A24V/N87K/A174K/A216P、S27L/N87M/Q142L/I222L、S27L/F92L/S98T/R108C/A117Q/A127S/Q142L/Q189V/A216P/R236Q、S27L/S22K/F92L/R108H/A127S/T136A/N211I、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109L/A127S/T136V/N204K/S223A、S27L/T17L/L90Y/F92L/S98M/A174K/D203V/N211M/S212L/S223A、S27L/N87K/S98M/N211M、S27L/N9E/S22P/L90Y/N204K、S27L/S32M/T48S/F92G/A127S/Q142W、S27L/T17S/S22K/L90F/F92L/D158E/D203V/V219I/S252T、S27L/L90F/F92L/A127S/D203V、S27L/T25F/L90Y/F92G/N204R/S223A/N231S/R236C、S27L/F21W/

S22V/T48S/L90F/F92L、S27L/S1A/S98T/S113K/A114V/L119M/A127S/Q142W/S193K/V219K/
S252T/R255L、S27L/A24V/I82L/L90F/F92G/T109L/L119M/A127S/E173R/N204K、S27L/T17C/
Y60H/L90F/A127S/E173R/A174R/N204K、S27L/L90F/F92L/Q142W/D203V/S223A、S27L/P20Q/
L90Y/Q142L/S223A、S27L/N9S/Y60A/A216P/R236Q/R255M、S27L/F92G/R108C/S110R/A117Q/
T136A/N211M、S27L/S22P/Y60H/S98A/S113K/A114K/T136V/Q189L/S193H、S27L/V23L/S98A/
Q142L/N211M、S27L/V23L/Y26L/L31M/T48S/F92G/A174R/N204K/S252T、S27L/S13R/A14K/
Y26T/T136A/S181R/N211M/S212M、S27L/F21W/I82F/L90Y/F92G/A127S/N211M、S27L/P20T/
Y60H/S98L/T136A/R255L、S27L/P20T/S34R/N87M/D158E/S252T、S27L/T25A/L90F/F92G/
Q189L/S193P/V229I、S27L/V219L/I222L、S27L/N9E/T48S/L90F/F92L/S98N/R108H/S110R/
S113Y/N211V/S212L/S252T、S27L/L90F/F92Y/S113R/V219I/R255L、S27L/F21W/S22K/T48S/
F92G/T109R/A127S、S27L/S1G/A14K/P20T/S32K/T48S/L90Y/F92L/T109L/T160R/V219L/
I222L/S252T/R255L、S27L/L90F/F92G/D158E/T160R/S193N/N204K/S223A、S27L/A14K/
Y26T/F92L/Q142L/S212L、S27L/S22R/L90Y/F92G/V126I/A127S/A174K/N204K、S27L/P20T/
T25A/L90F/F92L/A117N/L119M/S252T/R255L、S27L/T17A/A24V/T48S/L90F/F92G/T109R/
A127S/T160K/D203R/S223A、S27L/F21W/T48S/T109L/A127S/V219I/R255L、S27L/A14K/
S22P/T48S/L90F/F92L/T109L/A127S/Q142L/A174R/N204K/S223A、S27L/T136A/S212M/
N231S、S27L/F21W/L90F/F92G/A127S/S223A、S27L/T48S/L90Y/F92L/R108S/S110R/A127S/
T136V/E173R/S223A、S27L/T48S/F92G/S98E/Q142L/Q189V/S193P/N204R/S223A、S27L/
T17S/L90F/F92Y/S101K/A127S/T136V/N204R/N211I/V229I/N231S、S27L/N9E/F21W/T48S/
L90Y/F92L/T109R/N204K/R236Q、S27L/N9E/S22R/T48S/F92L/S101N/A127S/E173R/N204R、
S27L/S22K/N87F/A117Q/S181C/N204K/N211M/V229I/N231S/R236Q、S27L/N9S/T48S/L90F/
F92G/S101N/A127S/N204K/A216P/S252T/R255M、S27L/I82L/S193H/N211M/S212F/S223A、
S27L/A14K/P20T/T48S/L90F/F92G/S98N/R108C/T136A/N204K/N211L/S212L/R236Q/S252T、
S27L/S13R/T17L/T25Q/L90F/F92G/R108C/A127S/T160R/I222L/R255L、S27L/T48S/L90Y/
F92G/T109L/S193N、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92L/S98E/A127S/T136A/N204K/A216P/S223A、
S27L/V23L/N87H/F92L/R108C/S110R/N122A/T160S/Q189L/S193P/N204K/S223A/R255L、
S27L/F92G/A127S/A174R/S223A/V229I/N231S/R236C、S27L/S1G/L90Y/A127S/E173R/
S223A、S27L/F92Y/S98N/Q142W、S27L/P20T/S32M/S34R/T48S/L90Y/F92L/R108K/A127S/
Q142W/A174R/N204K/V219I/S252T、S27L/F92G/A127S/Q189V/S193N/S223A、S27L/S34R/
F92G/S110R/D158L/D203V/R255M、S27L/N9E/F21W/T48S/F92G/T109L/A127S/R236C、S27L/
S1A/S22P/T48S/L90Y/F92G/A127S/E173R/A174R/N204K/S223A、S27L/S22K/T48S/T160S/
N204K、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92G/S98V/R108C/A127S/N211L/S212M/N231S/R236C、S27L/
V23L/A24V/A114K/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/
I222L/V229I、S27L/V23L/S101H/T109K/A114K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/
T17L/F21W/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17S/T136V/Q142L/
I222L/V229C、S27L/T17C/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/P192A/S193H/N204K/
S223A/V229I/N231S/R236Q/R255L、S27L/N9E/T48N/N87H/F92L/A174K/Q189L/S193K/
N204R/V219I、S27L/A14K/V23L/Y26L/L90F/F92G/S98E/S113K/A114K/T136A/V229I/N231S、
S27L/L90Y/F92L/S101D/A117N/Q142L/S193N、S27L/S22K/T25A/L90Y/Q142L/E173R/N204K/

S223A、S27L/P20T/L90Y/T109L/A127S/A174K/V229C、S27L/S22V/L90Y/F92L/A117Q/R236C/R255L、S27L/V23L/A24G/Y26T/I82F/L90Y/F92G/R108H/T136A/D158L/T160K/D203V、S27L/A14K/S22K/F92G/A127S/N204K/V229I、S27L/S22V/L90F/F92G/A127S/A174R/A216P/R236C、S27L/V23L/Y60A/S98T/T109L/A127S/T136V/T160Q/N204K/S223A/R255L、S27L/S13R/L90Y/S98L/T160V/Q189L/S193P/A216P/S252T/N253S/R255L、S27L/S22R/I82M/F92L/T109L/A127S/Q142W/Q189L/S223A、S27L/S1G/Y60A/L90F/F92L/N122E/T136A/N204K/S223A/N231S、S27L/S32K/F92G/S98L/R108Q/S110R/R255L、S27L/L90Y/F92G/L119M/A127S/A174R/S252T、S27L/L90F/S110R/S181R/N211F、S27L/A14K/S22P/Y60H/S110R/N122S/D158I/N204K/S223A/R255M、S27L/F92L/S98V/T109L/N122A/E173R/R255L、S27L/S22R/N87L/F92G/R236C、S27L/S32M/S34R/I82L/F92G/N204K/S223A、S27L/A24V/T25Q/Y60I/A127S/A174K/N204K/V219I/S223A/S252T/R255M、S27L/S98V/T136A/N211F、S27L/N9S/L90F/F92L/A127S/N204R/S212M、S27L/S22R/T48S/F92G/R108H/S110R/A127S/E173R/N204K/S223A/R236Q、S27L/A14K/L90Y/F92G/A127S、S27L/A14K/T48S/F92G/E173R/N204R/S223A/N231S、S27L/L90Y/T109R/S113N/V219L/I222L、S27L/N9S/T48S/L90Y/T136A/T206G/S223A、S27L/S22K/T48N/L90F/F92G/N204K/S223A/V229C/N231S、S27L/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/N204R/S223A、S27L/S1G/P20T/S32K/S34R/T48S/N87F/S98A/A127S/T136A、S27L/F21W/S22R/S98E/Q142L/T160V/S223A/S252T/R255L、S27L/P20T/T48S/F92Y/R108K/S110R/A127S/V219L/S223A/V229I/R236Q、S27L/Y26T/L90Y/F92L/A127S/V219L/S252T/R255L、S27L/N9S/F21W/T48S/F92L/A127S/D203V/S212F、S27L/F21W/Y60H/S98E/L119M/D158E/R236Q、S27L/F21W/S22R/L90F/F92L/N122S/Q142W/R236Q、S27L/F21W/T48S/L90F/F92G/T109K、S27L/L90Y/F92L/T109R/A127S/E173R/N204K/S223A、S27L/N9S/F21W/T48S/L90Y/F92G/A127S/N204K/V219I/R255M、S27L/N9E/I82F/L90Y/F92L/S95N/T109L/A127S/A174R/S223A、S27L/L90F/F92L/S98L/N204K/A216P、S27L/A24V/T48S/A117Q/N211M/S212M/S223A、S27L/L90Y/F92G/T109L/A127S/N204R/S223A、S27L/N2R/S32Q/N87K/A125S/V219L、S27L/S22P/T48S/L90F/F92L/S193N/V219L/S223A、S27L/T25Q/L119M/N211M/R236Q、S27L/L90Y/F92G/N122S/A127S/E173R/A216P/R236Q、S27L/P20T/S32K/L90F/F92G/N122E/D158E/T160S/Q189L/S223A/S252T、S27L/N9S/F21W/T48S/N87H/L90F/F92L/S113N/V229C、S27L/T25Q/I82L/L90F/F92G/S98L/S113R/A114V/T136A/S181R、S27L/P20T/R108Q/S110R/D203V/N211I、S27L/S1G/N2R/P20T/Y26T/S32M/T48S/L90Y/F92L/A127S/N204R/V219L、S27L/A14K/P20T/T48N/L90F/F92G/A117Q/A127S、S27L/N9S/T48N/L90Y/F92L/S98M/T109K/A127S/N204R/N211I/S212L/V219I、S27L/F21W/S22R/T48S/L90F/F92L/R108Q/A174K/N204K/S212F/S223A、S27L/S22R/Y60H/S98T/T136V/S193K/R236Q、S27L/S22K/Y26K/N87Y/L90Y/F92G/T109R/A127S/S252T/R255L、S27L/L90F/F92L/T109L、S27L/F21W/F92L/N204K/S252T/R255L、S27L/V23L/L90Y/F92G/A127S/S193K/N204R/V219I/R236C/R255L、S27L/F21W/L90Y/F92G/A114V/N122S/A127S/N204K/S223A/S252T、S27L/P20T/Y60A/T109L/Q189L/S212L、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92G/N204K、S27L/S22V/S32K/T48S/I82F/F92G/A127S/N204K/S223A、S27L/A55L、S27L/A97V、S27L/F250L、S27L/T109G、S27L/G38D、S27L/A97S、S27L/A55V/A216T、S27L/P20D、S27L/A55V、S27L/T109Y、S27L/V165I、S27L/A184G、S27L/A97E、S27L/A184S、S27L/A97F、S27L/A97T、S27L/K197Y、S27L/A55I、S27L/A97P、S27L/A55M、S27L/

P20E、S27L/A117L、S27L/T109L、S27L/K197T、S27L/T136S、S27L/A97L、S27L/T109A、S27L/P20I、S27L/L191V、S27L/A184C、S27L/A97Q、S27L/F250V、S27L/K197V、S27L/A117S、S27L/K197R、S27L/T109K、S27L/A55C、S27L/N2S/V177A、S27L/Q142D、S27L/G149C、S27L/F21Y、S27L/G149A、S27L/P164E、S27L/Y26C、S27L/T17N、S27L/S57M、S27L/D249I、S27L/T17S、S27L/P164T、S27L/Q142L、S27L/D249N、S27L/I185R、S27L/V83L、S27L/G149S、S27L/A24D、S27L/R251V、S27L/V83I、S27L/S110N、S27L/T17M、S27L/F161W、S27L/G46E、S27L/D249T、S27L/T17I、S27L/S57C、S27L/S57T、S27L/S57L、S27L/Q167T、S27L/S57E、S27L/T17K、S27L/G149N、S27L/Q142E、S27L/S57F、S27L/T17A、S27L/P164H、S27L/T17R、S27L/G149T、S27L/R251T、S27L/S101Y、S27L/S57V、S27L/A24T、S27L/I185E、S27L/G46N、S27L/P164N、S27L/P164S、S27L/Q167V、S27L/F161V、S27L/S57I、S27L/G149D S27L/Q167I、S27L/I185Q、S27L/N2L/T17I/T136S/P164H/D249M、S27L/P20E/F21Y/I139T/P164H/K197T/R251E、S27L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/A24V/S101Q/T109R/A117Q/I222L/V229I、S27L/S110D/A184S/K197T、S27L/T136S/D249T、S27L/F21Y/A184S、S27L/N2F/P20E/S110D/A184S/L191V/R251V、S27L/T17G/V23T/A24V/T109L/A117Q/T136A/I222L/V229I、S27L/P20D/F21Y/A55T/F250L/R251V、S27L/T109R/A117N/I222L/V229C、S27L/F21Y/A55T/T109A/A184S、S27L/V23L/A24V/S101K/A117N/I222L/V229C、S27L/S110K/A117Y/P164R、S27L/I139T/Q142E/I169V、S27L/A24H/R251V、S27L/F21W/A114V/T136A/I222L/V229I、S27L/N2S/A55V/I185Q/R251E、S27L/N2F/S101Y/Q142L/G149T/Q167I/I169C/V229L、S27L/N2F/S101C/A117F/P164S、S27L/Q142H/I185S/R251A、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/G46R/T109K/T136S/D249T、S27L/N2E/G46N/A55V/I185Y/D249I、S27L/V83L/F250V/R251E、S27L/F21W、S27L/S57C/R251E、S27L/V23L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/A24N、S27L/T17A/P20T/S101Q/T109K/S110R/T136A/I222L/V229C、S27L/P164T/V165I/R251E、S27L/F21Y/G46E/A117T/T136S/G149C/R251Q、S27L/G46N/I139T/Q142E/P164T/I185A/V229L/F250V、S27L/V23L/T136A/I222L/V229I、S27L/V23T/A24V/T109K/A114K/A117Q/T136A/I222L/V229C、S27L/F250L/R251Q、S27L/P20E/F21Y/S57T/P164N/A184C/V229C、S27L/P20T/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/V83L/A97S/A184C/D249S、S27L/P20T/S101H/A114V/A117N/I222L/V229I、S27L/N2E/R251L、S27L/P20E/F21Y/S110D/A117S、S27L/T17A/V23T/A24V/T136A、S27L/P20D/S57E/S101C、S27L/N2S/V83L/A184S、S27L/T17S/S101N/T109K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20D/A55T/A117Y/K197R、S27L/P20T/I222L/V229C、S27L/T17I/A24D/S57I、S27L/N2F、S27L/T109K/A117N/T136V/I222L/V229C、S27L/N2L/A24T、S27L/N2F/P20I/F21Y/R251Q、S27L/N2F/G46E、S27L/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/K197R/R251E、S27L/T17S/R251T、S27L/P20I/F21Y/A117F/I185G/D249N、S27L/T17L/S101M/T109K/S110R/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229C、S27L/V229I、S27L/T17A/F21W/S101Q/I222L/V229C、S27L/T17S/F21W/Q142L、S27L/T17L/T109L/S110R/A117Q/I222L/V229I、S27L/F21W/T136A、S27L/P20E/F21Y/G46E/V83L/A97Q、S27L/P20T/F21W/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17G/F21W/A117N/I222L/V229I、S27L/F21W/T109K/S110R/T136A/V229I、S27L/T17C/T109K/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/T109L/S110R/A117N/I222L/V229I、S27L/A24N/P164S/K197V/R251T、S27L/V23L/A117Q、S27L/A55V/V83L/A117T、S27L/P20D/G46S/A55I/K197T、S27L/A117Y、S27L/

F21W/S101M/I222L/V229C、S27L/N2L/T17N/S57C/S110D/A117L/P164N/I185G/V229L/R251T、S27L/N2E/G46S/V83L/T136S/A172T/V229C/D249N、S27L/P20T/T109R/A114K/A117Q/T136V/I222L/V229C、S27L/V23L/A24V/T136A/Q142W/I222L/V229I、S27L/N2L、S27L/T17A/F21W/T109R/S110R/I222L/V229I、S27L/T17C/A114K/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/V23L/I222L/V229C、S27L/S101N/A117Q/I222L、S27L/N2E/P20I/T109L/L191V/K197L/V229C、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2L/G46E/T109K/F161V、S27L/T17S/V229I、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229I、S27L/N2L/A172T、S27L/P20D/F21Y/F250V、S27L/N2L/A24H/A55C/V229L、S27L/N2L/P20E/F21Y/V229L、S27L/V23T/T109L/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20T/F21W/I222L/V229C、S27L/T17H/F21W/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/G46E/A55I/Q142E、S27L/N2F/R251Q、S27L/F21W/Q142L/I222L/V229C、S27L/I222L/V229I、S27L/P20T/S101M/A114V/A117N/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/A24V/S101W/T136A、S27L/N2S/P20D/A97C/A117F/F250L/R251E、S27L/S101M/A114V/A117Q/T136A、S27L/T163I、S27L/S101Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229C、S27L/S101M/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/A24V、S27L/A24D/K197L、S27L/T17H/S110K、S27L/P20T/F21W/V229I、S27L/T17G/P20T/F21W/A117Q/I222L/V229C、S27L/F21W/A24V/A114V/A117Q/Q142W/I222L/V229C、S27L/P20T/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/N2F/D249N/F250L、S27L/V23T/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20E/A24D/D249S/F250V、S27L/A24D/S110K、S27L/T109R/I222L/V229I、S27L/P20E/F21Y/K197T、S27L/T17A/V23L/S101M/T109K/S110R/A114V/A117Q/T136V/V229I、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229I、S27L/P20T/V23T/A24V/T109L/S110R/I222L/V229I、S27L/A24D/L191F/R251Q、S27L/A24D/T136S/F250V、S27L/P20T/F21W/T109L/T136A/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2E/I169L/F250L/R251Q、S27L/N2S/A24N/G46E/A55L/Q142D/V229C/R251L、S27L/N2E/P20E/F250V/R251L、S27L/N2F/P20E、S27L/A24V/V229C、S27L/P20D/F21Y/G46N/S110K/T163I/Q167V、S27L/P20T/T109K/A114K/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/S101D/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/Q142W/I222L/V229C、S27L/A24D/T109L/K197L、S27L/T17Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17A/A24V/S101D/S110R/T136A、S27L/P20T/F21W/T109R/A117Q/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/P20T/F21W/T109K/A117N/I222L/V229C、S27L/P20T/S101M/I222L/V229I、S27L/N2S/A24D/S101Y/P164E/V165I/I185E、S27L/T17N/A117S/V229L/R251A、S27L/S101W/A114V/T136V/V229C、S27L/P20D/G46N/A55C/S110N/T163I/A184S、S27L/A24H/G46E、S27L/T17H/S101Q/T136V/Q142L/V229C和S27L/V23T/A24V/I222L/V229C。

14. 核酸,其编码前述权利要求中任一项所述的变体Bhr-PETase酶。

15. 表达载体,其包含权利要求14所述的核酸。

16. 宿主细胞,其包含权利要求15所述的表达载体。

17. 根据权利要求16所述的宿主细胞,其中所述细胞是细菌、酵母或真菌。

18. 制备变体Bhr-PETase酶的方法,其包括在其中产生所述变体Bhr-PETase的条件下培养权利要求16或17所述的宿主细胞,并回收所述变体Bhr-PET酶。

19. 预处理PET的方法,其包括对所述PET的机械预处理、热机械预处理和/或化学预处理,然后是对所述PET的酶促降解。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述机械预处理包括将所述PET研磨成颗粒。
21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述热机械预处理包括在配置为使所述PET无定形化并降低所述PET结晶度的温度下挤压所述PET。
22. 根据权利要求19所述的方法,其中所述化学预处理包括使所述PET与配置为降低所述PET结晶度或改变所述PET表面结构的离子液体、强酸、碱或溶剂接触。
23. 降解PET的方法,其包括使所述PET与权利要求1-13中任一项所述的变体Bhr-PETase酶接触。
24. 根据权利要求17所述的方法,其进一步包括根据权利要求19-22中任一项所述的方法来预处理所述PET。
25. 根据权利要求23或24所述的方法,其中所述方法降解混合塑料组合物中的所述PET。
26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述塑料组合物包含生物或化学衍生的PET类似物、类PET或PET替代物。
27. 根据权利要求25所述的方法,其中所述塑料组合物包含选自下组中的至少一种:聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚碳酸酯(PC)、聚己内酯(PCL)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)和高密度聚乙烯(HDPE)。
28. 根据权利要求23-27中任一项所述的方法,其中所述方法不包括对塑料进行分选以从塑料混合物中选择出PET。

聚对苯二甲酸乙二醇酯的酶促降解

[0001] 发明背景

[0002] 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 的使用是广泛且无处不在的。因此, PET是全球环境污染的主要来源。物理回收是可能的, 但在许多情况下没有得到充分利用。在过去的几十年中, 已经探索了酶促降解但已经证明其是攻击性的。

[0003] 本文提供了变体酶用于PET的酶促降解。

发明内容

[0004] 在一个方面, 本公开涉及组合物, 其包含与SEQ ID NO:1相比的变体Bhr-PETase, 其中所述变体相比于SEQ ID NO:1包含选自下组的氨基酸位置处的至少一个氨基酸取代: 27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197, 其中所述变体Bhr-PETase与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性并且具有PETase活性。在另一个方面, 本公开涉及组合物, 其包含与SEQ ID NO:1相比的变体Bhr-PETase, 其中所述变体相比于SEQ ID NO:1包含位置27处的氨基酸取代以及选自下组的氨基酸位置处的至少一个进一步的氨基酸取代: 1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197, 其中所述变体Bhr-PETase与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性并且具有PETase活性。在另一个方面, 本公开涉及组合物, 其包含与SEQ ID NO:1相比的变体Bhr-PETase, 其中所述变体相比于SEQ ID NO:1在选自下组的氨基酸位置处包含至少一个氨基酸取代: 27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197, 其中所述变体Bhr-

PETase与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性并且具有等于或大于野生型Bhr-PETase (SEQ ID NO:1)的PETase活性。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于选自下组的氨基酸位置:27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255和258。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于选自下组的氨基酸位置:27、2、17、20、21、23、24、40、46、49、55、57、77、83、97、101、102、109、110、114、117、135、136、139、140、142、143、149、161、163、164、167、184、185、195、222、227、228、229、249、250和251。在一些实施方案中,所述氨基酸取代位于选自下组的氨基酸位置:8、126、137、165、169、172、191、192和197。

[0005] 在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自下组:S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、S1A、S1G、S1M、S1R、N2E、N2F、N2L、N2R、N2S、Q5E、N9A、N9E、N9S、R12K、S13L、S13R、A14K、A14S、L15I、T16E、T17A、T17C、T17G、T17H、T17I、T17K、T17L、T17M、T17N、T17Q、T17R、T17S、D18R、P20D、P20E、P20I、P20Q、P20T、F21W、F21Y、S22A、S22I、S22K、S22P、S22R、S22V、V23L、V23T、A24D、A24G、A24H、A24N、A24S、A24T、A24V、T25A、T25F、T25H、T25Q、T25R、T25V、Y26C、Y26K、Y26L、Y26T、R30K、S32K、S32M、S32Q、S32Y、V33G、V33Q、V33T、S34R、V40T、G46E、G46L、G46N、G46R、G46S、T48N、T48S、L49G、G53A、I54V、A55C、A55I、A55L、A55M、A55T、A55V、M56I、M56L、S57C、S57E、S57F、S57I、S57L、S57M、S57T、S57V、Y60A、Y60H、Y60I、A62T、A68F、L70M、R72P、L74W、H77Q、I82F、I82L、I82M、V83I、V83L、V83T、N85D、N87F、N87H、N87I、N87K、N87L、N87M、N87Q、N87R、N87V、N87W、N87Y、S88K、S88T、L90F、L90K、L90Y、F92G、F92I、F92K、F92L、F92N、F92Q、F92V、F92Y、A97C、A97E、A97F、A97G、A97L、A97P、A97Q、A97S、A97T、A97V、S98A、S98D、S98E、S98L、S98M、S98N、S98Q、S98T、S98V、S101A、S101C、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、S101Y、A102V、N105D、R108C、R108E、R108H、R108K、R108N、R108P、R108Q、R108S、R108T、R108V、T109A、T109F、T109G、T109K、T109L、T109N、T109R、T109Y、S110D、S110G、S110H、S110K、S110N、S110R、S113A、S113K、S113N、S113P、S113Q、S113R、S113T、S113Y、A114K、A114L、A114S、A114V、A117F、A117G、A117L、A117N、A117Q、A117S、A117T、A117Y、L119I、L119M、A121S、N122A、N122E、N122H、N122P、N122R、N122S、A125S、A127M、A127S、A127V、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、R138E、R138L、I139A、I139T、S140A、Q142D、Q142E、Q142H、Q142L、Q142W、I143N、I143R、T145S、K147F、K147G、K147N、K147Q、G149A、G149C、G149D、G149N、G149S、G149T、G149V、V150I、V150L、T153L、H156N、T157A、T157G、D158E、D158I、D158K、D158L、T160K、T160Q、T160R、T160S、T160V、F161V、F161W、N162E、N162H、N162P、N162R、T163I、T163S、P164E、P164H、P164N、P164R、P164S、P164T、Q167I、Q167T、Q167V、V170L、E173R、A174K、A174R、V177A、P179Q、S181A、S181C、S181R、Q182T、A184C、A184G、A184S、I185A、I185E、I185G、I185L、I185Q、I185R、I185S、I185Y、Q189I、Q189L、Q189V、N190S、S193E、S193F、S193H、S193K、S193N、S193P、S193T、S193V、T194G、T194S、T195F、V198A、V200L、D203N、D203R、D203V、

N204A、N204K、N204R、N204S、T206G、T206K、T206L、T206P、T206R、F208G、F208L、F208R、F208T、A209V、N211F、N211I、N211L、N211M、N211V、S212F、S212L、S212M、P213N、P213R、A216L、A216P、A216S、A216T、A216V、I217S、S218A、V219F、V219I、V219K、V219L、V219R、T221S、I222L、S223A、S223C、M225L、L227R、W228F、V229C、V229I、V229L、N231L、N231Q、N231S、R236C、R236E、R236H、R236K、R236Q、Q237R、N241P、V242T、N243P、A246D、A246K、A246S、A246T、D249I、D249M、D249N、D249S、D249T、F250I、F250L、F250V、F250Y、R251A、R251E、R251I、R251K、R251L、R251Q、R251T、R251V、S252T、N253S、N253Y、N254R、R255E、R255G、R255L、R255M、R255S、R255V、R255W、R255Y、Q258P、P8T、L31M、G38D、S95N、V126I、L137M、V165I、I169C、I169L、I169V、A172T、L191F、L191V、P192A、K197L、K197R、K197T、K197V和K197Y。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自下组:S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、S1A、S1G、S1M、S1R、N2R、Q5E、N9A、N9E、N9S、R12K、S13L、S13R、A14K、A14S、L15I、T16E、T17A、T17C、T17G、T17H、T17K、T17L、T17Q、T17S、D18R、P20T、F21W、S22A、S22I、S22K、S22P、S22R、S22V、V23L、V23T、A24S、A24V、T25A、T25F、T25H、T25Q、T25R、T25V、Y26K、Y26L、Y26T、R30K、S32K、S32M、S32Q、S32Y、V33G、V33Q、V33T、S34R、V40T、G46L、G46S、T48N、T48S、L49G、G53A、I54V、A55L、A55V、M56I、M56L、S57I、S57M、S57V、Y60A、Y60H、Y60I、A62T、A68F、L70M、R72P、L74W、H77Q、I82F、I82L、I82M、V83T、N85D、N87F、N87H、N87I、N87K、N87L、N87M、N87R、N87V、N87W、N87Y、S88K、S88T、L90F、L90K、L90Y、F92G、F92I、F92K、F92L、F92N、F92Q、F92V、F92Y、A97F、A97G、S98A、S98D、S98E、S98L、S98M、S98N、S98Q、S98T、S98V、S101A、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、A102V、N105D、R108C、R108E、R108H、R108K、R108N、R108P、R108Q、R108S、R108T、R108V、T109F、T109K、T109L、T109N、T109R、S110G、S110H、S110R、S113A、S113K、S113N、S113P、S113Q、S113R、S113T、S113Y、A114K、A114L、A114S、A114V、A117G、A117N、A117Q、A117S、L119I、L119M、A121S、N122A、N122E、N122H、N122P、N122R、N122S、A125S、A127M、A127S、A127V、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、R138E、R138L、I139A、I139T、S140A、Q142L、Q142W、I143N、I143R、T145S、K147F、K147G、K147N、K147Q、G149A、G149C、G149S、G149V、V150I、V150L、T153L、H156N、T157A、T157G、D158E、D158I、D158K、D158L、T160K、T160Q、T160R、T160S、T160V、F161W、N162E、N162H、N162P、N162R、T163S、P164S、Q167T、Q167V、V170L、E173R、A174K、A174R、V177A、P179Q、S181A、S181C、S181R、Q182T、A184S、I185L、I185Y、Q189I、Q189L、Q189V、N190S、S193E、S193F、S193H、S193K、S193N、S193P、S193T、S193V、T194G、T194S、T195F、V198A、V200L、D203N、D203R、D203V、N204A、N204K、N204R、N204S、T206G、T206K、T206L、T206P、T206R、F208G、F208L、F208R、F208T、A209V、N211F、N211I、N211L、N211M、N211V、S212F、S212L、S212M、P213N、P213R、A216L、A216P、A216S、A216V、I217S、S218A、V219F、V219I、V219K、V219L、V219R、T221S、I222L、S223A、S223C、M225L、L227R、W228F、V229C、V229I、N231L、N231Q、N231S、R236C、R236E、R236K、R236Q、Q237R、N241P、V242T、N243P、A246D、A246K、A246S、A246T、D249T、F250I、F250Y、R251I、R251K、R251V、S252T、N253Y、N254R、R255E、R255G、R255L、R255M、R255S、R255V、R255W、R255Y和Q258P。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自下组:S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、N2R、T17A、T17C、T17G、T17H、T17K、T17L、T17Q、T17S、P20T、F21W、V23L、V23T、A24S、A24V、V40T、G46L、G46S、L49G、A55L、A55V、S57I、S57M、S57V、H77Q、V83T、A97F、A97G、S101A、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、

S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、A102V、T109F、T109K、T109L、T109N、T109R、S110G、S110H、S110R、A114K、A114L、A114S、A114V、A117G、A117N、A117Q、A117S、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、I139A、I139T、S140A、Q142L、Q142W、I143N、I143R、G149A、G149C、G149S、G149V、F161W、T163S、P164S、Q167T、Q167V、A184S、I185L、I185Y、T195F、I222L、L227R、W228F、V229C、V229I、D249T、F250I、F250Y、R251I、R251K和R251V。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自下组:N2E、N2F、N2L、N2S、P8T、T17I、T17M、T17N、T17R、P20D、P20E、P20I、P20Q、F21Y、A24D、A24G、A24H、A24N、A24T、Y26C、L31M、G38D、G46E、G46N、G46R、A55C、A55I、A55M、A55T、S57C、S57E、S57F、S57L、S57T、V83I、V83L、N87Q、S95N、A97C、A97E、A97L、A97P、A97Q、A97S、A97T、A97V、S101C、S101Y、T109A、T109G、T109Y、S110D、S110K、S110N、A117F、A117L、A117T、A117Y、V126I、L137M、Q142D、Q142E、Q142H、G149D、G149N、G149T、F161V、T163I、P164E、P164H、P164N、P164R、P164T、V165I、Q167I、I169C、I169L、I169V、A172T、A184C、A184G、I185A、I185E、I185G、I185Q、I185R、I185S、L191F、L191V、P192A、K197L、K197R、K197T、K197V、K197Y、A216T、V229L、R236H、D249I、D249M、D249N、D249S、F250L、F250V、R251A、R251E、R251L、R251Q、R251T和N253S。

[0006] 在一些实施方案中,所述变体Bhr-PETase酶在所述位置的一个、所述位置的两个、所述位置的三个、所述位置的四个、所述位置的五个、所述位置的六个、所述位置的七个、所述位置的八个、所述位置的九个、所述位置的十个、所述位置的十一个、所述位置的十二个、所述位置的十三个、所述位置的十四个、所述位置的十五个、所述位置的十六个、所述位置的十七个、所述位置的十八个、所述位置的十九个或所述位置的二十个处具有一个或多个氨基酸取代。

[0007] 在一些实施方案中,所述变体Bhr-PETase包含选自下组的氨基酸取代组:A102V/T136M、A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K、D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E、D18R/I139A/F161W/W228F、D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P、D18R/I54V/I82F/R108T/V150I/N253Y/N254R、D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I、D18R/M56I/I139A/L227R/W228F、D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L、D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203N/N254R、D18R/N85D/R108T/L119I/N190S/T194S、D18R/V40T/I139A/D203N、D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N、D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N、G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P、I143R/Q167T/V198A/W228F、I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N、L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N、M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P、M56I/S88T/R108T/N190S/L227R、N204A/Q237R、N9A/D18R/M56I/N85D/L119I/N254R、N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L、N9A/S22A/Q167T、N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L、N9S/T25H、Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y、Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q、R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N、S101F/T136A、S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T、S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E、S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E、S22A/I54V/R72P/F92Q/V150I/V200L、S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S、S22I/Y26K、S27T/I82L/P213N、S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T、S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/

T145S/P213N、S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A、S32Y/A62T、S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P、S98Q/A209V、T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200L、T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L、T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N、T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T、T16E/D18R/M56I/V150I/S218A/V219K、T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/N190S/T194S、T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S、T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167T/D203N、T16E/D18R/S88T/R108T/W228F、T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P、T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N、T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L、T17A/I82L/F92Y/P213N、T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/S140A/I143N/G149A/Q167V、T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T、T17A/Q167V、T17A/S27T、T17A/S27T/I82L、T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N、T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/S27T/I82L/P213N、T17A/S27T/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/I82L/S252T、T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N、T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N、T17A/S27T/T48S、T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N、T17A/S27T/T48S/A135G/S140A、T17A/S27T/T48S/I82L、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y、T17A/S27T/T48S/P213N、T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V、T17A/T48S/I82L、T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T、T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V、T17A/T48S/P213N、T17K/A125S、V177A/A216L、L90F/F92G/D158L/A174R/D203V、V23L/A24V/S32K/N87F/F92Y/A125S/T136A、P20T/L90Y/F92L/S101M/D158E/A174K/I222L、D18R/S32K/Y60H/L90F、P20T/F21W/A24V/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136A、Y60H/S101A/A114K/A117Q/D203R/I222L、S32Q/F92G/S101Q/A114K/Q142W/D158I/D203R/I222L、T17G/L90F/F92L/T109R/A114K/D158E/D203V/I222L、R12K/S32K/F92L/T136A/D158E/A174R、L90F/F92G/T109K/A125S/A174K、S32K/L90F/F92L/T109K/A114K/Q142W、V23T/S32Q/N87I/L90F/F92Y/S101N/A114V/Q142W/A174R/D203R/I222L/V229I、S32Q/F92G/A114V/D203V、R12K/S32K/L90Y/F92L/T136A/A174K/D203V/I222L、R12K/A14K/V23T/L90Y/F92G/S101A/D203R、T17G/S32M/L90Y/F92Y/D203R/A216P、S32Q/F92L/A114V/A125S、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/A114K/A125S/T136V/D158E/A174K/D203V/I222L、R12K/F21W/S32K/F92L/T109K/A125S/T136V/D158E/D203R、T17Q/L90Y/F92L/A174K/D203V/I222L、F21W/F92L/S101A/A117Q/D203R、T17A/S32M/Y60H/Q142L/D203V/I222L、R12K/Y60H/L90F/S101R/A114V/A117N/D158E、T17S/D18R/L90Y/F92G/A114V/A117Q/D203R、L90Y/F92L/S101A/S110R/A125S/Q142W/A174R/A216P、S32M/S110R/A125S/D158E、R12K/V23L/A24V/F92G/T136V/D203R、A24V/S32Q/F92L/T136V、S32K/L90Y/F92G/A114K/D203V、S32M/L90F/F92G/A114V/A117N/A125S/A174K/D203R、R12K/T17A/V23L/A24V/L90F/F92G/S101N/A125S/Q142W/D158I/D203R、P20T/F21W/Y60I/S101A/T109K/A174K、T17C/L90Y/

F92L/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R、T17Q/L90F/F92G/S101M/A117Q/T136A/D158I/A174R、V23L/L90F/F92G/A125S/D203V/I222L、T17C/L90Y/F92L/A125S/T136V/D158E/A174K、V23L/S32Q/Y60I/A117Q/T136A/A174K/V229C、V23T/L90F/F92Y/D203V、R12K/A24V/Y60H/A174R、T17G/P20T/Y60I/F92G/D203V、L90Y/F92L/S110R/A125S/D158E/D203V、T17Q/L90Y/F92L/T109L/T136A/D158E/A174R/D203V/V229C、R12K/V23T/A24V/S32Q/F92G/D158L/A174R/D203R、S32M/N87Y/L90F/F92G/A174K/D203V、T17S/V23L/S32Q/L90F/F92L/A114K/A117N/A125S/T136V/D158E/D203V/V229I、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/T109L/S110R、A14K/S32M/L90Y/S101R/A114V/T136A/A216P、P20T/F21W/L90Y/F92G/A125S/A174K/V229I、V23L/S32K/L90F/F92L/S101R/T109R/T136V/I222L、A24V/F92L/Q142L/A216P、F92G/A125S/T136A/D158E/A216P、N87R/F92G/A117N/D203V/A216P、R12K/A14K/F92G/S110R/A117N/A125S/A174R/D203R、S32Q/N87F/L90F/F92G/S101M/A114V/A117Q/D203V、T17Q/A24V/N87M/F92G/A114K/A117N/D158E/D203R/I222L、N2R/S32Q/L90F/F92G/Q142L/D203V、A14K/S32Q/L90F/F92G/A114K/A117N/A174R/D203V/A216P/I222L、R12K/P20T/D158E/D203R/I222L、N2R/A14K/T17A/L90F/F92G/S101H/A174R/D203V、T17G/A24V/L90F/F92G/Q142W、S32K/L90Y/F92Y/S101A、V23T/N87I/F92G/A125S/T136A/D158L/D203R、T17S/N87L/V229I、A24T/L90F/F92L/A125S/T136A/D203V、R12K/A14K/F92G/T109R/T136A/Q142L/D158E/A174K/D203R/I222L、A24V/S32Q/Y60A/T136A、D18R/S32Q/N87H/L90Y/F92G/S101K/Q142L/D158I/A174R、T17A/F21W/S32K/N87F/L90F/F92Y/S101Q/T136A/D203R、A24V/L90F/F92G/A114V/A117N/T136V/Q142L/D203V/V229C、T17Q/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/T136V/Q142L/D203V/A216P、S32Q/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136V、Y60H/N87K/A114K/A117Q/D158E/A174K/A216P、P20T/L90Y/T109K/T136A/D158I/D203R、T17L/Y60A/D203V、N2R/S32Q/L90Y/F92Y/T109K/D203V、T17H/A24V/S32Q/L90Y/F92L/S101H/A114K/D158I/A174R/D203V、N2R/S32M/F92Y/T109K/S110R/I222L、P20T/F92Y/S101K/A125S/D158E/D203R、R12K/A14K/P20T/F21W/S32M/F92L、R12K/A14K/V23T/A24V/L90F/F92L/S101W/T136A/D203V、T17L/S32K/F92L/T109L/A114V/T136V/D158L/R236H、P20T/F21W/S32Q/N87F/F92L/D158E/D203V、F21W/L90F/F92G/S101A/A114V/A125S/T136V/Q142L/D203V/A216P、P20T/F21W/S32K/F92G/A125S/V229I、V23T/A24V/L90Y/F92G/A125S/T136V/D203V、P20T/S32K/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R/A216P、V23L/L90F/F92L/T136A/D203R/I222L、R12K/A14K/A24V/N87L/L90Y/A125S/T136V/A216P、P20T/F21W/L90Y/A125S、N2R/L90Y/A114K/A117Q/D203V/V229I、F21W/S32K/L90Y/A125S/D158E/A216P/V229I、S27L/T136V、S27L/P8T/T17Q/F21W/S101A/T136V/Q142L、S27L/N2R/T17L、S27L/V23T/A24V/T136A/Q142W、S27L/F21W/T136V、S27L/T17Q/T109K/A114K/T136V/V229I、S27L/T17Q、S27L/T136V/I222L/V229C、S27L/T17A/A114V/A117N/T136A、S27L/亲本、S27L/N2R/T136A、S27L/N2R/T17A、S27L/T17C/S101A/T136V、S27L/P20T/T136A、S27L/T136V/Q142W/V229I、S27L/T109K/T136V/I222L/V229I、S27L/T17L/S101H/A117N/Q142L/I222L/V229I、S27L/S101Q/T109L/A117N/T136A/Q142L、S27L/T109K/S110R/S193N/S252T/R255M、S27L/S22R/Y26K/R236Q、S27L/L90F/F92L/S98E/S113Y/A114K/T136A/D158E/S181R/T206G/S212M/V219I、S27L/N9S/S22P/T48N/L90Y/F92G/T109K/S110R/T136A/Q189V/N211F/R236Q、S27L/T17A/Y26L/T48N/I82M/S101D/

R236Q、S27L/Y26T/S101D/D158E/V219I/S252T、S27L/S13R/S98E/T136V/S181R/T206G/V229I/N231S、S27L/F21W/F92L/S98N/S193P/I222L、S27L/S1G/Y26K/L90Y/S113Y/A114V/T136A/Q189V/N204R/N211L/R236Q、S27L/S22K/I82L/L90Y/F92G/R108S/A117N/D158E/S193N、S27L/S1G/N9S/T48S/L90Y/S98T/S101A/S113N/A114K/L119M/S193N/T206G/S252T、S27L/N9E/R12K/S22P/V23L/T160R/D203R/I222L、S27L/N9E/R12K/S22P/V23T/T48S/S98E/R108S/T160S/Q189V/T206G/S212L/V229I、S27L/S1A/N2R/N9S/T48N/L90F/F92L/D203V/S223A、S27L/N9E/R12K/V23T/I82M/L90Y/F92L/T136V/N204K/N231S/R255M、S27L/S1G/N9S/S22V/I82F/L90Y/F92L/A117N/L119M/Q142L/T206G/S212L/S223A、S27L/N9S/Y60H/R108C/S193P/V219L、S27L/N9E/S22K/S32M/L90F/F92G/R108T/L119M/Q189V/I222L/S223A/R236Q、S27L/T17Q/F92G/S98N/Q142L/Q189L/R236C、S27L/N9E/R12K/Q142W/T160Q/T206G/S212M、S27L/Y26T/S113N/A114V/T136A/D158E/D203R/N211F/R236Q/S252T/R255M、S27L/S1A/T17H/S22V/L90Y/F92G/S98E/A114V/T136A、S27L/N9E/T48S/I82M/L90Y/F92L/N122A/A127S/T160S/A174R/T206G/S212L/R255M、S27L/N9S/S22P/V23L/L90Y/F92G/A125S/T160S/N204R/I222L/S223A/R236Q、S27L/N9E/S22P/T48S/L90Y/F92L/T109R/E173R/A174K/D203V/S223A、S27L/R12K/Y26K/T48N/I82L/L90F/A125S/N211I/A216P、S27L/N9S/R12K/F92Y/T109K/S110R/T160K/Q189L/S223A/S252T/R255M、S27L/S1A/N2R/N9E/R12K/S32K/N87F/R108T/N211I/V219K/R255M、S27L/L90F/F92G/N122A/T136A/T160V/E173R/D203R/S252T、S27L/L90Y/F92G/S98T/T109L/D158I/S193K/V219K/R236Q/S252T、S27L/N9E/R12K/T48N/L90F/S98L/R108Q/A117Q/T136A/T206G/S212F/V219I/V229I/R255L、S27L/S1A/S22V/N87K/R108K/N122E/D158E/S193P/V219I/R255M、S27L/F21W/Y26T/S34R/R108H/L119M/N211M/R236C/S252T、S27L/S1A/N9E/R12K/V23T/T48S/N87H/S101Q/Q189L/N211M/V219I/R236Q/R255M、S27L/N9S/T25Q/L90Y/S101D/T136A/Q142L/Q189L/R236Q、S27L/A14K/I82F/F92G/S98E/R108C/A117N/L119M/Q189V/T206G/I222L/S223A、S27L/T17C/Y26T/N87V/R108C/N122E/T136V/S193P/S252T/R255M、S27L/L90Y/F92G/T109L/N122S/R255M、S27L/R12K/L90Y/T160V/A174R/R236Q、S27L/N9E/R12K/T48N/L90Y/F92G/S98T/S113R/N122R/A127S/T136A/A174K/N204K/S212L、S27L/V23T/L90Y/F92G/S98E/T109L/A125S/T160V/A174K/S181C/S193K/T206G/S212M/R255M、S27L/A24V/F92G/S101D/A114V/A117N/A125S/T136V/D203R、S27L/R12K/S32Q/S101Q、S27L/L90F/F92G/T136V/A174R/D203R、S27L/P20T/S32K/L90Y/D203V、S27L/N2R/A14K/T17S/L90Y/T109K/T136V/A216P、S27L/N2R/V23T/A24V/S32M/L90Y/F92G、S27L/A14K/L90Y/F92L/S101D/A117N/D158I/D203R、S27L/F21W/N87H/A114V/A117N/T136V、S27L/N2R/V23T/A24V/N87M/F92L/S101K/A125S/T136A、S27L/L90Y/F92L/S101N/T109R/S110R/Q142W、S27L/S32M/F92G/A216P、S27L/F21W/L90Y/F92L/A114K/A117N/T136A/D203V、S27L/N2R/V23T/S32M/N87M/F92L/T136A、S27L/R12K/L90F/F92G/S101A/D203V、S27L/A24V/L90F/F92G、S27L/R12K/F92L/S101A/A125S/T136A/D203R、S27L/R12K/V23L/L90F/F92L/A114K/T136A/D158E/D203V/I222L、S27L/L90F/F92G、S27L/A14K/P20T/S32Q/L90Y/A125S/D203V、S27L/T17L/L90F/F92G/A125S/A174R/D203V、S27L/N2R/N87K/A114K/A117Q/T136V/D203V、S27L/N2R/A114K/T136V/D203V、S27L/N2R/T17A/T136V/A216P、S27L/N2R/R12K/N87F/T136V/D158E/A174R、S27L/D203R、S27L/R12K/T17Q/T136V/D203V/A216P、S27L/N87F/T109L/Q142L、S27L/N2R/T17Q/A24V/A114K/A117Q/

T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/N2R/P20T/F21W/N87M/T109R/A117N/A125S/
T136V/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/R12K/
V23L/A114K/T136A/D158I/D203V/I222L、S27L/N87Y/T136V/D158E/D203V、S27L/T109K/
S110R/D203R、S27L/N2R/T17L/A125S/T136A/D158E、S27L/A24V/D158E/A174K/A216P、S27L/
T17G/V23L/N87L/A117Q/A125S/T136V/D158E/V229C、S27L/V23L/N87L/T109R/A114K/
A117N/A125S/T136V/Q142L、S27L/N87Y/S101A/A114V/A117Q/T136V/A174K/A216P/I222L
、S27L/R12K/T109R/Q142L、S27L/D203V、S27L/T17G/N87F/S101A/D203V、S27L/T17L/N87M/
Q142L/D203V、S27L/N2R/R12K/S101D/A117N/T136A/D203V、S27L/R12K/P20T/F21W/
A114K/Q142W/D203R、S27L/N2R/T17G/T109L/S110R/A114K/A117Q/T136V/Q142L/D203R、
S27L/N2R、S27L/S32K/L90F/F92G/S101M/A114V/A117N/A125S/T136A/D158E/D203V、S27L/
R12K/T17A/F21W/S32Q/Y60H/D203R、S27L/R12K/F92L/S110R/T136V/I222L、S27L/A14K/
V23T/A24V/L90Y/F92G/A114V/A117Q/Q142L/A174R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S101D/
T109K/A125S/T136A/A174K、S27L/V23T/L90Y/F92G/T136A/D203V/A216P、S27L/T17S/
L90Y/F92G/A117N/T136A/D158L、S27L/A14K/V23L/A24V/F92L/Q142W/D203V、S27L/T17L/
L90F/F92G/S101K/A174K、S27L/L90F/F92L/A125S/T136V/A174K/D203V/A216P/I222L、
S27L/R12K/P20T/S32M/L90F/F92G/S101M/A114V/D203V、S27L/T17A/S32Q/L90F/F92L/
T136V/Q142W/A174K/D203R、S27L/R12K/S32M/L90F/F92G/S101W/A114V/D158I/I222L、
S27L/P20T/S32M/L90Y/F92L/A114V/A117N/I222L、S27L/T17C/L90Y/F92G/T136A/A174K/
D203V、S27L/S32Q/N87Y/F92G/T109K/A114K/A117N/T136V/D203V/V229C、S27L/F21W/
L90F/F92G/T136V/A174R、S27L/P20T/N87Y/T136A/D203V/I222L、S27L/A24V/L90Y/F92L/
D158I/A174K/D203R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S110R/A114K/T136V/D203R/A216P/
V229I、S27L/N87H/F92G/D203R、S27L/R12K/S32K/Y60A/A125S/T136V/D158L、S27L/V23T/
A24V/S32Q/L90F/F92L/T136A、S27L/F92L/A114V/D158E/D203R、S27L/S32Q/L90Y/D203V/
V229I、S27L/V23T/S32Q/Y60H/T109K/T136V/A216P/I222L、S27L/A14K/A24V/L90F/F92G/
T109K/T136V/D158L/A174R/D203V/I222L/V229I、S27L/R12K/N87F/A174K、S27L/P20T/
S32Q/Y60H/T109K/A114V/T136A/A174K、S27L/V23T/A24V/Y60A/A125S/A174R/A216P、
S27L/F92Y/D158L/I222L、S27L/V23L/A24V/L90Y/F92G/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/
S32Q/L90F/F92G/S101H/T136A/A174K/D203V/V229C、S27L/S32K/N87H/A125S、S27L/
P20T/F21W/F92G/A114V、S27L/T17L/V23L/A24V/L90Y/F92L/A117N/T136V/L137M/Q142L、
S27L/P20T/L90Y/D203R、S27L/S110R/Q142L/D158I/D203R/V229I、S27L/P20T/S32Q/L90F/
F92L/T109K/S110R/A125S/D203V、S27L/V23T/A24V/L90F/F92G/D158E/D203R、S27L/
F92G/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/P20T/L90Y/F92G/T109R/S110R/A125S/D203R、
S27L/A14K/L90Y/F92L/D158L/A174R/D203V、S27L/F21W/S32Q/L90Y/F92G/T109L/S110R/
A117N/D158I/A174K/D203V、S27L/R12K/A114K/A117N/D158E/D203V、S27L/T17S/N87H/
T109R/A114K/A117N/T136V/Q142W/D203V、S27L/N2R/N87Y、S27L/T17S/V23T/A24V/S32Q/
Y60H/N87K/T136A/D203R、S27L/P20T/F92Y/T109K/D158E/D203V、S27L/S32K/N87M/F92L/
S101M/T109L/S110R/D203V、S27L/L90Y/F92G/T136A/D158E/D203V/A216P/V229I、S27L/
A14K/S32M/F92L/A125S、S27L/L90Y/F92G/T136V/D158L/D203V、S27L/A24V/L90Y/F92G/
S101A/T109L/S110R/A117Q/A174R/D203R、S27L/P20T/S101D/A114V/T136V/Q142W/D158E/

D203R/A216P、S27L/N87Y/F92G/S101Q/A114K/A117N/T136A/D158L/D203R/A216P、S27L/V23T/A24V/N87Y/L90Y/F92L/S101D/T109R/A174K/D203R/A216P、S27L/N2R/P20T/F21W/L90F/F92Y、S27L/L90Y/F92G/D158I/D203V/V229C、S27L/S32Q/F92G/Q142W/I222L、S27L/N2R/R12K/S32M/N87Q/L90F/F92L/I222L、S27L/R12K/S32K/F92L/A114V/A117Q/T136A/D158E/A216P、S27L/L90Y/F92G、S27L/R12K/F21W/S32M/F92G/T136V/Q142L/D203R、S27L/R12K/A14K/L90Y/F92L/A125S/A174K、S27L/A24V/A114V/A117Q/T136V/D203V、S27L/R12K/T17Q/V23L/S32M/L90Y/F92G/S101D/T136V/I222L、S27L/V23T/A24V/S32Q/F92L/S101N/T109L/S110R/D203R、S27L/P20T/Y60H/N87K/T136A/A174R/D203V、S27L/P20T/F21W/L90Y/F92L/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/T17G/F21W/S32K/L90F/F92G/A125S/T136A/A174K、S27L/T17G/N87Y/T136A/D203V/A216P、S27L/F21W/L90F/F92G/S101D/A117N/T136A/A174K/D203V、S27L/R12K/A14K/A24V/L90Y/D203V、S27L/N2R/L90F/F92G/S101M/Q142L/D158L、S27L/N2R/T17C/A24V/N87K/A174K/A216P、S27L/N87M/Q142L/I222L、S27L/F92L/S98T/R108C/A117Q/A127S/Q142L/Q189V/A216P/R236Q、S27L/S22K/F92L/R108H/A127S/T136A/N211I、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109L/A127S/T136V/N204K/S223A、S27L/T17L/L90Y/F92L/S98M/A174K/D203V/N211M/S212L/S223A、S27L/N87K/S98M/N211M、S27L/N9E/S22P/L90Y/N204K、S27L/S32M/T48S/F92G/A127S/Q142W、S27L/T17S/S22K/L90F/F92L/D158E/D203V/V219I/S252T、S27L/L90F/F92L/A127S/D203V、S27L/T25F/L90Y/F92G/N204R/S223A/N231S/R236C、S27L/F21W/S22V/T48S/L90F/F92L、S27L/S1A/S98T/S113K/A114V/L119M/A127S/Q142W/S193K/V219K/S252T/R255L、S27L/A24V/I82L/L90F/F92G/T109L/L119M/A127S/E173R/N204K、S27L/T17C/Y60H/L90F/A127S/E173R/A174R/N204K、S27L/L90F/F92L/Q142W/D203V/S223A、S27L/P20Q/L90Y/Q142L/S223A、S27L/N9S/Y60A/A216P/R236Q/R255M、S27L/F92G/R108C/S110R/A117Q/T136A/N211M、S27L/S22P/Y60H/S98A/S113K/A114K/T136V/Q189L/S193H、S27L/V23L/S98A/Q142L/N211M、S27L/V23L/Y26L/L31M/T48S/F92G/A174R/N204K/S252T、S27L/S13R/A14K/Y26T/T136A/S181R/N211M/S212M、S27L/F21W/I82F/L90Y/F92G/A127S/N211M、S27L/P20T/Y60H/S98L/T136A/R255L、S27L/P20T/S34R/N87M/D158E/S252T、S27L/T25A/L90F/F92G/Q189L/S193P/V229I、S27L/V219L/I222L、S27L/N9E/T48S/L90F/F92L/S98N/R108H/S110R/S113Y/N211V/S212L/S252T、S27L/L90F/F92Y/S113R/V219I/R255L、S27L/F21W/S22K/T48S/F92G/T109R/A127S、S27L/S1G/A14K/P20T/S32K/T48S/L90Y/F92L/T109L/T160R/V219L/I222L/S252T/R255L、S27L/L90F/F92G/D158E/T160R/S193N/N204K/S223A、S27L/A14K/Y26T/F92L/Q142L/S212L、S27L/S22R/L90Y/F92G/V126I/A127S/A174K/N204K、S27L/P20T/T25A/L90F/F92L/A117N/L119M/S252T/R255L、S27L/T17A/A24V/T48S/L90F/F92G/T109R/A127S/T160K/D203R/S223A、S27L/F21W/T48S/T109L/A127S/V219I/R255L、S27L/A14K/S22P/T48S/L90F/F92L/T109L/A127S/Q142L/A174R/N204K/S223A、S27L/T136A/S212M/N231S、S27L/F21W/L90F/F92G/A127S/S223A、S27L/T48S/L90Y/F92L/R108S/S110R/A127S/T136V/E173R/S223A、S27L/T48S/F92G/S98E/Q142L/Q189V/S193P/N204R/S223A、S27L/T17S/L90F/F92Y/S101K/A127S/T136V/N204R/N211I/V229I/N231S、S27L/N9E/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109R/N204K/R236Q、S27L/N9E/S22R/T48S/F92L/S101N/A127S/E173R/N204R、S27L/S22K/N87F/A117Q/S181C/N204K/N211M/V229I/N231S/R236Q、S27L/N9S/

T48S/L90F/F92G/S101N/A127S/N204K/A216P/S252T/R255M、S27L/I82L/S193H/N211M/S212F/S223A、S27L/A14K/P20T/T48S/L90F/F92G/S98N/R108C/T136A/N204K/N211L/S212L/R236Q/S252T、S27L/S13R/T17L/T25Q/L90F/F92G/R108C/A127S/T160R/I222L/R255L、S27L/T48S/L90Y/F92G/T109L/S193N、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92L/S98E/A127S/T136A/N204K/A216P/S223A、S27L/V23L/N87H/F92L/R108C/S110R/N122A/T160S/Q189L/S193P/N204K/S223A/R255L、S27L/F92G/A127S/A174R/S223A/V229I/N231S/R236C、S27L/S1G/L90Y/A127S/E173R/S223A、S27L/F92Y/S98N/Q142W、S27L/P20T/S32M/S34R/T48S/L90Y/F92L/R108K/A127S/Q142W/A174R/N204K/V219I/S252T、S27L/F92G/A127S/Q189V/S193N/S223A、S27L/S34R/F92G/S110R/D158L/D203V/R255M、S27L/N9E/F21W/T48S/F92G/T109L/A127S/R236C、S27L/S1A/S22P/T48S/L90Y/F92G/A127S/E173R/A174R/N204K/S223A、S27L/S22K/T48S/T160S/N204K、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92G/S98V/R108C/A127S/N211L/S212M/N231S/R236C、S27L/V23L/A24V/A114K/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/V23L/S101H/T109K/A114K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17L/F21W/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17S/T136V/Q142L/I222L/V229C、S27L/T17C/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/P192A/S193H/N204K/S223A/V229I/N231S/R236Q/R255L、S27L/N9E/T48N/N87H/F92L/A174K/Q189L/S193K/N204R/V219I、S27L/A14K/V23L/Y26L/L90F/F92G/S98E/S113K/A114K/T136A/V229I/N231S、S27L/L90Y/F92L/S101D/A117N/Q142L/S193N、S27L/S22K/T25A/L90Y/Q142L/E173R/N204K/S223A、S27L/P20T/L90Y/T109L/A127S/A174K/V229C、S27L/S22V/L90Y/F92L/A117Q/R236C/R255L、S27L/V23L/A24G/Y26T/I82F/L90Y/F92G/R108H/T136A/D158L/T160K/D203V、S27L/A14K/S22K/F92G/A127S/N204K/V229I、S27L/S22V/L90F/F92G/A127S/A174R/A216P/R236C、S27L/V23L/Y60A/S98T/T109L/A127S/T136V/T160Q/N204K/S223A/R255L、S27L/S13R/L90Y/S98L/T160V/Q189L/S193P/A216P/S252T/N253S/R255L、S27L/S22R/I82M/F92L/T109L/A127S/Q142W/Q189L/S223A、S27L/S1G/Y60A/L90F/F92L/N122E/T136A/N204K/S223A/N231S、S27L/S32K/F92G/S98L/R108Q/S110R/R255L、S27L/L90Y/F92G/L119M/A127S/A174R/S252T、S27L/L90F/S110R/S181R/N211F、S27L/A14K/S22P/Y60H/S110R/N122S/D158I/N204K/S223A/R255M、S27L/F92L/S98V/T109L/N122A/E173R/R255L、S27L/S22R/N87L/F92G/R236C、S27L/S32M/S34R/I82L/F92G/N204K/S223A、S27L/A24V/T25Q/Y60I/A127S/A174K/N204K/V219I/S223A/S252T/R255M、S27L/S98V/T136A/N211F、S27L/N9S/L90F/F92L/A127S/N204R/S212M、S27L/S22R/T48S/F92G/R108H/S110R/A127S/E173R/N204K/S223A/R236Q、S27L/A14K/L90Y/F92G/A127S、S27L/A14K/T48S/F92G/E173R/N204R/S223A/N231S、S27L/L90Y/T109R/S113N/V219L/I222L、S27L/N9S/T48S/L90Y/T136A/T206G/S223A、S27L/S22K/T48N/L90F/F92G/N204K/S223A/V229C/N231S、S27L/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/N204R/S223A、S27L/S1G/P20T/S32K/S34R/T48S/N87F/S98A/A127S/T136A、S27L/F21W/S22R/S98E/Q142L/T160V/S223A/S252T/R255L、S27L/P20T/T48S/F92Y/R108K/S110R/A127S/V219L/S223A/V229I/R236Q、S27L/Y26T/L90Y/F92L/A127S/V219L/S252T/R255L、S27L/N9S/F21W/T48S/F92L/A127S/D203V/S212F、S27L/F21W/Y60H/S98E/L119M/D158E/R236Q、S27L/F21W/S22R/L90F/F92L/N122S/Q142W/R236Q、S27L/F21W/T48S/L90F/F92G/T109K、S27L/L90Y/F92L/T109R/A127S/E173R/N204K/S223A

、S27L/N9S/F21W/T48S/L90Y/F92G/A127S/N204K/V219I/R255M 、S27L/N9E/I82F/L90Y/F92L/S95N/T109L/A127S/A174R/S223A 、S27L/L90F/F92L/S98L/N204K/A216P 、S27L/A24V/T48S/A117Q/N211M/S212M/S223A 、S27L/L90Y/F92G/T109L/A127S/N204R/S223A 、S27L/N2R/S32Q/N87K/A125S/V219L 、S27L/S22P/T48S/L90F/F92L/S193N/V219L/S223A 、S27L/T25Q/L119M/N211M/R236Q 、S27L/L90Y/F92G/N122S/A127S/E173R/A216P/R236Q、S27L/P20T/S32K/L90F/F92G/N122E/D158E/T160S/Q189L/S223A/S252T、S27L/N9S/F21W/T48S/N87H/L90F/F92L/S113N/V229C 、S27L/T25Q/I82L/L90F/F92G/S98L/S113R/A114V/T136A/S181R 、S27L/P20T/R108Q/S110R/D203V/N211I 、S27L/S1G/N2R/P20T/Y26T/S32M/T48S/L90Y/F92L/A127S/N204R/V219L、S27L/A14K/P20T/T48N/L90F/F92G/A117Q/A127S、S27L/N9S/T48N/L90Y/F92L/S98M/T109K/A127S/N204R/N211I/S212L/V219I、S27L/F21W/S22R/T48S/L90F/F92L/R108Q/A174K/N204K/S212F/S223A、S27L/S22R/Y60H/S98T/T136V/S193K/R236Q 、S27L/S22K/Y26K/N87Y/L90Y/F92G/T109R/A127S/S252T/R255L 、S27L/L90F/F92L/T109L、 S27L/F21W/F92L/N204K/S252T/R255L、S27L/V23L/L90Y/F92G/A127S/S193K/N204R/V219I/R236C/R255L 、S27L/F21W/L90Y/F92G/A114V/N122S/A127S/N204K/S223A/S252T 、S27L/P20T/Y60A/T109L/Q189L/S212L、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92G/N204K、S27L/S22V/S32K/T48S/I82F/F92G/A127S/N204K/S223A、S27L/A55L、S27L/A97V、S27L/F250L、S27L/T109G、S27L/G38D、S27L/A97S、S27L/A55V/A216T、S27L/P20D、S27L/A55V、S27L/T109Y、S27L/V165I、S27L/A184G、S27L/A97E、S27L/A184S、S27L/A97F、S27L/A97T、S27L/K197Y、S27L/A55I、S27L/A97P、S27L/A55M、S27L/P20E、S27L/A117L、S27L/T109L、S27L/K197T、S27L/T136S、S27L/A97L、S27L/T109A、S27L/P20I、S27L/L191V、S27L/A184C、S27L/A97Q、S27L/F250V、S27L/K197V、S27L/A117S、S27L/K197R、S27L/T109K、S27L/A55C、S27L/N2S/V177A、S27L/Q142D、S27L/G149C、S27L/F21Y、S27L/G149A、S27L/P164E、S27L/Y26C、S27L/T17N、S27L/S57M、S27L/D249I、S27L/T17S、S27L/P164T、S27L/Q142L、S27L/D249N、S27L/I185R、S27L/V83L、S27L/G149S、S27L/A24D、S27L/R251V、S27L/V83I、S27L/S110N、S27L/T17M、S27L/F161W、S27L/G46E、S27L/D249T、S27L/T17I、S27L/S57C、S27L/S57T、S27L/S57L、S27L/Q167T、S27L/S57E、S27L/T17K、S27L/G149N、S27L/Q142E、S27L/S57F、S27L/T17A、S27L/P164H、S27L/T17R、S27L/G149T、S27L/R251T、S27L/S101Y、S27L/S57V、S27L/A24T、S27L/I185E、S27L/G46N、S27L/P164N、S27L/P164S、S27L/Q167V、S27L/F161V、S27L/S57I、S27L/G149D、S27L/Q167I、S27L/I185Q、S27L/N2L/T17I/T136S/P164H/D249M、S27L/P20E/F21Y/I139T/P164H/K197T/R251E 、S27L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I 、S27L/P20T/A24V/S101Q/T109R/A117Q/I222L/V229I 、S27L/S110D/A184S/K197T、S27L/T136S/D249T、S27L/F21Y/A184S、S27L/N2F/P20E/S110D/A184S/L191V/R251V 、S27L/T17G/V23T/A24V/T109L/A117Q/T136A/I222L/V229I 、S27L/P20D/F21Y/A55T/F250L/R251V、S27L/T109R/A117N/I222L/V229C、S27L/F21Y/A55T/T109A/A184S、S27L/V23L/A24V/S101K/A117N/I222L/V229C、S27L/S110K/A117Y/P164R、S27L/I139T/Q142E/I169V、S27L/A24H/R251V、S27L/F21W/A114V/T136A/I222L/V229I、S27L/N2S/A55V/I185Q/R251E、S27L/N2F/S101Y/Q142L/G149T/Q167I/I169C/V229L 、S27L/N2F/S101C/A117F/P164S 、 S27L/Q142H/I185S/R251A 、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/I222L/V229I 、S27L/G46R/T109K/T136S/D249T、S27L/N2E/G46N/A55V/I185Y/D249I、S27L/V83L/F250V/R251E、S27L/F21W、

S27L/S57C/R251E、S27L/V23L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I 、 S27L/A24N 、S27L/T17A/P20T/S101Q/T109K/S110R/T136A/I222L/V229C 、S27L/P164T/V165I/R251E、S27L/F21Y/G46E/A117T/T136S/G149C/R251Q、S27L/G46N/I139T/Q142E/P164T/I185A/V229L/F250V 、S27L/V23L/T136A/I222L/V229I 、S27L/V23T/A24V/T109K/A114K/A117Q/T136A/I222L/V229C 、S27L/F250L/R251Q、S27L/P20E/F21Y/S57T/P164N/A184C/V229C、S27L/P20T/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/V83L/A97S/A184C/D249S、S27L/P20T/S101H/A114V/A117N/I222L/V229I、S27L/N2E/R251L、S27L/P20E/F21Y/S110D/A117S、 S27L/T17A/V23T/A24V/T136A、S27L/P20D/S57E/S101C 、 S27L/N2S/V83L/A184S 、S27L/T17S/S101N/T109K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229C 、S27L/P20D/A55T/A117Y/K197R 、 S27L/P20T/I222L/V229C 、S27L/T17I/A24D/S57I、S27L/N2F、S27L/T109K/A117N/T136V/I222L/V229C、S27L/N2L/A24T、S27L/N2F/P20I/F21Y/R251Q、S27L/N2F/G46E、S27L/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/K197R/R251E、S27L/T17S/R251T、S27L/P20I/F21Y/A117F/I185G/D249N 、S27L/T17L/S101M/T109K/S110R/A117Q/I222L/V229C 、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229C 、 S27L/V229I 、S27L/T17A/F21W/S101Q/I222L/V229C、S27L/T17S/F21W/Q142L、S27L/T17L/T109L/S110R/A117Q/I222L/V229I、S27L/F21W/T136A、S27L/P20E/F21Y/G46E/V83L/A97Q 、S27L/P20T/F21W/T136A/Q142L/I222L/V229I 、S27L/T17G/F21W/A117N/I222L/V229I 、S27L/F21W/T109K/S110R/T136A/V229I 、S27L/T17C/T109K/A117N/T136A/I222L/V229I 、S27L/P20T/T109L/S110R/A117N/I222L/V229I 、S27L/A24N/P164S/K197V/R251T 、 S27L/V23L/A117Q 、S27L/A55V/V83L/A117T、S27L/P20D/G46S/A55I/K197T、S27L/A117Y、S27L/F21W/S101M/I222L/V229C 、S27L/N2L/T17N/S57C/S110D/A117L/P164N/I185G/V229L/R251T 、S27L/N2E/G46S/V83L/T136S/A172T/V229C/D249N 、S27L/P20T/T109R/A114K/A117Q/T136V/I222L/V229C 、S27L/V23L/A24V/T136A/Q142W/I222L/V229I 、 S27L/N2L 、S27L/T17A/F21W/T109R/S110R/I222L/V229I 、S27L/T17C/A114K/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/V23L/I222L/V229C、S27L/S101N/A117Q/I222L、S27L/N2E/P20I/T109L/L191V/K197L/V229C、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2L/G46E/T109K/F161V、S27L/T17S/V229I、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229I、S27L/N2L/A172T、S27L/P20D/F21Y/F250V 、 S27L/N2L/A24H/A55C/V229L 、S27L/N2L/P20E/F21Y/V229L 、S27L/V23T/T109L/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229C 、S27L/P20T/F21W/I222L/V229C 、S27L/T17H/F21W/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/G46E/A55I/Q142E、S27L/N2F/R251Q、S27L/F21W/Q142L/I222L/V229C、S27L/I222L/V229I、S27L/P20T/S101M/A114V/A117N/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/A24V/S101W/T136A、S27L/N2S/P20D/A97C/A117F/F250L/R251E、S27L/S101M/A114V/A117Q/T136A 、 S27L/T163I 、S27L/S101Q/Q142L/I222L/V229I 、 S27L/F21W/I222L/V229C 、S27L/S101M/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/A24V、S27L/A24D/K197L、S27L/T17H/S110K 、S27L/P20T/F21W/V229I 、S27L/T17G/P20T/F21W/A117Q/I222L/V229C 、S27L/F21W/A24V/A114V/A117Q/Q142W/I222L/V229C 、S27L/P20T/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/N2F/D249N/F250L、S27L/V23T/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20E/A24D/D249S/F250V、S27L/A24D/S110K、S27L/T109R/I222L/V229I、S27L/P20E/F21Y/K197T 、S27L/T17A/V23L/S101M/T109K/S110R/A114V/A117Q/T136V/V229I 、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229I、S27L/P20T/V23T/A24V/T109L/S110R/

I222L/V229I、S27L/A24D/L191F/R251Q、S27L/A24D/T136S/F250V、S27L/P20T/F21W/T109L/T136A/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2E/I169L/F250L/R251Q、S27L/N2S/A24N/G46E/A55L/Q142D/V229C/R251L、S27L/N2E/P20E/F250V/R251L、S27L/N2F/P20E、S27L/A24V/V229C、S27L/P20D/F21Y/G46N/S110K/T163I/Q167V、S27L/P20T/T109K/A114K/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/S101D/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/Q142W/I222L/V229C、S27L/A24D/T109L/K197L、S27L/T17Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17A/A24V/S101D/S110R/T136A、S27L/P20T/F21W/T109R/A117Q/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/P20T/F21W/T109K/A117N/I222L/V229C、S27L/P20T/S101M/I222L/V229I、S27L/N2S/A24D/S101Y/P164E/V165I/I185E、S27L/T17N/A117S/V229L/R251A、S27L/S101W/A114V/T136V/V229C、S27L/P20D/G46N/A55C/S110N/T163I/A184S、S27L/A24H/G46E、S27L/T17H/S101Q/T136V/Q142L/V229C和S27L/V23T/A24V/I222L/V229C。在一些实施方案中,所述变体Bhr-PETase包含选自下组的氨基酸取代组:A102V/T136M、A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K、D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E、D18R/I139A/F161W/W228F、D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P、D18R/I54V/I82F/R108T/V150I/N253Y/N254R、D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I、D18R/M56I/I139A/L227R/W228F、D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L、D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203N/N254R、D18R/N85D/R108T/L119I/N190S/T194S、D18R/V40T/I139A/D203N、D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N、D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N、G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P、I143R/Q167T/V198A/W228F、I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N、L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N、M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P、M56I/S88T/R108T/N190S/L227R、N204A/Q237R、N9A/D18R/M56I/N85D/L119I/N254R、N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L、N9A/S22A/Q167T、N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L、N9S/T25H、Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y、Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q、R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N、S101F/T136A、S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T、S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E、S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E、S22A/I54V/R72P/F92Q/V150I/V200L、S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S、S22I/Y26K、S27T/I82L/P213N、S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T、S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/T145S/P213N、S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A、S32Y/A62T、S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P、S98Q/A209V、T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200L、T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L、T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N、T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T、T16E/D18R/M56I/V150I/S218A/V219K、T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/N190S/T194S、T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S、T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167T/D203N、T16E/D18R/S88T/R108T/W228F、T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P、T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N、T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L、T17A/I82L/F92Y/P213N、T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/

S140A/I143N/G149A/Q167V、T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T、T17A/Q167V、T17A/S27T、T17A/S27T/I82L、T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N、T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/S27T/I82L/P213N、T17A/S27T/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/I82L/S252T、T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N、T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N、T17A/S27T/T48S、T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N、T17A/S27T/T48S/A135G/S140A、T17A/S27T/T48S/I82L、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y、T17A/S27T/T48S/P213N、T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V、T17A/T48S/I82L、T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T、T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V、T17A/T48S/P213N、T17K/A125S和V177A/A216L。在一些实施方案中,所述变体Bhr-PEase包含选自下组的氨基酸取代组:A102V/T136M、A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K、D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E、D18R/I139A/F161W/W228F、D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P、D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I、D18R/M56I/I139A/L227R/W228F、D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L、D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203N/N254R、D18R/V40T/I139A/D203N、D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N、D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N、G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P、I143R/Q167T/V198A/W228F、I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N、L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N、M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P、M56I/S88T/R108T/N190S/L227R、N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L、N9A/S22A/Q167T、N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L、Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y、Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q、R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N、S101F/T136A、S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T、S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E、S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E、S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S、S27T/I82L/P213N、S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T、S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/T145S/P213N、S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A、S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P、T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200L、T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L、T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N、T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T、T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/N190S/T194S、T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S、T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167T/D203N、T16E/D18R/S88T/R108T/W228F、T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P、T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N、T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L、T17A/I82L/F92Y/P213N、T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/

S140A/I143N/G149A/Q167V、T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T、T17A/Q167V、T17A/S27T、T17A/S27T/I82L、T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N、T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V、T17A/S27T/I82L/P213N、T17A/S27T/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/I82L/S252T、T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N、T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T、T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N、T17A/S27T/T48S、T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N、T17A/S27T/T48S/A135G/S140A、T17A/S27T/T48S/I82L、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V、T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T、T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y、T17A/S27T/T48S/P213N、T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V、T17A/T48S/I82L、T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T、T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V、T17A/T48S/P213N、T17K/A125S和V177A/A216L。在一些实施方案中,所述变体Bhr-PETase包含选自下组的氨基酸取代组:L90F/F92G/D158L/A174R/D203V、V23L/A24V/S32K/N87F/F92Y/A125S/T136A、P20T/L90Y/F92L/S101M/D158E/A174K/I222L、D18R/S32K/Y60H/L90F、P20T/F21W/A24V/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136A、Y60H/S101A/A114K/A117Q/D203R/I222L、S32Q/F92G/S101Q/A114K/Q142W/D158I/D203R/I222L、T17G/L90F/F92L/T109R/A114K/D158E/D203V/I222L、R12K/S32K/F92L/T136A/D158E/A174R、L90F/F92G/T109K/A125S/A174K、S32K/L90F/F92L/T109K/A114K/Q142W、V23T/S32Q/N87I/L90F/F92Y/S101N/A114V/Q142W/A174R/D203R/I222L/V229I、S32Q/F92G/A114V/D203V、R12K/S32K/L90Y/F92L/T136A/A174K/D203V/I222L、R12K/A14K/V23T/L90Y/F92G/S101A/D203R、T17G/S32M/L90Y/F92Y/D203R/A216P、S32Q/F92L/A114V/A125S、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/A114K/A125S/T136V/D158E/A174K/D203V/I222L、R12K/F21W/S32K/F92L/T109K/A125S/T136V/D158E/D203R、T17Q/L90Y/F92L/A174K/D203V/I222L、F21W/F92L/S101A/A117Q/D203R、T17A/S32M/Y60H/Q142L/D203V/I222L、R12K/Y60H/L90F/S101R/A114V/A117N/D158E、T17S/D18R/L90Y/F92G/A114V/A117Q/D203R、L90Y/F92L/S101A/S110R/A125S/Q142W/A174R/A216P、S32M/S110R/A125S/D158E、R12K/V23L/A24V/F92G/T136V/D203R、A24V/S32Q/F92L/T136V、S32K/L90Y/F92G/A114K/D203V、S32M/L90F/F92G/A114V/A117N/A125S/A174K/D203R、R12K/T17A/V23L/A24V/L90F/F92G/S101N/A125S/Q142W/D158I/D203R、P20T/F21W/Y60I/S101A/T109K/A174K、T17C/L90Y/F92L/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R、T17Q/L90F/F92G/S101M/A117Q/T136A/D158I/A174R、V23L/L90F/F92G/A125S/D203V/I222L、T17C/L90Y/F92L/A125S/T136V/D158E/A174K、V23L/S32Q/Y60I/A117Q/T136A/A174K/V229C、V23T/L90F/F92Y/D203V、R12K/A24V/Y60H/A174R、T17G/P20T/Y60I/F92G/D203V、L90Y/F92L/S110R/A125S/D158E/D203V、T17Q/L90Y/F92L/T109L/T136A/D158E/A174R/D203V/V229C、R12K/V23T/A24V/S32Q/F92G/D158L/A174R/D203R、S32M/N87Y/L90F/F92G/A174K/D203V、T17S/V23L/S32Q/L90F/F92L/A114K/A117N/A125S/T136V/D158E/D203V/V229I、P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/T109L/S110R、A14K/S32M/L90Y/S101R/A114V/T136A/A216P、P20T/F21W/L90Y/F92G/A125S/

A174K/V229I、V23L/S32K/L90F/F92L/S101R/T109R/T136V/I222L、A24V/F92L/Q142L/A216P、F92G/A125S/T136A/D158E/A216P、N87R/F92G/A117N/D203V/A216P、R12K/A14K/F92G/S110R/A117N/A125S/A174R/D203R、S32Q/N87F/L90F/F92G/S101M/A114V/A117Q/D203V、T17Q/A24V/N87M/F92G/A114K/A117N/D158E/D203R/I222L、N2R/S32Q/L90F/F92G/Q142L/D203V、A14K/S32Q/L90F/F92G/A114K/A117N/A174R/D203V/A216P/I222L、R12K/P20T/D158E/D203R/I222L、N2R/A14K/T17A/L90F/F92G/S101H/A174R/D203V、T17G/A24V/L90F/F92G/Q142W、S32K/L90Y/F92Y/S101A、V23T/N87I/F92G/A125S/T136A/D158L/D203R、T17S/N87L/V229I、A24T/L90F/F92L/A125S/T136A/D203V、R12K/A14K/F92G/T109R/T136A/Q142L/D158E/A174K/D203R/I222L、A24V/S32Q/Y60A/T136A、D18R/S32Q/N87H/L90Y/F92G/S101K/Q142L/D158I/A174R、T17A/F21W/S32K/N87F/L90F/F92Y/S101Q/T136A/D203R、A24V/L90F/F92G/A114V/A117N/T136V/Q142L/D203V/V229C、T17Q/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/T136V/Q142L/D203V/A216P、S32Q/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136V、Y60H/N87K/A114K/A117Q/D158E/A174K/A216P、P20T/L90Y/T109K/T136A/D158I/D203R、T17L/Y60A/D203V、N2R/S32Q/L90Y/F92Y/T109K/D203V、T17H/A24V/S32Q/L90Y/F92L/S101H/A114K/D158I/A174R/D203V、N2R/S32M/F92Y/T109K/S110R/I222L、P20T/F92Y/S101K/A125S/D158E/D203R、R12K/A14K/P20T/F21W/S32M/F92L、R12K/A14K/V23T/A24V/L90F/F92L/S101W/T136A/D203V、T17L/S32K/F92L/T109L/A114V/T136V/D158L/R236H、P20T/F21W/S32Q/N87F/F92L/D158E/D203V、F21W/L90F/F92G/S101A/A114V/A125S/T136V/Q142L/D203V/A216P、P20T/F21W/S32K/F92G/A125S/V229I、V23T/A24V/L90Y/F92G/A125S/T136V/D203V、P20T/S32K/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R/A216P、V23L/L90F/F92L/T136A/D203R/I222L、R12K/A14K/A24V/N87L/L90Y/A125S/T136V/A216P、P20T/F21W/L90Y/A125S、N2R/L90Y/A114K/A117Q/D203V/V229I、F21W/S32K/L90Y/A125S/D158E/A216P/V229I、S27L/T136V、S27L/P8T/T17Q/F21W/S101A/T136V/Q142L、S27L/N2R/T17L、S27L/V23T/A24V/T136A/Q142W、S27L/F21W/T136V、S27L/T17Q/T109K/A114K/T136V/V229I、S27L/T17Q、S27L/T136V/I222L/V229C、S27L/T17A/A114V/A117N/T136A、S27L/亲本、S27L/N2R/T136A、S27L/N2R/T17A、S27L/T17C/S101A/T136V、S27L/P20T/T136A、S27L/T136V/Q142W/V229I、S27L/T109K/T136V/I222L/V229I、S27L/T17L/S101H/A117N/Q142L/I222L/V229I、S27L/S101Q/T109L/A117N/T136A/Q142L、S27L/T109K/S110R/S193N/S252T/R255M、S27L/S22R/Y26K/R236Q、S27L/L90F/F92L/S98E/S113Y/A114K/T136A/D158E/S181R/T206G/S212M/V219I、S27L/N9S/S22P/T48N/L90Y/F92G/T109K/S110R/T136A/Q189V/N211F/R236Q、S27L/T17A/Y26L/T48N/I82M/S101D/R236Q、S27L/Y26T/S101D/D158E/V219I/S252T、S27L/S13R/S98E/T136V/S181R/T206G/V229I/N231S、S27L/F21W/F92L/S98N/S193P/I222L、S27L/S1G/Y26K/L90Y/S113Y/A114V/T136A/Q189V/N204R/N211L/R236Q、S27L/S22K/I82L/L90Y/F92G/R108S/A117N/D158E/S193N、S27L/S1G/N9S/T48S/L90Y/S98T/S101A/S113N/A114K/L119M/S193N/T206G/S252T、S27L/N9E/R12K/S22P/V23L/T160R/D203R/I222L、S27L/N9E/R12K/S22P/V23T/T48S/S98E/R108S/T160S/Q189V/T206G/S212L/V229I、S27L/S1A/N2R/N9S/T48N/L90F/F92L/D203V/S223A、S27L/N9E/R12K/V23T/I82M/L90Y/F92L/T136V/N204K/N231S/R255M、S27L/S1G/N9S/S22V/I82F/L90Y/F92L/A117N/L119M/Q142L/T206G/S212L/S223A、S27L/N9S/Y60H/R108C/S193P/

V219L/S27L/N9E/S22K/S32M/L90F/F92G/R108T/L119M/Q189V/I222L/S223A/R236Q/S27L/T17Q/F92G/S98N/Q142L/Q189L/R236C、S27L/N9E/R12K/Q142W/T160Q/T206G/S212M、S27L/Y26T/S113N/A114V/T136A/D158E/D203R/N211F/R236Q/S252T/R255M、S27L/S1A/T17H/S22V/L90Y/F92G/S98E/A114V/T136A/S27L/N9E/T48S/I82M/L90Y/F92L/N122A/A127S/T160S/A174R/T206G/S212L/R255M、S27L/N9S/S22P/V23L/L90Y/F92G/A125S/T160S/N204R/I222L/S223A/R236Q、S27L/N9E/S22P/T48S/L90Y/F92L/T109R/E173R/A174K/D203V/S223A、S27L/R12K/Y26K/T48N/I82L/L90F/A125S/N211I/A216P、S27L/N9S/R12K/F92Y/T109K/S110R/T160K/Q189L/S223A/S252T/R255M、S27L/S1A/N2R/N9E/R12K/S32K/N87F/R108T/N211I/V219K/R255M、S27L/L90F/F92G/N122A/T136A/T160V/E173R/D203R/S252T、S27L/L90Y/F92G/S98T/T109L/D158I/S193K/V219K/R236Q/S252T、S27L/N9E/R12K/T48N/L90F/S98L/R108Q/A117Q/T136A/T206G/S212F/V219I/V229I/R255L、S27L/S1A/S22V/N87K/R108K/N122E/D158E/S193P/V219I/R255M、S27L/F21W/Y26T/S34R/R108H/L119M/N211M/R236C/S252T、S27L/S1A/N9E/R12K/V23T/T48S/N87H/S101Q/Q189L/N211M/V219I/R236Q/R255M、S27L/N9S/T25Q/L90Y/S101D/T136A/Q142L/Q189L/R236Q、S27L/A14K/I82F/F92G/S98E/R108C/A117N/L119M/Q189V/T206G/I222L/S223A、S27L/T17C/Y26T/N87V/R108C/N122E/T136V/S193P/S252T/R255M、S27L/L90Y/F92G/T109L/N122S/R255M、S27L/R12K/L90Y/T160V/A174R/R236Q、S27L/N9E/R12K/T48N/L90Y/F92G/S98T/S113R/N122R/A127S/T136A/A174K/N204K/S212L、S27L/V23T/L90Y/F92G/S98E/T109L/A125S/T160V/A174K/S181C/S193K/T206G/S212M/R255M、S27L/A24V/F92G/S101D/A114V/A117N/A125S/T136V/D203R、S27L/R12K/S32Q/S101Q、S27L/L90F/F92G/T136V/A174R/D203R、S27L/P20T/S32K/L90Y/D203V、S27L/N2R/A14K/T17S/L90Y/T109K/T136V/A216P、S27L/N2R/V23T/A24V/S32M/L90Y/F92G、S27L/A14K/L90Y/F92L/S101D/A117N/D158I/D203R、S27L/F21W/N87H/A114V/A117N/T136V、S27L/N2R/V23T/A24V/N87M/F92L/S101K/A125S/T136A、S27L/L90Y/F92L/S101N/T109R/S110R/Q142W、S27L/S32M/F92G/A216P、S27L/F21W/L90Y/F92L/A114K/A117N/T136A/D203V、S27L/N2R/V23T/S32M/N87M/F92L/T136A、S27L/R12K/L90F/F92G/S101A/D203V、S27L/A24V/L90F/F92G、S27L/R12K/F92L/S101A/A125S/T136A/D203R、S27L/R12K/V23L/L90F/F92L/A114K/T136A/D158E/D203V/I222L、S27L/L90F/F92G、S27L/A14K/P20T/S32Q/L90Y/A125S/D203V、S27L/T17L/L90F/F92G/A125S/A174R/D203V、S27L/N2R/N87K/A114K/A117Q/T136V/D203V、S27L/N2R/A114K/T136V/D203V、S27L/N2R/T17A/T136V/A216P、S27L/N2R/R12K/N87F/T136V/D158E/A174R、S27L/D203R、S27L/R12K/T17Q/T136V/D203V/A216P、S27L/N87F/T109L/Q142L、S27L/N2R/T17Q/A24V/A114K/A117Q/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/N2R/P20T/F21W/N87M/T109R/A117N/A125S/T136V/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L、S27L/R12K/V23L/A114K/T136A/D158I/D203V/I222L、S27L/N87Y/T136V/D158E/D203V、S27L/T109K/S110R/D203R、S27L/N2R/T17L/A125S/T136A/D158E、S27L/A24V/D158E/A174K/A216P、S27L/T17G/V23L/N87L/A117Q/A125S/T136V/D158E/V229C、S27L/V23L/N87L/T109R/A114K/A117N/A125S/T136V/Q142L、S27L/N87Y/S101A/A114V/A117Q/T136V/A174K/A216P/I222L、S27L/R12K/T109R/Q142L、S27L/D203V、S27L/T17G/N87F/S101A/D203V、S27L/T17L/N87M/Q142L/D203V、S27L/N2R/R12K/S101D/A117N/T136A/D203V、S27L/R12K/P20T/F21W/

A114K/Q142W/D203R 、S27L/N2R/T17G/T109L/S110R/A114K/A117Q/T136V/Q142L/D203R 、S27L/N2R 、S27L/S32K/L90F/F92G/S101M/A114V/A117N/A125S/T136A/D158E/D203V、S27L/R12K/T17A/F21W/S32Q/Y60H/D203R 、S27L/R12K/F92L/S110R/T136V/I222L 、S27L/A14K/V23T/A24V/L90Y/F92G/A114V/A117Q/Q142L/A174R/I222L、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S101D/T109K/A125S/T136A/A174K 、S27L/V23T/L90Y/F92G/T136A/D203V/A216P 、S27L/T17S/L90Y/F92G/A117N/T136A/D158L 、S27L/A14K/V23L/A24V/F92L/Q142W/D203V 、S27L/T17L/L90F/F92G/S101K/A174K 、S27L/L90F/F92L/A125S/T136V/A174K/D203V/A216P/I222L 、S27L/R12K/P20T/S32M/L90F/F92G/S101M/A114V/D203V 、S27L/T17A/S32Q/L90F/F92L/T136V/Q142W/A174K/D203R 、S27L/R12K/S32M/L90F/F92G/S101W/A114V/D158I/I222L 、S27L/P20T/S32M/L90Y/F92L/A114V/A117N/I222L 、S27L/T17C/L90Y/F92G/T136A/A174K/D203V 、S27L/S32Q/N87Y/F92G/T109K/A114K/A117N/T136V/D203V/V229C 、S27L/F21W/L90F/F92G/T136V/A174R、S27L/P20T/N87Y/T136A/D203V/I222L、S27L/A24V/L90Y/F92L/D158I/A174K/D203R/I222L 、S27L/F21W/S32Q/L90Y/S110R/A114K/T136V/D203R/A216P/V229I 、S27L/N87H/F92G/D203R、S27L/R12K/S32K/Y60A/A125S/T136V/D158L、S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92L/T136A、S27L/F92L/A114V/D158E/D203R、S27L/S32Q/L90Y/D203V/V229I 、S27L/V23T/S32Q/Y60H/T109K/T136V/A216P/I222L 、S27L/A14K/A24V/L90F/F92G/T109K/T136V/D158L/A174R/D203V/I222L/V229I 、S27L/R12K/N87F/A174K 、S27L/P20T/S32Q/Y60H/T109K/A114V/T136A/A174K 、S27L/V23T/A24V/Y60A/A125S/A174R/A216P、S27L/F92Y/D158L/I222L、S27L/V23L/A24V/L90Y/F92G/D203V/I222L、S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92G/S101H/T136A/A174K/D203V/V229C、S27L/S32K/N87H/A125S 、S27L/P20T/F21W/F92G/A114V 、S27L/T17L/V23L/A24V/L90Y/F92L/A117N/T136V/L137M/Q142L 、S27L/P20T/L90Y/D203R、S27L/S110R/Q142L/D158I/D203R/V229I、S27L/P20T/S32Q/L90F/F92L/T109K/S110R/A125S/D203V 、S27L/V23T/A24V/L90F/F92G/D158E/D203R 、S27L/F92G/T136A/A174R/D203V/V229C 、S27L/P20T/L90Y/F92G/T109R/S110R/A125S/D203R 、S27L/A14K/L90Y/F92L/D158L/A174R/D203V 、S27L/F21W/S32Q/L90Y/F92G/T109L/S110R/A117N/D158I/A174K/D203V、S27L/R12K/A114K/A117N/D158E/D203V 、S27L/T17S/N87H/T109R/A114K/A117N/T136V/Q142W/D203V 、S27L/N2R/N87Y、S27L/T17S/V23T/A24V/S32Q/Y60H/N87K/T136A/D203R、S27L/P20T/F92Y/T109K/D158E/D203V 、S27L/S32K/N87M/F92L/S101M/T109L/S110R/D203V 、S27L/L90Y/F92G/T136A/D158E/D203V/A216P/V229I 、S27L/A14K/S32M/F92L/A125S、S27L/L90Y/F92G/T136V/D158L/D203V、S27L/A24V/L90Y/F92G/S101A/T109L/S110R/A117Q/A174R/D203R 、S27L/P20T/S101D/A114V/T136V/Q142W/D158E/D203R/A216P 、S27L/N87Y/F92G/S101Q/A114K/A117N/T136A/D158L/D203R/A216P、S27L/V23T/A24V/N87Y/L90Y/F92L/S101D/T109R/A174K/D203R/A216P、S27L/N2R/P20T/F21W/L90F/F92Y、S27L/L90Y/F92G/D158I/D203V/V229C、S27L/S32Q/F92G/Q142W/I222L 、S27L/N2R/R12K/S32M/N87Q/L90F/F92L/I222L 、S27L/R12K/S32K/F92L/A114V/A117Q/T136A/D158E/A216P 、S27L/L90Y/F92G、S27L/R12K/F21W/S32M/F92G/T136V/Q142L/D203R、S27L/R12K/A14K/L90Y/F92L/A125S/A174K 、S27L/A24V/A114V/A117Q/T136V/D203V 、S27L/R12K/T17Q/V23L/S32M/L90Y/F92G/S101D/T136V/I222L 、S27L/V23T/A24V/S32Q/F92L/S101N/T109L/S110R/D203R 、S27L/P20T/Y60H/N87K/T136A/A174R/D203V 、S27L/P20T/

F21W/L90Y/F92L/T136A/A174R/D203V/V229C、S27L/T17G/F21W/S32K/L90F/F92G/A125S/
T136A/A174K、S27L/T17G/N87Y/T136A/D203V/A216P、S27L/F21W/L90F/F92G/S101D/
A117N/T136A/A174K/D203V、S27L/R12K/A14K/A24V/L90Y/D203V、S27L/N2R/L90F/F92G/
S101M/Q142L/D158L、S27L/N2R/T17C/A24V/N87K/A174K/A216P、S27L/N87M/Q142L/I222L、
S27L/F92L/S98T/R108C/A117Q/A127S/Q142L/Q189V/A216P/R236Q、S27L/S22K/F92L/
R108H/A127S/T136A/N211I、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109L/A127S/T136V/N204K/
S223A、S27L/T17L/L90Y/F92L/S98M/A174K/D203V/N211M/S212L/S223A、S27L/N87K/
S98M/N211M、S27L/N9E/S22P/L90Y/N204K、S27L/S32M/T48S/F92G/A127S/Q142W、S27L/
T17S/S22K/L90F/F92L/D158E/D203V/V219I/S252T、S27L/L90F/F92L/A127S/D203V、
S27L/T25F/L90Y/F92G/N204R/S223A/N231S/R236C、S27L/F21W/S22V/T48S/L90F/F92L、
S27L/S1A/S98T/S113K/A114V/L119M/A127S/Q142W/S193K/V219K/S252T/R255L、S27L/
A24V/I82L/L90F/F92G/T109L/L119M/A127S/E173R/N204K、S27L/T17C/Y60H/L90F/A127S/
E173R/A174R/N204K、S27L/L90F/F92L/Q142W/D203V/S223A、S27L/P20Q/L90Y/Q142L/
S223A、S27L/N9S/Y60A/A216P/R236Q/R255M、S27L/F92G/R108C/S110R/A117Q/T136A/
N211M、S27L/S22P/Y60H/S98A/S113K/A114K/T136V/Q189L/S193H、S27L/V23L/S98A/
Q142L/N211M、S27L/V23L/Y26L/L31M/T48S/F92G/A174R/N204K/S252T、S27L/S13R/A14K/
Y26T/T136A/S181R/N211M/S212M、S27L/F21W/I82F/L90Y/F92G/A127S/N211M、S27L/
P20T/Y60H/S98L/T136A/R255L、S27L/P20T/S34R/N87M/D158E/S252T、S27L/T25A/L90F/
F92G/Q189L/S193P/V229I、S27L/V219L/I222L、S27L/N9E/T48S/L90F/F92L/S98N/R108H/
S110R/S113Y/N211V/S212L/S252T、S27L/L90F/F92Y/S113R/V219I/R255L、S27L/F21W/
S22K/T48S/F92G/T109R/A127S、S27L/S1G/A14K/P20T/S32K/T48S/L90Y/F92L/T109L/
T160R/V219L/I222L/S252T/R255L、S27L/L90F/F92G/D158E/T160R/S193N/N204K/S223A、
S27L/A14K/Y26T/F92L/Q142L/S212L、S27L/S22R/L90Y/F92G/V126I/A127S/A174K/N204K
、S27L/P20T/T25A/L90F/F92L/A117N/L119M/S252T/R255L、S27L/T17A/A24V/T48S/L90F/
F92G/T109R/A127S/T160K/D203R/S223A、S27L/F21W/T48S/T109L/A127S/V219I/R255L、
S27L/A14K/S22P/T48S/L90F/F92L/T109L/A127S/Q142L/A174R/N204K/S223A、S27L/T136A/
S212M/N231S、S27L/F21W/L90F/F92G/A127S/S223A、S27L/T48S/L90Y/F92L/R108S/S110R/
A127S/T136V/E173R/S223A、S27L/T48S/F92G/S98E/Q142L/Q189V/S193P/N204R/S223A、
S27L/T17S/L90F/F92Y/S101K/A127S/T136V/N204R/N211I/V229I/N231S、S27L/N9E/F21W/
T48S/L90Y/F92L/T109R/N204K/R236Q、S27L/N9E/S22R/T48S/F92L/S101N/A127S/E173R/
N204R、S27L/S22K/N87F/A117Q/S181C/N204K/N211M/V229I/N231S/R236Q、S27L/N9S/
T48S/L90F/F92G/S101N/A127S/N204K/A216P/S252T/R255M、S27L/I82L/S193H/N211M/
S212F/S223A、S27L/A14K/P20T/T48S/L90F/F92G/S98N/R108C/T136A/N204K/N211L/S212L/
R236Q/S252T、S27L/S13R/T17L/T25Q/L90F/F92G/R108C/A127S/T160R/I222L/R255L、S27L/
T48S/L90Y/F92G/T109L/S193N、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92L/S98E/A127S/T136A/N204K/
A216P/S223A、S27L/V23L/N87H/F92L/R108C/S110R/N122A/T160S/Q189L/S193P/N204K/
S223A/R255L、S27L/F92G/A127S/A174R/S223A/V229I/N231S/R236C、S27L/S1G/L90Y/
A127S/E173R/S223A、S27L/F92Y/S98N/Q142W、S27L/P20T/S32M/S34R/T48S/L90Y/F92L/
R108K/A127S/Q142W/A174R/N204K/V219I/S252T、S27L/F92G/A127S/Q189V/S193N/S223A、

S27L/S34R/F92G/S110R/D158L/D203V/R255M、S27L/N9E/F21W/T48S/F92G/T109L/A127S/
R236C、S27L/S1A/S22P/T48S/L90Y/F92G/A127S/E173R/A174R/N204K/S223A、S27L/S22K/
T48S/T160S/N204K、S27L/F21W/T48S/L90Y/F92G/S98V/R108C/A127S/N211L/S212M/N231S/
R236C、S27L/V23L/A24V/A114K/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/S101H/T109R/A114V/
T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/V23L/S101H/T109K/A114K/A117N/T136V/Q142L/I222L/
V229I、S27L/T17L/F21W/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17S/
T136V/Q142L/I222L/V229C、S27L/T17C/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/P192A/
S193H/N204K/S223A/V229I/N231S/R236Q/R255L、S27L/N9E/T48N/N87H/F92L/A174K/
Q189L/S193K/N204R/V219I、S27L/A14K/V23L/Y26L/L90F/F92G/S98E/S113K/A114K/T136A/
V229I/N231S、S27L/L90Y/F92L/S101D/A117N/Q142L/S193N、S27L/S22K/T25A/L90Y/Q142L/
E173R/N204K/S223A、S27L/P20T/L90Y/T109L/A127S/A174K/V229C、S27L/S22V/L90Y/F92L/
A117Q/R236C/R255L、S27L/V23L/A24G/Y26T/I82F/L90Y/F92G/R108H/T136A/D158L/T160K/
D203V、S27L/A14K/S22K/F92G/A127S/N204K/V229I、S27L/S22V/L90F/F92G/A127S/A174R/
A216P/R236C、S27L/V23L/Y60A/S98T/T109L/A127S/T136V/T160Q/N204K/S223A/R255L、
S27L/S13R/L90Y/S98L/T160V/Q189L/S193P/A216P/S252T/N253S/R255L、S27L/S22R/I82M/
F92L/T109L/A127S/Q142W/Q189L/S223A、S27L/S1G/Y60A/L90F/F92L/N122E/T136A/
N204K/S223A/N231S、S27L/S32K/F92G/S98L/R108Q/S110R/R255L、S27L/L90Y/F92G/
L119M/A127S/A174R/S252T、S27L/L90F/S110R/S181R/N211F、S27L/A14K/S22P/Y60H/
S110R/N122S/D158I/N204K/S223A/R255M、S27L/F92L/S98V/T109L/N122A/E173R/R255L、
S27L/S22R/N87L/F92G/R236C、S27L/S32M/S34R/I82L/F92G/N204K/S223A、S27L/A24V/
T25Q/Y60I/A127S/A174K/N204K/V219I/S223A/S252T/R255M、S27L/S98V/T136A/N211F、
S27L/N9S/L90F/F92L/A127S/N204R/S212M、S27L/S22R/T48S/F92G/R108H/S110R/A127S/
E173R/N204K/S223A/R236Q、S27L/A14K/L90Y/F92G/A127S、S27L/A14K/T48S/F92G/E173R/
N204R/S223A/N231S、S27L/L90Y/T109R/S113N/V219L/I222L、S27L/N9S/T48S/L90Y/
T136A/T206G/S223A、S27L/S22K/T48N/L90F/F92G/N204K/S223A/V229C/N231S、S27L/
S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/N204R/S223A、S27L/S1G/P20T/S32K/S34R/T48S/
N87F/S98A/A127S/T136A、S27L/F21W/S22R/S98E/Q142L/T160V/S223A/S252T/R255L、
S27L/P20T/T48S/F92Y/R108K/S110R/A127S/V219L/S223A/V229I/R236Q、S27L/Y26T/L90Y/
F92L/A127S/V219L/S252T/R255L、S27L/N9S/F21W/T48S/F92L/A127S/D203V/S212F、
S27L/F21W/Y60H/S98E/L119M/D158E/R236Q、S27L/F21W/S22R/L90F/F92L/N122S/Q142W/
R236Q、S27L/F21W/T48S/L90F/F92G/T109K、S27L/L90Y/F92L/T109R/A127S/E173R/
N204K/S223A、S27L/N9S/F21W/T48S/L90Y/F92G/A127S/N204K/V219I/R255M、S27L/N9E/
I82F/L90Y/F92L/S95N/T109L/A127S/A174R/S223A、S27L/L90F/F92L/S98L/N204K/A216P
、S27L/A24V/T48S/A117Q/N211M/S212M/S223A、S27L/L90Y/F92G/T109L/A127S/N204R/
S223A、S27L/N2R/S32Q/N87K/A125S/V219L、S27L/S22P/T48S/L90F/F92L/S193N/V219L/
S223A、S27L/T25Q/L119M/N211M/R236Q、S27L/L90Y/F92G/N122S/A127S/E173R/A216P/
R236Q、S27L/P20T/S32K/L90F/F92G/N122E/D158E/T160S/Q189L/S223A/S252T、S27L/N9S/
F21W/T48S/N87H/L90F/F92L/S113N/V229C、S27L/T25Q/I82L/L90F/F92G/S98L/S113R/
A114V/T136A/S181R、S27L/P20T/R108Q/S110R/D203V/N211I、S27L/S1G/N2R/P20T/Y26T/

S32M/T48S/L90Y/F92L/A127S/N204R/V219L、S27L/A14K/P20T/T48N/L90F/F92G/A117Q/A127S、S27L/N9S/T48N/L90Y/F92L/S98M/T109K/A127S/N204R/N211I/S212L/V219I、S27L/F21W/S22R/T48S/L90F/F92L/R108Q/A174K/N204K/S212F/S223A、S27L/S22R/Y60H/S98T/T136V/S193K/R236Q、S27L/S22K/Y26K/N87Y/L90Y/F92G/T109R/A127S/S252T/R255L、S27L/L90F/F92L/T109L、S27L/F21W/F92L/N204K/S252T/R255L、S27L/V23L/L90Y/F92G/A127S/S193K/N204R/V219I/R236C/R255L、S27L/F21W/L90Y/F92G/A114V/N122S/A127S/N204K/S223A/S252T、S27L/P20T/Y60A/T109L/Q189L/S212L、S27L/S22V/T48S/L90Y/F92G/N204K、S27L/S22V/S32K/T48S/I82F/F92G/A127S/N204K/S223A、S27L/A55L、S27L/A97V、S27L/F250L、S27L/T109G、S27L/G38D、S27L/A97S、S27L/A55V/A216T、S27L/P20D、S27L/A55V、S27L/T109Y、S27L/V165I、S27L/A184G、S27L/A97E、S27L/A184S、S27L/A97F、S27L/A97T、S27L/K197Y、S27L/A55I、S27L/A97P、S27L/A55M、S27L/P20E、S27L/A117L、S27L/T109L、S27L/K197T、S27L/T136S、S27L/A97L、S27L/T109A、S27L/P20I、S27L/L191V、S27L/A184C、S27L/A97Q、S27L/F250V、S27L/K197V、S27L/A117S、S27L/K197R、S27L/T109K、S27L/A55C、S27L/N2S/V177A、S27L/Q142D、S27L/G149C、S27L/F21Y、S27L/G149A、S27L/P164E、S27L/Y26C、S27L/T17N、S27L/S57M、S27L/D249I、S27L/T17S、S27L/P164T、S27L/Q142L、S27L/D249N、S27L/I185R、S27L/V83L、S27L/G149S、S27L/A24D、S27L/R251V、S27L/V83I、S27L/S110N、S27L/T17M、S27L/F161W、S27L/G46E、S27L/D249T、S27L/T17I、S27L/S57C、S27L/S57T、S27L/S57L、S27L/Q167T、S27L/S57E、S27L/T17K、S27L/G149N、S27L/Q142E、S27L/S57F、S27L/T17A、S27L/P164H、S27L/T17R、S27L/G149T、S27L/R251T、S27L/S101Y、S27L/S57V、S27L/A24T、S27L/I185E、S27L/G46N、S27L/P164N、S27L/P164S、S27L/Q167V、S27L/F161V、S27L/S57I、S27L/G149D、S27L/Q167I、S27L/I185Q、S27L/N2L/T17I/T136S/P164H/D249M、S27L/P20E/F21Y/I139T/P164H/K197T/R251E、S27L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/A24V/S101Q/T109R/A117Q/I222L/V229I、S27L/S110D/A184S/K197T、S27L/T136S/D249T、S27L/F21Y/A184S、S27L/N2F/P20E/S110D/A184S/L191V/R251V、S27L/T17G/V23T/A24V/T109L/A117Q/T136A/I222L/V229I、S27L/P20D/F21Y/A55T/F250L/R251V、S27L/T109R/A117N/I222L/V229C、S27L/F21Y/A55T/T109A/A184S、S27L/V23L/A24V/S101K/A117N/I222L/V229C、S27L/S110K/A117Y/P164R、S27L/I139T/Q142E/I169V、S27L/A24H/R251V、S27L/F21W/A114V/T136A/I222L/V229I、S27L/N2S/A55V/I185Q/R251E、S27L/N2F/S101Y/Q142L/G149T/Q167I/I169C/V229L、S27L/N2F/S101C/A117F/P164S、S27L/Q142H/I185S/R251A、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/G46R/T109K/T136S/D249T、S27L/N2E/G46N/A55V/I185Y/D249I、S27L/V83L/F250V/R251E、S27L/F21W、S27L/S57C/R251E、S27L/V23L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/A24N、S27L/T17A/P20T/S101Q/T109K/S110R/T136A/I222L/V229C、S27L/P164T/V165I/R251E、S27L/F21Y/G46E/A117T/T136S/G149C/R251Q、S27L/G46N/I139T/Q142E/P164T/I185A/V229L/F250V、S27L/V23L/T136A/I222L/V229I、S27L/V23T/A24V/T109K/A114K/A117Q/T136A/I222L/V229C、S27L/F250L/R251Q、S27L/P20E/F21Y/S57T/P164N/A184C/V229C、S27L/P20T/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/V83L/A97S/A184C/D249S、S27L/P20T/S101H/A114V/A117N/I222L/V229I、S27L/N2E/R251L、S27L/P20E/F21Y/S110D/A117S、S27L/T17A/V23T/A24V/T136A、S27L/P20D/S57E/S101C、S27L/N2S/V83L/A184S、S27L/

T17S/S101N/T109K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20D/A55T/A117Y/K197R、S27L/P20T/I222L/V229C、S27L/T17I/A24D/S57I、S27L/N2F、S27L/T109K/A117N/T136V/I222L/V229C、S27L/N2L/A24T、S27L/N2F/P20I/F21Y/R251Q、S27L/N2F/G46E、S27L/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/K197R/R251E、S27L/T17S/R251T、S27L/P20I/F21Y/A117F/I185G/D249N、S27L/T17L/S101M/T109K/S110R/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229C、S27L/V229I、S27L/T17A/F21W/S101Q/I222L/V229C、S27L/T17S/F21W/Q142L、S27L/T17L/T109L/S110R/A117Q/I222L/V229I、S27L/F21W/T136A、S27L/P20E/F21Y/G46E/V83L/A97Q、S27L/P20T/F21W/T136A/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17G/F21W/A117N/I222L/V229I、S27L/F21W/T109K/S110R/T136A/V229I、S27L/T17C/T109K/A117N/T136A/I222L/V229I、S27L/P20T/T109L/S110R/A117N/I222L/V229I、S27L/A24N/P164S/K197V/R251T、S27L/V23L/A117Q、S27L/A55V/V83L/A117T、S27L/P20D/G46S/A55I/K197T、S27L/A117Y、S27L/F21W/S101M/I222L/V229C、S27L/N2L/T17N/S57C/S110D/A117L/P164N/I185G/V229L/R251T、S27L/N2E/G46S/V83L/T136S/A172T/V229C/D249N、S27L/P20T/T109R/A114K/A117Q/T136V/I222L/V229C、S27L/V23L/A24V/T136A/Q142W/I222L/V229I、S27L/N2L、S27L/T17A/F21W/T109R/S110R/I222L/V229I、S27L/T17C/A114K/A117N/T136V/I222L/V229I、S27L/V23L/I222L/V229C、S27L/S101N/A117Q/I222L、S27L/N2E/P20I/T109L/L191V/K197L/V229C、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2L/G46E/T109K/F161V、S27L/T17S/V229I、S27L/T17Q/T136A/I222L/V229I、S27L/N2L/A172T、S27L/P20D/F21Y/F250V、S27L/N2L/A24H/A55C/V229L、S27L/N2L/P20E/F21Y/V229L、S27L/V23T/T109L/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20T/F21W/I222L/V229C、S27L/T17H/F21W/T136V/Q142W/I222L/V229I、S27L/G46E/A55I/Q142E、S27L/N2F/R251Q、S27L/F21W/Q142L/I222L/V229C、S27L/I222L/V229I、S27L/P20T/S101M/A114V/A117N/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/A24V/S101W/T136A、S27L/N2S/P20D/A97C/A117F/F250L/R251E、S27L/S101M/A114V/A117Q/T136A、S27L/T163I、S27L/S101Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229C、S27L/S101M/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/A24V、S27L/A24D/K197L、S27L/T17H/S110K、S27L/P20T/F21W/V229I、S27L/T17G/P20T/F21W/A117Q/I222L/V229C、S27L/F21W/A24V/A114V/A117Q/Q142W/I222L/V229C、S27L/P20T/A117Q/I222L/V229C、S27L/T17Q/V23T/A24V/I222L/V229I、S27L/N2F/D249N/F250L、S27L/V23T/Q142L/I222L/V229C、S27L/P20E/A24D/D249S/F250V、S27L/A24D/S110K、S27L/T109R/I222L/V229I、S27L/P20E/F21Y/K197T、S27L/T17A/V23L/S101M/T109K/S110R/A114V/A117Q/T136V/V229I、S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229I、S27L/F21W/I222L/V229I、S27L/P20T/V23T/A24V/T109L/S110R/I222L/V229I、S27L/A24D/L191F/R251Q、S27L/A24D/T136S/F250V、S27L/P20T/F21W/T109L/T136A/Q142W/I222L/V229C、S27L/N2E/I169L/F250L/R251Q、S27L/N2S/A24N/G46E/A55L/Q142D/V229C/R251L、S27L/N2E/P20E/F250V/R251L、S27L/N2F/P20E、S27L/A24V/V229C、S27L/P20D/F21Y/G46N/S110K/T163I/Q167V、S27L/P20T/T109K/A114K/Q142W/I222L/V229C、S27L/T17Q/S101D/T136A/I222L/V229I、S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/Q142W/I222L/V229C、S27L/A24D/T109L/K197L、S27L/T17Q/Q142L/I222L/V229I、S27L/T17A/A24V/S101D/S110R/T136A、S27L/P20T/F21W/T109R/A117Q/T136V/Q142L/I222L/V229I、S27L/P20T/F21W/T109K/A117N/I222L/V229C、

S27L/P20T/S101M/I222L/V229I、S27L/N2S/A24D/S101Y/P164E/V165I/I185E、S27L/T17N/A117S/V229L/R251A、S27L/S101W/A114V/T136V/V229C、S27L/P20D/G46N/A55C/S110N/T163I/A184S、S27L/A24H/G46E、S27L/T17H/S101Q/T136V/Q142L/V229C和S27L/V23T/A24V/I222L/V229C。

[0008] 在另一个方面,本公开涉及核酸,其编码前述权利要求中任一项所述的变体Bhr-PETase酶。在另一个方面,本公开涉及表达载体,其包含该核酸。在另一个方面,本公开涉及宿主细胞,其包含该载体。在一些实施方案中,该细胞是细菌、酵母或真菌。

[0009] 在另一个方面,本公开涉及制备变体Bhr-PETase的方法,其包括在其中产生所述变体Bhr-PETase的条件下培养本文所述的宿主细胞,并回收所述变体Bhr-PETase酶。

[0010] 在另一个方面,本公开涉及预处理PET的方法,其包括对PET的机械预处理、热机械预处理和/或化学预处理,然后是对PET的酶促降解。在一些实施方案中,机械预处理包括将PET研磨成颗粒。在一些实施方案中,热机械预处理包括在配置为使PET无定形化并降低PET结晶度的温度下挤压PET。在一些实施方案中,化学预处理包括使PET与配置为降低PET结晶度或改变PET表面结构的离子液体、强酸、碱或溶剂接触。

[0011] 在另一个方面,本公开涉及降解PET的方法,其包括使PET与本文所述的变体Bhr-PETase酶接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括根据本文所述的方法来预处理PET。在一些实施方案中,该方法降解混合塑料组合物中的PET。在一些实施方案中,塑料组合物包含生物或化学衍生的PET类似物、类PET或PET替代物。在一些实施方案中,塑料组合物包含选自下组中的至少一种:聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚碳酸酯(PC)、聚己内酯(PCL)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)和高密度聚乙烯(HDPE)。在一些实施方案中,该方法不包括对塑料进行分选以从塑料混合物中选择出PET。

[0012] 附图简述

[0013] 图1描绘了示例性野生型Bhr-PETase(本文也称为G1P Bhr-PETase;SEQ ID NO:1)的序列。

[0014] 图2A-2I描绘了示例性野生型Bhr-PETase(SEQ ID NO:1)、野生型Lcc-PETase(SEQ ID NO:4)、野生类型Is-PETase(SEQ ID NO:6)和Bhr-PETase的20个示例性同源物的序列比对。图还按出现顺序分别公开了SEQ ID NO:8-34。

[0015] 图3描绘了示例性野生型Bhr-PETase(SEQ ID NO:1)、野生型Lcc-PETase(SEQ ID NO:4)、野生类型Is-PETase(SEQ ID NO:6)和Bhr-PETase的20个示例性同源物相对于野生型Bhr-PETase的%序列同一性。

[0016] 图4描绘了三种野生型酶Lcc-PETase、Bhr-PETase和Is-PETase之间的热稳定性的比较。

[0017] 图5描绘了Bhr-PETase和Lcc-PETase在65°C(图5图A)和72°C(图5图B)下对于无定形(amorphous)PET的比较。

[0018] 图6描绘了Bhr-PETase和Lcc-PETase在65°C(图6图A)和72°C(图6图B)下对于>40%结晶(crystalline)PET的比较。

[0019] 图7A-D显示了相对于Bhr-PPETase G1P(野生型Bhr-PETase)具有改善的总活性和热稳定性的Bhr-PETase G1变体。与Bhr-PETase G1P相比,具有氨基酸取代S27L的Bhr-PETase G1变体展示出1.80倍改善的总活性以及3.36倍改善的热稳定性,并且因此将其选

择为Bhr-PETase G2P。

[0020] 图8A-B显示了相对于Bhr-PPETase G1P(野生型Bhr-PET酶)具有改善的热稳定性的Bhr-PETase G1变体。

[0021] 图9A-AA显示了相对于Bhr-PPETase G1P(野生型Bhr-PET酶)具有改善的总活性的Bhr-PETase G1变体。图9J-AA显示了相对于Bhr-PETase G2P(具有氨基酸取代S27L的Bhr-PETase G1P)具有改善的总活性的Bhr-PETase G2变体。

[0022] 图10A-B按位置展示了Bhr-PETase的特定变体,其证明了如图7A-D、图8A-B和图9A-AA中所展示的在总活性和/或热稳定性中的有益特性。

[0023] 图11A-B描绘了Bhr-PETase、Lcc-PETase和Is-PETase的野生型序列,以及用于在细菌、酵母和真菌中进行表达的出发(starting)核酸和密码子优化的序列。

[0024] 发明详述

[0025] A. 引言

[0026] 本发明涉及将水解聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的酶。PET是由两种单体(改性乙二醇和纯化对苯二甲酸)的组合产生的聚酯聚合物。虽然塑料诸如PET在现代社会中发现了成千上万的用途,但PET基本上是不可降解的。因此,塑料污染已经污染了整个地球,这给地球和人健康引起许多重大的问题。PET可以回收;然而,这仍然不能阻止大量的PET被丢弃到垃圾填埋场和/或海洋中。

[0027] 包括PET的塑料对酶促降解具有引人注目的抗性。有两类的PET水解酶:(i) PET修饰酶,其将降解限制于仅在PET的表面,而通过电子显微镜观察没有可见的变化;以及(ii) PET降解酶或PETase,其可以显著降解PET的内部块(例如,降解至少10%),通过电子显微镜观察具有可见的变化。迄今,已经报道了大量的PET修饰酶,但它们可能不显著降解PET本体,并且可能不适用于PET的生物回收。如本领域已知的,有几种酶类型显示出降解PET的内部块的有限能力。第一个报道的能够作用于PET聚合物的酯键的酶是2005年的来自褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的角质酶。后续的工作鉴定出额外的酶,包括2016年的来自坂氏艾德奥菌(*Ideonella sakaiensis*)的PET水解酶Is-PETase和2012年的叶枝堆肥角质酶(Lcc-PETase)。虽然这些PETase在环境温度下显示出活性,但这些酶不是特别热稳定,并且不显示出稳健的PET降解。

[0028] PET作为无定形材料和半结晶(semi-crystalline)材料两者存在。链流动性在PET的玻璃化转变温度Tg附近(在70°C左右)的无定形相中可以增加,这允许更好地接近酯键,并因此加快降解。可以控制Tg附近的反应温度以实现高效的酶促PET降解。另外,PET在70°C左右的物理老化过程可以将流动的无定形部分转变为阻碍PET的进一步酶促水解的顽固的微观结构。因此,期望热稳定且热活性的PETase,以允许降解反应在玻璃化转变温度附近发生并克服竞争性物理老化过程。

[0029] 如图4、5和6所示,虽然野生型Bhr-PETase是Lcc-PETase的密切同源物,两种酶之间共享94%序列同一性,但是发现它比Lcc-PETase以及Is-PETase更加热稳定并且热活性。热稳定性和热活性是高效PET降解的关键因素。本公开涉及来自细菌HR29的PETase(Bhr-PETase)的变体,其已经被工程化以展示出甚至更高的活性和热稳定性。Bhr-PETase变体突出的热稳定性和高PET水解热活性使得其在进一步分析和工业应用中具有巨大潜力。

[0030] B. 定义

[0031] 本文所谓“修饰”意指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失或对与蛋白质化学连接的部分的改变。例如,修饰可以是附接至蛋白质的改变的碳水化合物或PEG结构。本文所谓“氨基酸修饰”意指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。为了清楚起见,除非另有说明,氨基酸修饰总是针对通过DNA编码的氨基酸,例如在DNA和RNA中具有密码子的20种氨基酸。

[0032] 本文所谓“氨基酸取代”或“取代”意指用不同的氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸。具体地,在一些实施方案中,取代是针对在特定位置处非天然存在的(不天然存在于生物体之内或者在任何生物体中的)氨基酸。例如,取代S27L指变体多肽,在这种情况下是PETase,其中位置27处的丝氨酸(S)用亮氨酸L替换。为了清楚起见,已经被工程化以改变核酸编码序列但不改变出发氨基酸(例如将CGG(编码精氨酸)更换为CGA(仍编码精氨酸)以增加宿主生物体表达水平)的蛋白质不是“氨基酸取代”;也就是说,尽管创建了编码相同蛋白质的新基因,但如果该蛋白质在其用以起始的特定位置具有相同的氨基酸,则它不是氨基酸取代。

[0033] 如本文所用,所谓“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列中的特定位置处添加氨基酸序列。例如,-233E或233E指定在位置233之后和位置234之前插入谷氨酸。另外,-233ADE或A233ADE指定在位置233之后和位置234之前插入AlaAspGlu。

[0034] 如本文所用,所谓“氨基酸缺失”或“缺失”意指除去亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸序列。例如,F250-或F250#,F250()或F250del指定除去位置250处的谷氨酸。此外,FRS250-或FRS250#指定缺失于位置250开始的序列PheArgSer。

[0035] 如本文所用,所谓“亲本多肽”意指后续经修饰以生成变体的出发多肽。亲本多肽可以是天然存在的多肽,或天然存在的多肽的变体或工程化版本。亲本多肽可以指多肽本身、包含亲本多肽的组合物或编码其的氨基酸序列。在本案中,一些实施方案利用示例性野生型Bhr-PETase(也称为G1P Bhr-PETase;SEQ ID NO:1;图1中所示的序列)作为亲本多肽。

[0036] 如本文所用,所谓“变体蛋白质”或“蛋白质变体”或“变体”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本蛋白质的蛋白质。蛋白质变体可以指蛋白质本身、包含蛋白质的组合物或编码其的氨基酸序列。优选地,与亲本蛋白质相比,蛋白质变体具有至少一个氨基酸修饰,例如与亲本蛋白质相比约1个至约70个氨基酸修饰,并且优选约1至约5个氨基酸修饰。如下所述,在一些实施方案中,亲本多肽是野生型序列,例如本文中指定为“G1P”的示例性野生型Bhr-PETase。如下文进一步讨论的,本文的蛋白质变体序列将优选与亲本蛋白质序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、与96%、97%、98%、99%或100%同一性,优选至少约90%同一性,并且优选至少约95%-98%-99%同一性。变体蛋白质可以指变体蛋白质本身、包含蛋白质变体的组合物或编码其的DNA序列。因此,本文所谓“变体PETase”意指与亲本PETase酶相比,在氨基酸序列中具有至少一个氨基酸修饰的新型PETase。除非另有说明或将是上下文显而易见的,本发明的变体PETase通常与野生型G1P序列进行比较。另外,除非另有说明,本发明的变体PETase是酶促活性的,即,存在使用实施例9中描述的PETase测定法可检测的PETase活性。

[0037] 如本文所用,“蛋白质”在本文中意指至少两个共价附接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。肽基基团通常包含天然存在的氨基酸和肽键。此外,多肽可以包括一个或

多个侧链或末端的合成衍生化、糖基化、PEG化、环状排列、环化、与其他分子的接头、与蛋白质或蛋白质域的融合以及添加肽标签或标记。

[0038] 如本文所用,所谓“残基”意指蛋白质中的位置及其相关联的氨基酸身份。例如,丝氨酸27(也称为Ser27或S27)是G1P亲本酶中位置27处的残基。

[0039] 如本文所用,所谓“非天然存在的修饰”意指在自然界的亲本(例如G1P)酶中未发现的氨基酸修饰。

[0040] 如本文所用,所谓“氨基酸”和“氨基酸同一性”意指由DNA和RNA编码的20种天然存在的氨基酸之一。

[0041] 如本文所用,所谓“位置”意指蛋白质的序列中的位置。一般而言,位置编号(其在下面更全面地进行讨论)相对于成熟PETase序列的第一个氨基酸,例如不包括信号肽。

[0042] 本文所谓“PETase”意指具有PETase活性的蛋白质。本文所谓“PETase活性”意指在不存在MHT酶的条件下,酶催化PET水解为单(羟乙基)对苯二甲酸酯(MHET)作为主要产物。在MHTase的存在下(其是实施例9的情况中),MHTase将进一步将MHET转变为对苯二甲酸(TPA)和乙二醇(EG)作为酶促反应的主要产物。在下面概述的测定和实施例9中具有可检测的PETase活性的酶在本文中被视为PETase。PETase活性可以测量为如本文所述的PETase总活性和/或PETase热稳定性。

[0043] 本文涉及两个序列的所谓“同一性”意指考虑到比对,相同的氨基酸位于相同的位置。本发明的氨基酸序列(“发明序列”)与权利要求中所涉及亲本氨基酸序列(例如对于G1P,SEQ ID NO:1)之间的同一性的程度计算为两个序列的比对中完全匹配的数量,除以“发明序列”的长度或SEQ ID NO:1的长度,以最短者为准。结果以如下计算的同一性百分比表示。

[0044] 出于本发明的目的,使用SEQ ID NO:1中公开的成熟多肽来确定本发明的另一种PETase中的相应氨基酸残基。将另一种PETase的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中公开的成熟多肽进行比对,并且基于该比对,使用如EMBOSS包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277)(优选5.0.0或更晚版本)的Needle程序中所实施的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)确定SEQ ID NO:1中公开的成熟多肽中对应于任何氨基酸残基的氨基酸位置号。所用的参数是空位开放罚分为10、空位延伸罚分为0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。

[0045] 另一种PETase中相应氨基酸残基的鉴定可以通过使用多种计算机程序比对多个多肽序列来确定,这些计算机程序包括但不限于使用各自的默认参数的MUSCLE(multiple sequence comparison by log-expectation;version 3.5or later;Edgar,2004,Nucleic Acids Research 32:1792-1797)、MAFFT(6.857或更晚版本;Katoh和Kuma,2002,Nucleic Acids Research 30:3059-3066;Katoh等人,2005,Nucleic Acids Research 33:511-518;Katoh和Toh,2007,Bioinformatics 23:372-374;Katoh等人,2009,Methods in Molecular Biology 537:39-64;Katoh和Toh,2010,Bioinformatics 26:1899-1900)、采用ClustalW的EMBOSS EMMA(1.83或更晚;Thompson等人,1994,Nucleic Acids Research22:4673-4680),以及采用Clustal Omega的EMBL-EBI(Sievers和Higgins,2014,Methods Mol Biol.2014;1079:105-16)。

[0046] 当另一种酶已经与SEQ ID NO:1的多肽分离,使得传统的基于序列的比较无法检测它们的关系(Lindahlhe Elofsson,2000,J.Mol.Biol.295:613-615)时,可以使用其他成对序列比较算法。使用利用多肽家族(概况)的概率表示来搜索数据库的搜索程序,可以在基于序列的搜索中获得更高的灵敏度。例如,PSI-BLAST程序通过迭代数据库搜索过程生成概况,并且其能够检测远程同源物(Atschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402)。如果多肽的家族或超家族在蛋白质结构数据库中具有一个或多个代表,那么甚至可以实现更高的灵敏度。诸如GenTHREADER(Jones,1999,J.Mol.Biol.287:797-815;McGuffin和Jones,2003,Bioinformatics 19:874-881)的程序利用来自各种来源(PSI-BLAST、二级结构预测、结构比对概况和溶剂化电位)的信息作为神经网络的输入,该神经网络预测查询序列的结构折叠。相似地,Gough等人,2000,J.Mol.Biol.313:903-919的方法可以用于比对未知结构的序列与SCOP数据库中存在的超家族模型。这些比对反过来可以用于生成多肽的同源模型,并且可以使用出于此目的开发的各种工具来评估此类模型的准确性。

[0047] 对于已知结构的蛋白质,多种工具和资源可用于检索和生成结构比对。例如,SCOP蛋白质超家族已在结构上进行比对,并且这些比对是可访问并且可下载的。两个或多个蛋白质结构可以使用多种算法诸如距离比对矩阵(Holm和Sander,1998,Proteins 33:88-96)或组合延伸(Shindyalov和Bourne,1998,Protein Engineering 11:739-747)进行比对,并且这些算法的实施可以额外地用于查询具有感兴趣结构的结构数据库,以便发现可能的结构同源物(例如,Holm和Park,2000,Bioinformatics 16:566-567)。

[0048] 在描述本发明的变体时,为了便于引用,适用下述的命名法。采用标准接受的IUPAC单字母或三字母氨基酸缩写。

[0049] 对于氨基酸取代,本文使用以下命名法:原始氨基酸、位置、取代的氨基酸。因此,将用亮氨酸对位置27处的丝氨酸的取代指定为“Ser27Leu”或“S27L”。多个突变由正斜杠标志(“/”)分隔,例如“A102V/T136M”,分别代表位置102和136处的取代。

[0050]	缩写	1 字母	氨基酸名称	缩写	1 字母	氨基酸名称
	Ala	A	丙氨酸	Leu	L	亮氨酸
	Arg	R	精氨酸	Lys	K	赖氨酸
	Asn	N	天冬酰胺	Met	M	甲硫氨酸
	Asp	D	天冬氨酸	Phe	F	苯丙氨酸
	Cys	C	半胱氨酸	Pro	P	脯氨酸
	Gln	Q	谷氨酰胺	Ser	S	丝氨酸
[0051]	Glu	E	谷氨酸	Thr	T	苏氨酸
	Gly	G	甘氨酸	Trp	W	色氨酸
	His	H	组氨酸	Tyr	Y	酪氨酸
	Ile	I	异亮氨酸	Val	V	缬氨酸

[0052] 在本文PETase的情况下,所谓“分离的”意指多肽没有其他蛋白质的。在特定的实施方案中,本发明的PETase是分离的。如本文所用,术语“分离的”指如通过SDS-PAGE所测定的至少20%纯、优选至少40%纯、更优选至少60%纯、甚至更优选至少80%纯、最优选至少

90%纯甚至最优选至少95%至98%纯的多肽。特别地,优选多肽为“基本上纯的形式”,即多肽制剂基本上不含与其天然相关联的其他多肽材料。这可以通过例如凭借公知的重组方法或经典的纯化方法制备多肽来实现。

[0053] 本文所谓“重组酶”意指通过重组技术产生的酶并且编码本发明的酶的核酸可操作地连接至至少一个外源(例如相对于亲本PETase而言不是天然的)序列,包括例如,启动子、终止子、信号序列等,如下文更完整地概述的。

[0054] 术语“核酸构建体”指单链或者双链的核酸分子,其分离自天然存在的基因,或其以除此以外自然界中不存在的方式进行修饰以含有核酸区段,或是合成的,并且其包含一个或多个控制序列。

[0055] 术语“可操作地连接”指其中控制序列放置于相对于多核苷酸的编码序列适当的位置处使得控制序列指导编码序列的表达的配置。

[0056] 如本文所用,术语“约”意指修饰,例如核苷酸序列的长度、误差的程度、尺寸、组合物中成分的量、浓度、体积、过程温度、过程时间、产率、流速、压力和类似值及其范围,意指可以通过以下发生的数值量中的变化:例如,通过用于制备化合物、组合物、浓缩物或用途配制剂的典型测量和处理规程;通过这些规程中的无意的误差;通过用于执行这些方法的起始物料或成分的制备、来源或纯度中的差异;和类似的考虑。术语“约”还涵盖由于例如具有特定初始浓度或混合物的组合物、配制剂或细胞培养物的老化而不同的量,以及由于混合或处理具有特定初始浓度或混合物的组合物或配制剂而不同的量。无论是否通过术语“约”修饰,本文所附权利要求都包括这些量的等同物。术语“约”进一步可以指与所述参考值相似的值的范围。在某些实施方案中,术语“约”意指落入所述参考值的10%、9%、8.7%、6%、5.4%、3%、2%、1%或更小的范围之内的值。

[0057] C. 本发明的PETase

[0058] 因此,本发明提供了具有改善的酶促活性的变体PETase,其可以用于多种应用,最显著地用于降解由PET制成的塑料。

[0059] 一般而言,与如图1中所示的本文野生型Bhr-PETase,“G1P”(即“第1代亲本”)SEQ ID NO:1相比,本发明的变体PETase具有已经修饰的、改善的生物化学特性。与具有氨基酸取代S27L的“G2P”(即“第2代亲本”)相比,本发明的变体PET酶还可以具有已经修饰的、改善的生物化学特性。本文可以改善的变体PETase的生物化学特性包括但不限于热稳定性、热活性、比活性(specific activity)和产量。

[0060] 与G1P或G2P相比,本发明的变体Bhr-PETase具有一种或多种改善的特性。本文所谓“改善的”意指至少一种生物化学特性的期望的变化。“改善的功能”可以测量为特定活性的增加百分比或减少百分比,或测量为随着期望特性(例如活性或热稳定性)的增加的“倍数”变化。也就是说,与G1P或G2P相比,变体Bhr-PETase可以具有热稳定性的10%增加,或PETase活性的10%增加。一般来说,百分比变化用于描述小于100%的生物化学活性的变化,并且倍数变化用于描述大于100%的生物化学活性的变化(与亲本酶(在许多情况下是G1P或G2P)相比)。在本发明中,可以实现至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%和99%的生物化学活性的变化百分比(通常增加)。在本发明中,“倍数增加”(或减少)与出发酶或亲本酶相比来测量。例如,如图9A-AA中所示,与G1P相比,变体T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T具有比活性的1.6倍增加:这通过[(变体

的活性)/(亲本的活性)]来计算。在许多实施方案中,改善是至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。

[0061] 一般而言,在针对G1P或G2P酶攻击变体Bhr-PETase的条件下,使用Bhr-PETase活性测定来测量与G1P或G2P酶相比的改善。

[0062] 1.总活性增加

[0063] 本发明提供了变体Bhr-PETase,其具有等于或大于G1P(SEQ ID NO:1的野生型Bhr-PETase)或G2P(具有氨基酸取代S27L的G1P)的总活性的总活性。如实施例9中所述,本文中的“总活性”可以通过在升高的温度诸如65℃下监测PET解聚反应期间TPA(对苯二甲酸)的产生来确定,使用比色测定或HPLC来定量。总活性的任何改善可以由于变体PETase的热活性、比活性和/或产量的改善。

[0064] 在许多实施方案中,变体Bhr-PETase具有改善的总活性,其至少为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。

[0065] 一般而言,在针对G1P或G2P酶攻击变体Bhr-PETase的条件下,使用Bhr-PETase活性测定来测量与G1P或G2P酶相比的改善。

[0066] (i)热活性增加

[0067] 在一方面,变体Bhr-PETase可以具有增加的热活性。本文的“热活性”可以通过在升高的温度诸如65℃下监测PET解聚反应期间TPA(对苯二甲酸)、MHET(单(羟乙基)对苯二甲酸酯)和BHET(双(2-羟基)对苯二甲酸酯)的产量来确定,其以每mg酶每h生成的当量TPA的mg($\text{mg}_{\text{TPAeq}} \cdot \text{h}^{-1} \text{mg}_{\text{酶}}^{-1}$)来定量。本文的“当量TPA”通过TPA、转变为TPA的MHET、转变为TPA的BHET以及转化为TPA的任何其他可测量的低聚物的总和来计算。因此,与G1P(SEQ ID NO:1的野生型Bhr-PETase)或G2P(具有氨基酸取代S27L的G1P)相比,具有增加的每毫克酶的活性的PETase可以表现出改善的热活性。

[0068] 在许多实施方案中,变体Bhr-PETase具有改善的热活性,其至少为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。

[0069] 一般而言,在针对G1P或G2P酶攻击变体Bhr-PETase的条件下,使用Bhr-PETase活性测定来测量与G1P或G2P酶相比的改善。

[0070] (ii)比活性增加

[0071] 在另一个方面,变体Bhr-PETase可以具有增加的比活性。本文的“比活性”可以通过在Bhr-PETase的任选操作性温度下监测PET解聚反应期间TPA(对苯二甲酸)、MHET(单(羟乙基)对苯二甲酸酯)和BHET(双(2-羟基)对苯二甲酸酯)的产量来确定,其以每mg酶每h生成的当量TPA的mg($\text{mg}_{\text{TPAeq}} \cdot \text{h}^{-1} \text{mg}_{\text{酶}}^{-1}$)来定量。因此,与G1P(SEQ ID NO:1的野生型Bhr-PETase)或G2P(具有氨基酸取代S27L的G1P)相比,具有增加的每毫克酶的活性的PETase可以显示出改善的比活性。

[0072] 在许多实施方案中,变体Bhr-PETase具有改善的比活性,其至少为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有增加的每毫克酶每小时生成的当量TPA,其至少为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4

倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。

[0073] 一般而言,在针对G1P或G2P酶攻击变体Bhr-PETase的条件下测量与G1P或G2P酶相比的改善。

[0074] (iii)产量增加

[0075] 在一方面,变体Bhr-PETase可以具有增加的产量。本文中的“产量”可以通过监测按g/L计的Bhr-PETase的蛋白质滴度来确定。因此,与G1P (SEQ ID NO:1的野生型Bhr-PETase) 或G2P (具有氨基酸取代S27L的G1P) 相比,具有增加的每升酶上清液的量的PETase可以显示出改善的产量。

[0076] 在许多实施方案中,变体Bhr-PETase具有改善的热活性,其至少为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。

[0077] 一般而言,在针对G1P或G2P酶攻击变体Bhr-PETase的条件下,使用Bhr-PETase活性测定来测量与G1P或G2P酶相比的改善。

[0078] 2.热稳定性

[0079] 另外,如本领域技术人员将理解的,可以期望在玻璃化转变温度附近进行PET降解。无定形PET域将提高玻璃化转变温度(约67-72°C)附近的流动性,这使其对于酶促水解来说更加可接近。在高于转变温度的较高温度下,PET底物将随着时间的推移而重结晶,这不利于PET降解。因此,例如,可以认为约65-72°C是PET降解的最佳温度范围。

[0080] 因此,在许多实施方案中,变体Bhr-PETase具有改善的热稳定性。在这个背景中,“热稳定性”意指在相同的热攻击条件下,变体酶比G1P (SEQ ID NO:1的野生型Bhr-PETase) 或G2P (具有氨基酸取代S27L的G1P) 更稳定,即,在相同条件下,变体的活性高于G1P或G2P酶的活性(通常使用本文概述和如实施例9所示的测定)。

[0081] 在一个实施方案中,当暴露于约65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84和/或85°C的温度达一段时间(例如范围为约0.5、1、2、3、4、5或6个小时至约5、6、7、8、9、10个小时或更长时间,这取决于用于变体Bhr-PETase的用途最终条件)时,变体Bhr-PETase比G1P或G2P酶更稳定。在一些实施方案中,当暴露于温度优选约65°C至85°C至少约0.5小时、优选约65°C至72°C至少约1小时,优选至少65°C至少约1小时,优选至少70°C至少约1.5小时时,变体Bhr-PETase比G1P或G2P酶更稳定。

[0082] 因此,在许多实施方案中,变体Bhr-PETase比G1P或G2P酶更热稳定了至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更高。

[0083] 一般而言,在有或没有热处理的情况下测量变体Bhr-PETase或G1P或G2P酶活性的条件下,使用Bhr-PETase活性测定来测量与G1P或G2P酶相比的改善。

[0084] 3.PETase测定

[0085] 存在若干可以用于测定活性的PETase活性测定,如针对基于PET薄膜的测定的实施例6和9以及针对基于BHET的测定的实施例5中所概述的。PETase活性还可以通过pNPB(对硝基苯基丁酸酯)测定来监测。在pNPB测定中,替代底物对硝基苯基丁酸酯可以被PETase水解为对硝基苯酚和丁酸。对硝基苯酚的释放与PETase活性直接相关,并且例如可以在405nm处通过分光光度法确定。

[0086] 4.Bhr-PETase

[0087] 本发明提供了许多具有改善的活性和/或热稳定性的特定变体Bhr-PETase,其用于PET的降解。

[0088] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在选自下组的氨基酸位置(相对于G1P,SEQ ID NO:1)处具有一个或多个氨基酸取代:27、1、2、5、9、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、30、32、33、34、40、46、48、49、53、54、55、56、57、60、62、68、70、72、74、77、82、83、85、87、88、90、92、97、98、101、102、105、108、109、110、113、114、117、119、121、122、125、127、135、136、138、139、140、142、143、145、147、149、150、153、156、157、158、160、161、162、163、164、167、170、173、174、177、179、181、182、184、185、189、190、193、194、195、198、200、203、204、206、208、209、211、212、213、216、217、218、219、221、222、223、225、227、228、229、231、236、237、241、242、243、246、249、250、251、252、253、254、255、258、8、31、38、95、126、137、165、169、172、191、192和197。在一些实施方案中,变型Bhr-PETase在选自相同组的位置(相对于G1P,SEQ ID NO:1)处具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代。

[0089] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在选自下组的氨基酸位置处具有一个或多个氨基酸取代:S27L、S27F、S27H、S27T、S27W、S1A、S1G、S1M、S1R、N2E、N2F、N2L、N2R、N2S、Q5E、N9A、N9E、N9S、R12K、S13L、S13R、A14K、A14S、L15I、T16E、T17A、T17C、T17G、T17H、T17I、T17K、T17L、T17M、T17N、T17Q、T17R、T17S、D18R、P20D、P20E、P20I、P20Q、P20T、F21W、F21Y、S22A、S22I、S22K、S22P、S22R、S22V、V23L、V23T、A24D、A24G、A24H、A24N、A24S、A24T、A24V、T25A、T25F、T25H、T25Q、T25R、T25V、Y26C、Y26K、Y26L、Y26T、R30K、S32K、S32M、S32Q、S32Y、V33G、V33Q、V33T、S34R、V40T、G46E、G46L、G46N、G46R、G46S、T48N、T48S、L49G、G53A、I54V、A55C、A55I、A55L、A55M、A55T、A55V、M56I、M56L、S57C、S57E、S57F、S57I、S57L、S57M、S57T、S57V、Y60A、Y60H、Y60I、A62T、A68F、L70M、R72P、L74W、H77Q、I82F、I82L、I82M、V83I、V83L、V83T、N85D、N87F、N87H、N87I、N87K、N87L、N87M、N87Q、N87R、N87V、N87W、N87Y、S88K、S88T、L90F、L90K、L90Y、F92G、F92I、F92K、F92L、F92N、F92Q、F92V、F92Y、A97C、A97E、A97F、A97G、A97L、A97P、A97Q、A97S、A97T、A97V、S98A、S98D、S98E、S98L、S98M、S98N、S98Q、S98T、S98V、S101A、S101C、S101D、S101F、S101H、S101K、S101L、S101M、S101N、S101Q、S101R、S101V、S101W、S101Y、A102V、N105D、R108C、R108E、R108H、R108K、R108N、R108P、R108Q、R108S、R108T、R108V、T109A、T109F、T109G、T109K、T109L、T109N、T109R、T109Y、S110D、S110G、S110H、S110K、S110N、S110R、S113A、S113K、S113N、S113P、S113Q、S113R、S113T、S113Y、A114K、A114L、A114S、A114V、A117F、A117G、A117L、A117N、A117Q、A117S、A117T、A117Y、L119I、L119M、A121S、N122A、N122E、N122H、N122P、N122R、N122S、A125S、A127M、A127S、A127V、A135G、T136A、T136M、T136S、T136V、R138E、R138L、I139A、I139T、S140A、Q142D、Q142E、Q142H、Q142L、Q142W、I143N、I143R、T145S、K147F、K147G、K147N、K147Q、G149A、G149C、G149D、G149N、G149S、G149T、G149V、V150I、V150L、T153L、H156N、T157A、T157G、D158E、D158I、D158K、D158L、T160K、T160Q、T160R、T160S、T160V、F161V、F161W、N162E、N162H、N162P、N162R、T163I、T163S、P164E、P164H、P164N、P164R、P164S、P164T、Q167I、Q167T、Q167V、V170L、E173R、A174K、A174R、V177A、P179Q、S181A、S181C、S181R、Q182T、A184C、A184G、A184S、I185A、I185E、I185G、I185L、I185Q、I185R、I185S、I185Y、Q189I、Q189L、Q189V、N190S、S193E、S193F、S193H、S193K、S193N、S193P、S193T、S193V、T194G、T194S、

T195F、V198A、V200L、D203N、D203R、D203V、N204A、N204K、N204R、N204S、T206G、T206K、T206L、T206P、T206R、F208G、F208L、F208R、F208T、A209V、N211F、N211I、N211L、N211M、N211V、S212F、S212L、S212M、P213N、P213R、A216L、A216P、A216S、A216T、A216V、I217S、S218A、V219F、V219I、V219K、V219L、V219R、T221S、I222L、S223A、S223C、M225L、L227R、W228F、V229C、V229I、V229L、N231L、N231Q、N231S、R236C、R236E、R236H、R236K、R236Q、Q237R、N241P、V242T、N243P、A246D、A246K、A246S、A246T、D249I、D249M、D249N、D249S、D249T、F250I、F250L、F250V、F250Y、R251A、R251E、R251I、R251K、R251L、R251Q、R251T、R251V、S252T、N253S、N253Y、N254R、R255E、R255G、R255L、R255M、R255S、R255V、R255W、R255Y、Q258P、P8T、L31M、G38D、S95N、V126I、L137M、V165I、I169C、I169L、I169V、A172T、L191F、L191V、P192A、K197L、K197R、K197T、K197V和K197Y。在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有选自相同组的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸取代。

[0090] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置27处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应(steric effect))。在一些实施方案中,氨基酸取代是S27L。在一些实施方案中,氨基酸取代是S27F。在一些实施方案中,氨基酸取代是S27H。在一些实施方案中,氨基酸取代是S27T。在一些实施方案中,氨基酸取代是S27W。

[0091] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置1处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S1A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S1G。在一些实施方案中,氨基酸取代是S1M。在一些实施方案中,氨基酸取代是S1R。

[0092] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置2处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N2E。在一些实施方案中,氨基酸取代是N2F。在一些实施方案中,氨基酸取代是N2L。在一些实施方案中,氨基酸取代是N2R。在一些实施方案中,氨基酸取代是N2S。

[0093] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置5处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在

一些实施方案中,氨基酸取代是Q5E。

[0094] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置9处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N9A。在一些实施方案中,氨基酸取代是N9E。在一些实施方案中,氨基酸取代是N9S。

[0095] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置12处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R12K。

[0096] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置13处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S13L。在一些实施方案中,氨基酸取代是S13R。

[0097] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置14处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A14K。在一些实施方案中,氨基酸取代是A14S。

[0098] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置15处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L15I。

[0099] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置16处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T16E。

[0100] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置17处的苏氨酸的氨

氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17A。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17C。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17G。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17H。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17I。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17K。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17L。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17M。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17N。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17R。在一些实施方案中,氨基酸取代是T17S。

[0101] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置18处的天冬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是D18R。

[0102] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置20处的脯氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是P20D。在一些实施方案中,氨基酸取代是P20E。在一些实施方案中,氨基酸取代是P20I。在一些实施方案中,氨基酸取代是P20Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是P20T。

[0103] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置21处的苯丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是F21W。在一些实施方案中,氨基酸取代是F21Y。

[0104] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置22处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S22A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S22I。在一些实施方案中,氨基酸取代是S22K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S22P。在一些实施方案中,氨基酸取代是S22R。在一些实施方案中,氨基酸取代是S22V。

[0105] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置23处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、

甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V23L。在一些实施方案中,氨基酸取代是V23T。

[0106] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置24处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24D。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24G。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24H。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24N。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24T。在一些实施方案中,氨基酸取代是A24V。

[0107] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置25处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T25A。在一些实施方案中,氨基酸取代是T25F。在一些实施方案中,氨基酸取代是T25H。在一些实施方案中,氨基酸取代是T25Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是T25R。在一些实施方案中,氨基酸取代是T25V。

[0108] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置26处具有酪氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y26C。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y26K。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y26L。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y26T。

[0109] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置30处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R30K。

[0110] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置32处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S32K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S32M。在一些实施方案中,氨基酸取代是S32Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是S32Y。

[0111] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置33处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V33G。在一些实施方案中,氨基酸取代是V33Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是V33T。

[0112] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置34处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S34R。

[0113] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置40处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V40T。

[0114] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置46处的甘氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是G46E。在一些实施方案中,氨基酸取代是G46L。在一些实施方案中,氨基酸取代是G46N。在一些实施方案中,氨基酸取代是G46R。在一些实施方案中,氨基酸取代是G46S。

[0115] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置48处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T48N。在一些实施方案中,氨基酸取代是T48S。

[0116] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置49处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L49G。

[0117] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置53处的甘氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是G53A。

[0118] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置54处具有异亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I54V。

[0119] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置55处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A55C。在一些实施方案中,氨基酸取代是A55I。在一些实施方案中,氨基酸取代是A55L。在一些实施方案中,氨基酸取代是A55M。在一些实施方案中,氨基酸取代是A55T。在一些实施方案中,氨基酸取代是A55V。

[0120] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置56处具有甲硫氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是M56I。在一些实施方案中,氨基酸取代是M56L。

[0121] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置57处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57C。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57E。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57F。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57I。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57L。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57M。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57T。在一些实施方案中,氨基酸取代是S57V。

[0122] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置60处具有酪氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸,其中一

些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y60A。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y60H。在一些实施方案中,氨基酸取代是Y60I。

[0123] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置62处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A62T。

[0124] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置68处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A68F。

[0125] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置70处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L70M。

[0126] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置72处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R72P。

[0127] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置74处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L74W。

[0128] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置77处的组氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是H77Q。

[0129] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置82处具有异亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I82F。在一些实施方案中,氨基酸取代是I82L。在一些实施方案中,氨基酸取代是I82M。

[0130] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置83处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V83I。在一些实施方案中,氨基酸取代是V83L。在一些实施方案中,氨基酸取代是V83T。

[0131] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置85处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N85D。

[0132] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置87处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87F。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87H。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87I。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87K。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87L。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87M。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87R。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87V。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87W。在一些实施方案中,氨基酸取代是N87Y。

[0133] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置88处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S88K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S88T。

[0134] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置90处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、

甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L90F。在一些实施方案中,氨基酸取代是L90K。在一些实施方案中,氨基酸取代是L90Y。

[0135] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置92处的苯丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92G。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92I。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92K。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92L。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92N。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92V。在一些实施方案中,氨基酸取代是F92Y。

[0136] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置97处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97C。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97E。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97F。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97G。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97L。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97P。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97T。在一些实施方案中,氨基酸取代是A97V。

[0137] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置98处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98D。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98E。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98L。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98M。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98N。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98T。在一些实施方案中,氨基酸取代是S98V。

[0138] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置101处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101C。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101D。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101F。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101H。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101L。在一些实施方案中,氨基酸

取代是S101M。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101N。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101R。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101V。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101W。在一些实施方案中,氨基酸取代是S101Y。

[0139] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置102处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A102V。

[0140] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置105处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N105D。

[0141] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置108处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108C。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108E。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108H。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108K。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108N。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108P。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108S。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108T。在一些实施方案中,氨基酸取代是R108V。

[0142] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置109处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109A。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109F。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109G。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109K。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109L。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109N。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109R。在一些实施方案中,氨基酸取代是T109Y。

[0143] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置110处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S110D。在一些实施方案中,氨基酸取代是S110G。在一些实施方案

中,氨基酸取代是S110H。在一些实施方案中,氨基酸取代是S110K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S110N。在一些实施方案中,氨基酸取代是S110R。

[0144] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置113处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113N。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113P。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113R、S113T。在一些实施方案中,氨基酸取代是S113Y。

[0145] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置114处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A114K。在一些实施方案中,氨基酸取代是A114L。在一些实施方案中,氨基酸取代是A114S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A114V。

[0146] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置117处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117F。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117G。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117L。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117N。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117T。在一些实施方案中,氨基酸取代是A117Y。

[0147] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置119处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L119I。在一些实施方案中,氨基酸取代是L119M。

[0148] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置121处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A121S。

[0149] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置122处的天冬酰胺的

氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N122A。在一些实施方案中,氨基酸取代是N122E。在一些实施方案中,氨基酸取代是N122H。在一些实施方案中,氨基酸取代是N122P。在一些实施方案中,氨基酸取代是N122R。在一些实施方案中,氨基酸取代是N122S。

[0150] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置125处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A125S。

[0151] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置127处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A127M。在一些实施方案中,氨基酸取代是A127S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A127V。

[0152] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置135处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A135G。

[0153] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置136处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T136A。在一些实施方案中,氨基酸取代是T136M。在一些实施方案中,氨基酸取代是T136S。在一些实施方案中,氨基酸取代是T136V。

[0154] 在一些实施方案中,变体Bhr-PEase具有SEQ ID NO:1的位置138处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R138E。在一些实施方案中,氨基酸取代是R138L。

[0155] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置139处具有异亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I139A。在一些实施方案中,氨基酸取代是I139T。

[0156] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置140处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S140A。

[0157] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置142处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q142D。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q142E。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q142H。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q142L。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q142W。

[0158] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置143处具有异亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I143N。在一些实施方案中,氨基酸取代是I143R。

[0159] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置145处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T145S。

[0160] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置147处具有赖氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是K147F。在一些实施方案中,氨基酸取代是K147G。在一些实施方案中,氨基酸取代是K147N。在一些实施方案中,氨基酸取代是K147Q。

[0161] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置149处的甘氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149A。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149C。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149D。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149N。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149S。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149T。在一些实施方案中,氨基酸取代是G149V。

[0162] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置150处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V150I。在一些实施方案中,氨基酸取代是V150L。

[0163] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置153处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T153L。

[0164] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置156处的组氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是H156N。

[0165] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置157处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T157A。在一些实施方案中,氨基酸取代是T157G。

[0166] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置158处的天冬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是D158E。在一些实施方案中,氨基酸取代是D158I。在一些实施方案中,氨基酸取代是D158K。在一些实施方案中,氨基酸取代是D158L。

[0167] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置160处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T160K。在一些实施方案中,氨基酸取代是T160Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是T160R。在一些实施方案中,氨基酸取代是T160S。在一些实施方案中,氨基酸取代是T160V。

[0168] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置161处的苯丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是F161V。在一些实施方案中,氨基酸取代是F161W。

[0169] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置162处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N162E。在一些实施方案中,氨基酸取代是N162H。在一些实施方案中,氨基酸取代是N162P。在一些实施方案中,氨基酸取代是N162R。

[0170] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置163处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T163I。在一些实施方案中,氨基酸取代是T163S。

[0171] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置164处的脯氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是P164E。在一些实施方案中,氨基酸取代是P164H。在一些实施方案中,氨基酸取代是P164N。在一些实施方案中,氨基酸取代是P164R。在一些实施方案中,氨基酸取代是P164S。在一些实施方案中,氨基酸取代是P164T。

[0172] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置167处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一

些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q167I。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q167T。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q167V。

[0173] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置170处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V170L。

[0174] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置173处的谷氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是E173R。

[0175] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置174处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A174K。在一些实施方案中,氨基酸取代是A174R。

[0176] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置177处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V177A。

[0177] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置179处的脯氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是P179Q。

[0178] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置181处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S181A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S181C。在一些实施方案中,氨基酸取代是S181R。

[0179] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置182处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q182T。

[0180] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置184处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A184C。在一些实施方案中,氨基酸取代是A184G。在一些实施方案中,氨基酸取代是A184S。

[0181] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置185处具有异亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185A。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185E。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185G。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185L。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185R。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185S。在一些实施方案中,氨基酸取代是I185Y。

[0182] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置189处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q189I。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q189L。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q189V。

[0183] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置190处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N190S。

[0184] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置193处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是

S193E。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193F。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193H。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193K。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193N。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193P。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193T。在一些实施方案中,氨基酸取代是S193V。

[0185] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置194处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T194G。在一些实施方案中,氨基酸取代是T194S。

[0186] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置195处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T195F。

[0187] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置198处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V198A。

[0188] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置200处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V200L。

[0189] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置203处的天冬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是D203N。在一些实施方案中,氨基酸取代是D203R。在一些实施方案中,氨基酸取代是D203V。

[0190] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置204处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一

些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N204A。在一些实施方案中,氨基酸取代是N204K。在一些实施方案中,氨基酸取代是N204R。在一些实施方案中,氨基酸取代是N204S。

[0191] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置206处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T206G。在一些实施方案中,氨基酸取代是T206K。在一些实施方案中,氨基酸取代是T206L。在一些实施方案中,氨基酸取代是T206P。在一些实施方案中,氨基酸取代是T206R。

[0192] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置208处的苯丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是F208G。在一些实施方案中,氨基酸取代是F208L。在一些实施方案中,氨基酸取代是F208R。在一些实施方案中,氨基酸取代是F208T。

[0193] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置209处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A209V。

[0194] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置211处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N211F。在一些实施方案中,氨基酸取代是N211I。在一些实施方案中,氨基酸取代是N211L。在一些实施方案中,氨基酸取代是N211M。在一些实施方案中,氨基酸取代是N211V。

[0195] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置212处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S212F。在一些实施方案中,氨基酸取代是S212L。在一些实施方案中,氨基酸取代是S212M。

[0196] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置213处的脯氨酸的氨

氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是P213N。在一些实施方案中,氨基酸取代是P213R。

[0197] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置216处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A216L。在一些实施方案中,氨基酸取代是A216P。在一些实施方案中,氨基酸取代是A216S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A216T。在一些实施方案中,氨基酸取代是A216V。

[0198] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置217处具有异亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I217S。

[0199] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置218处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S218A。

[0200] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置219处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V219F。在一些实施方案中,氨基酸取代是V219I。在一些实施方案中,氨基酸取代是V219K。在一些实施方案中,氨基酸取代是V219L。在一些实施方案中,氨基酸取代是V219R。

[0201] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置221处的苏氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是T221S。

[0202] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置222处具有异亮氨酸的

氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I222L。

[0203] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置223处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S223A。在一些实施方案中,氨基酸取代是S223C。

[0204] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置225处具有甲硫氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是M225L。

[0205] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置227处的亮氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L227R。

[0206] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置228处的色氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是W228F。

[0207] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置229处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V229C。在一些实施方案中,氨基酸取代是V229I。在一些实施方案中,氨基酸取代是V229L。

[0208] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置231处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一

些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N231L。在一些实施方案中,氨基酸取代是N231Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是N231S。

[0209] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置236处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R236C。在一些实施方案中,氨基酸取代是R236E。在一些实施方案中,氨基酸取代是R236H。在一些实施方案中,氨基酸取代是R236K。在一些实施方案中,氨基酸取代是R236Q。

[0210] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置237处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q237R。

[0211] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置241处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N241P。

[0212] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase在SEQ ID NO:1的位置242处具有缬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V242T。

[0213] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置243处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N243P。

[0214] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置246处的丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实

施方案中,氨基酸取代是A246D。在一些实施方案中,氨基酸取代是A246K。在一些实施方案中,氨基酸取代是A246S。在一些实施方案中,氨基酸取代是A246T。

[0215] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置249处的天冬氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是D249I。在一些实施方案中,氨基酸取代是D249M。在一些实施方案中,氨基酸取代是D249N。在一些实施方案中,氨基酸取代是D249S。在一些实施方案中,氨基酸取代是D249T。

[0216] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置250处的苯丙氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是F250I。在一些实施方案中,氨基酸取代是F250L。在一些实施方案中,氨基酸取代是F250V。在一些实施方案中,氨基酸取代是F250Y。

[0217] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置251处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251A。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251E。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251I。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251K。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251L。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251Q。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251T。在一些实施方案中,氨基酸取代是R251V。

[0218] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置252处的丝氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S252T。

[0219] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置253处的天冬酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N253S。在一些实施方案中,氨基酸取代是N253Y。

[0220] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置254处的天冬酰胺的

氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是N254R。

[0221] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置255处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255E。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255G。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255L。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255M。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255S。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255V。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255W。在一些实施方案中,氨基酸取代是R255Y。

[0222] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置258处的谷氨酰胺的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是Q258P。

[0223] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置8处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是P8T。

[0224] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置31处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L31M。

[0225] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置38处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是G38D。

[0226] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置95处的精氨酸的氨

氨酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是S95N。

[0227] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置126处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V126I。

[0228] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置137处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L137M。

[0229] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置165处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是V165I。

[0230] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置169处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是I169C。在一些实施方案中,氨基酸取代是I169L。在一些实施方案中,氨基酸取代是I169V。

[0231] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置172处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是A172T。

[0232] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置191处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一

些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是L191F。在一些实施方案中,氨基酸取代是L191V。

[0233] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置192处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)。在一些实施方案中,氨基酸取代是P192A。

[0234] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase具有SEQ ID NO:1的位置197处的精氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是用19种天然存在的氨基酸中的任何其他氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸,其中一些实施方案不利用半胱氨酸(由于可能的二硫键形成)或脯氨酸(由于立体效应)。在一些实施方案中,氨基酸取代是K197L。在一些实施方案中,氨基酸取代是K197R。在一些实施方案中,氨基酸取代是K197T。在一些实施方案中,氨基酸取代是K197V。在一些实施方案中,氨基酸取代是K197Y。

[0235] 在一些实施方案中,变体Bhr-PETase酶具有如上所述的SEQ ID NO:1的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30的一个或多个位置处的氨基酸取代。

[0236] D. 本发明的核酸

[0237] 本发明额外提供了编码本发明的变体Bhr-PETase的核酸。如本领域技术人员将理解的,由于遗传密码的简并性,可以制备极其大量的核酸,所有这些核酸都编码本发明的变体Bhr-PETase。因此,在鉴定出特定的氨基酸序列后,本领域技术人员可以通过以不改变蛋白质的氨基酸序列的方式简单修饰一个或多个密码子的序列来制备任何数量的不同核酸。因此,提供氨基酸序列允许生成大量编码该蛋白质的不同核酸序列。

[0238] 在一些实施方案中,特定变体Bhr-PETase由特定核酸序列编码,如SEQ ID NO:2和3中所列。在一些实施方案中,特定变体Bhr-PETase由与SEQ ID NO:2和3具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列编码。

[0239] 如本领域已知的,编码本发明的组分的核酸可以掺入如本领域已知的表达载体中,并且取决于用于产生本发明的异二聚体抗体的宿主细胞。通常,核酸可操作地连接至任何数量的调控元件(启动子、复制起点、可选择的标志物、核糖体结合位点、诱导物等)。表达载体可以是染色体外载体或整合载体。

[0240] 然后将本发明的核酸和/或表达载体转化到任何数量的如本领域众所周知的不同类型的宿主细胞中,包括哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和/或真菌细胞,其中细菌、酵母和真菌发现用于许多实施方案中。

[0241] 1. 变体的制备

[0242] 编码本发明的变体Bhr-PETase的核酸可以使用本领域已知的任何诱变规程来制备,诸如本领域众所周知的定点诱变和合成基因构建。

[0243] 合成基因构建需要体外合成设计的多核苷酸分子以编码感兴趣的多肽。基因合成可以利用多种技术,诸如由Tian等人(2004,Nature 432:1050-1054)描述的基于多重微芯片的技术和相似的技术执行,其中将寡核苷酸合成并组装在光可编程微流体芯片(microfluidic chip)上。优选的技术是GenScript®。

[0244] 2. 调控序列

[0245] 本发明还涉及包含编码本发明变体的多核苷酸的核酸构建体,该多核苷酸与一个或多个控制序列可操作地连接,该控制序列在与控制序列相容的条件下指导编码序列在合适的宿主细胞中的表达。

[0246] 可以以多种方式操作多核苷酸以提供变体的表达。在多核苷酸插入载体之前对多核苷酸进行操作可以是期望的或必需的,这取决于表达载体。利用重组DNA方法来修饰多核苷酸的技术是本领域众所周知的。

[0247] 控制序列可以是启动子,一种由宿主细胞识别用于多核苷酸的表达的多核苷酸。启动子含有介导变体的表达的转录控制序列。启动子可以是在宿主细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸,其包括突变体启动子、截短的启动子和杂合启动子,并且可以获得自编码与宿主细胞同源或者异源的细胞外或细胞内多肽的基因。

[0248] 用于细菌、酵母和真菌的启动子是本领域众所周知的。用于在乳酸菌中表达的示例性操纵子包括嗜热链球菌(*S. thermophilus*)乳糖操纵子或乳酸乳球菌(*L. lactic*) lac ABCDFEGX操纵子,其已成功地用于诱导宿主中的外来基因表达(例如,Simons等人,1993, J. Bact. 175:5186-5175;参见Mollet等人,1993, J. Bact. 175:4315-4324)。细菌的组成型启动子的非限制性额外实例包括lac启动子、trp启动子、tac启动子、T7启动子、erm启动子、tip启动子、nit启动子和Sp6启动子。酵母的示例性启动子包括但不限于AOX1启动子、ADH启动子、PH05启动子、gal10启动子、PKG启动子和GAP启动子。酵母宿主细胞的其他有用启动子由Romanos等人,1992, Yeast 8:423-488描述。此外,真菌载体的有用启动子的实例包括但不限于黑曲霉(*Aspergillus niger*)GLA启动子、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)GPD启动子、衍生自构巢曲霉糖酵解基因的启动子诸如adh3启动子(McKnight等人,EMBO J. 4:2093-2099,1985)。

[0249] 3. 密码子优化

[0250] 虽然Bhr-PETase的野生型编码序列显示于SEQ ID NO:1中,但本领域技术人员将认识到,对于异源表达,可以进行密码子优化以增加在任何特定宿主生物体中的表达。密码子优化可以与本发明的任何变体Bhr-PETase多肽一起进行采用,以便优化在所采用的宿主细胞中的表达。此类方法是本领域众所周知的并且描述于例如W02007/142954中。在异源表达系统中,优化步骤可以提高宿主产生期望的变体Bhr-PETase多肽的能力。蛋白质表达受到许多因素的支配,包括影响转录、mRNA加工、稳定性和翻译起始的那些。多核苷酸优化步骤可以包括提高宿主产生外来蛋白质的能力的步骤以及协助研究人员高效设计表达构建体的步骤。优化策略可以包括例如翻译起始区的修饰、mRNA结构元件的改变以及不同密码子偏倚的选用。以下段落讨论了可能导致减少的异源蛋白表达的潜在问题以及可以克服这些问题的技术。

[0251] 在一些实施方案中,减少的异源蛋白质表达由罕见的密码子诱导的翻译暂停引起。罕见的密码子诱导的翻译暂停包括感兴趣的多核苷酸中存在宿主生物体中很少选用的

密码子,由于它们在可获得的tRNA池中的稀缺性,其可以具有对蛋白质翻译的负面影响。改善宿主生物体中的最佳翻译的一种方法包括执行密码子优化,其可以导致合成多核苷酸序列中的稀有宿主密码子是经修饰的。

[0252] 在一些实施方案中,减少的异源蛋白表达由选择性翻译起始(alternate translational initiation)引起。选择性翻译起始可以包括无意含有能够充当核糖体结合位点(RBS)的基序的合成多核苷酸序列。这些位点可以导致从基因内部位点起始截短蛋白质的翻译。减少产生截短蛋白质(其在纯化期间难以除去)的可能性的一种方法包括从优化的多核苷酸序列修饰推定的内部RBS序列。

[0253] 在一些实施方案中,减少的异源蛋白质表达通过重复诱导的聚合酶滑移(slippage)而发生。重复诱导的聚合酶滑移涉及核苷酸序列重复,已经显示其引起DNA聚合酶的滑移或打滑(stuttering),这可以导致移码突变。此类重复还可以导致RNA聚合酶的滑移。在具有高G+C含量偏倚的生物体中,可能有较高级别的由G或C核苷酸重复构成的重复。因此,减少诱导RNA聚合酶滑移的可能性的一种方法包括改变G或C核苷酸的延伸重复。

[0254] 在一些实施方案中,减少的异源蛋白质表达通过干扰二级结构而发生。二级结构可以隔离RBS序列或起始密码子,并已经与蛋白质表达中的减少相关。茎环结构也可以参与转录暂停和衰减。优化的多核苷酸序列可以在核苷酸序列的RBS和基因编码区中包含最少的二级结构,以允许改善的转录和翻译。

[0255] 在一些实施方案中,限制性位点可以影响异源蛋白质表达。通过修饰可能干扰随后将转录单元亚克隆到宿主表达载体中的限制性位点,可以优化多核苷酸序列。

[0256] 优化DNA序列可以负面地或正面地影响基因表达或蛋白质产生。例如,用更常见的密码子修饰不太常见的密码子可以影响mRNA的半衰期,或通过引入干扰信息的翻译的二级结构来改变其结构。因此,在某些情况下,可能必需改变优化的消息。

[0257] 可以优化基因的全部或一部分。在一些实施方案中,通过优化基本上整个基因来实现期望的表达的调节。在其他实施方案中,期望的调节将通过优化基因的部分但不是全部来实现。

[0258] 可以调整任何编码序列的密码子选用以实现期望的特性,例如在特定细胞类型中的高水平表达。此类优化的出发点可以是具有100%共同密码子的编码序列,或者含有共同和非共同密码子的混合的编码序列。

[0259] 可以生成并测试在其密码子选用中不同的两个或多个候选序列,以确定它们是否具有期望的特性。候选序列可以通过以下来评价:使用计算机来搜索调控元件诸如沉默子或增强子的存在,以及搜索可以通过密码子选用的改变而转化为此类调控元件的编码序列的区的存在。额外的标准可以包括特定核苷酸(例如A、C、G或U)的富集、特定氨基酸的密码子偏倚,或特定mRNA二级结构或三级结构的存在或不存在。可以基于许多此类标准来对候选序列进行调整。

[0260] 构建有希望的候选序列,然后对其进行实验评价。多个候选物可以彼此独立地进行评价,或该过程可以是迭代的,或者通过将最有希望的候选物用作新的出发点,或通过组合两个或多个候选物的区来产生新的杂合体。可以包括进一轮的修饰和评价。

[0261] 修饰候选序列的密码子选用可以导致正元件或负元件的创建或破坏。一般而言,正元件是指其从候选序列中的改变或除去可以导致治疗性的蛋白质的表达的减少或其产

生可以导致治疗性蛋白质的表达的增加了的任何元件。例如,正元件可以包括增强子、启动子、下游启动子元件、正调节物(例如转录激活子)的DNA结合位点,或负责赋予或修饰mRNA二级结构或三级结构的序列。负元件是指其从候选序列中的改变或除去可以导致治疗蛋白表达的增加或其产生将导致治疗蛋白表达的减少的任何元件。负元件包括沉默子、负调节物(例如转录阻遏物)的DNA结合位点、转录暂停位点或负责赋予或修饰mRNA二级结构或三级结构的序列。一般而言,负元件比正元件更高频率地出现。因此,导致蛋白质表达的增加的密码子选用的任何变化更有可能是由于负元件的破坏而不是正元件的创建。此外,候选序列的改变更有可能破坏正元件而不是创建正元件。在一些实施方案中,选择并修饰候选序列以增加治疗性蛋白质的产量。可以例如通过顺序改变候选序列中的密码子或通过随机改变候选序列中的密码子来修饰候选序列。然后,通过确定所得治疗性蛋白质的表达水平或通过评价另一个参数,例如与表达水平相关的参数,来评价经修饰的候选序列。选择与未改变的候选序列相比产生增加的治疗性蛋白质的水平的候选序列。

[0262] 在一些实施方案中,可以修饰一个或一组密码子,例如,不参考蛋白质或信息结构并进行测试。或者,可以根据消息级(message-level)特性来选择一个或多个密码子,例如,在预定区(例如,高或低GC含量)中的位置、在具有诸如增强子或沉默子的结构的区中的位置、在可以进行修饰以引入诸如增强子或沉默子的结构的区,在具有或预测具有二级结构或三级结构(例如链内配对、链间配对)的区中的位置、在缺乏或预测缺乏二级结构或三级结构(例如链内配对或链间配对)的区中的位置。如果特定的经修饰区产生期望的结果,则选择该区。

[0263] 系统地生成候选序列的方法是有用的。例如,在合成核酸序列的各个位置处的一个或一组密码子,例如连续的密码子块,可以用共同密码子(或用非共同密码子,如果例如已经优化出发序列)进行修饰,并且评价所得序列。候选物可以通过优化(或去优化)序列中给定的密码子的“窗口”来生成第一候选物,然后将窗口移动到序列中的新位置,并优化(或去优化)窗口下的新位置中的密码子以提供第二候选物来生成。可以通过确定候选物提供的表达的水平或通过评价另一个参数(例如与表达水平相关的参数)来评价候选物。一些参数可以通过检查或计算地评价,例如高或低GC含量的具有或其缺乏;序列元件诸如增强子或沉默子;二级或三级结构,例如链内或链间配对。

[0264] 在一些实施方案中,优化的核酸序列可以以由没有经优化的核酸序列所表达的水平至少约110%、150%、200%、500%、1,000%、5,000%或甚至10,000%的水平表达本发明的变体Bhr-PETase多肽。

[0265] 以变体Bhr-PETase的氨基酸序列出发,可以设计候选DNA序列。在设计合成DNA序列期间,可以将密码子选用的频率与宿主表达生物体的密码子选用进行比较,并且可以在合成序列中修饰稀有宿主密码子。另外,可以修饰合成的候选DNA序列以除去不期望的酶限制位点并添加或改变任何期望的信号序列、接头或非翻译区。合成DNA序列可以针对可能干扰翻译过程的二级结构(例如G/C重复序列和茎环结构)的存在进行分析。在合成候选DNA序列之前,可以检查优化的序列设计以证实该序列正确编码期望的氨基酸序列。最后,可以使用DNA合成技术,诸如本领域已知的技术来合成候选DNA序列。

[0266] 在一些实施方案中,可以利用宿主生物体中的一般密码子选用,诸如本文所述的任何密码子来优化异源多核苷酸序列在该宿主生物体中的表达。可以评价将很少被视为是

宿主表达系统中针对特定氨基酸优选的密码子的百分比和分布。5%和10%选用的值可以用作确定稀有密码子的截断值。

[0267] 4. 宿主细胞和生产株

[0268] 在一方面,本公开涉及包含编码本文所述的变体Bhr-PETase的核酸的表达载体。在另一个方面,本发明还涉及包含表达载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌。在一些实施方案中,宿主细胞是酵母。在一些实施方案中,宿主细胞是真菌。在一些实施方案中,宿主细胞可以是细菌,包括但不限于大肠杆菌(*E.coli*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)。在一些实施方案中,宿主细胞可以是酵母,包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母属(*Pichia*)。在一些实施方案中,宿主细胞可以是真菌,包括但不限于黑曲霉、里氏木霉(*T.reseei*)或嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)。

[0269] 表达载体可以是所选宿主中的任何待整合至基因组中的整合载体或自主复制的质粒。在一个实施方案中,载体可以稳定地维持在所引入的细胞中,其上支持处于适合表达的状态的变体Bhr-PETase基因。可以选择表达载体以适合于引入该载体的特定宿主细胞。在将大肠杆菌(*Escherichia coli*)用作宿主的情况下,可用于使用的具体实例包括但不限于pBR322、pACYC184、pUC18、pKK223-2、pHSG398(Takara Bio Inc.)、pTrcHis(Invitrogen Corporation)和pET11a(Stratagene Corporation);用于其他革兰氏阴性细菌的pBBR122(Mobitech)和pBHR1(Mobitech);用于芽孢杆菌属的pHW1520(Mobitech)和pHY300PLK(Takara Bio Inc.);用于放线菌属的pSH19(Herai等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,101,14031-14035,2004)、pIJ702(John Innes Centre)、pIJ943(John Innes Centre)、pIJ8600(John Innes Centre)、pIJ602(John Innes Centre)、1,pTip-载体(Nakashima等人,Appli.Environ.Microbiol.,70,5557-5568,2004)、pTYM19(Onakaetal.,J.Antibiot.,56,950-956,2003);用于毕赤酵母的pPICZα和pPIC9(Thermo Fisher Scientific),以及用于真菌的pA0815(Invitrogen Corporation)、pAUR101(Takara Bio Inc.)、pAUR123(Takara Bio Inc.)和pAUR316(Takara Bio Inc.)。

[0270] 在另一个方面,本公开还涉及在宿主细胞中表达变体Bhr-PETase的方法。在另一个方面,本公开还涉及制备变体Bhr-PETase的方法,其包括在产生所述变体Bhr-PETase的条件下培养宿主细胞,并回收所述变体Bhr-PETase。

[0271] 转化的生物体的培养可以在可以转化的宿主细胞的营养培养基的培养基中进行而不影响变体Bhr-PETase的转化。此类培养基包含适当的碳源、氮源、无机盐、天然有机营养素等等。作为碳源,可以单独或以组合使用葡萄糖、果糖、甘油、山梨糖醇、有机酸。碳源的浓度没有特别限制,并且可以为1%至10%。作为氮源,可以单独使用铵、尿素、硫酸铵、硝酸铵、醋酸铵等等,或以组合使用其两种或更多成员。作为无机盐,可以使用盐,诸如磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、硫酸亚铁。另外,作为对待使用的细菌具有生长促进作用的有机营养素,可以使用蛋白胨、肉膏(meat extract)、酵母提取物、玉米浸膏(corn steep liquor)和酪蛋白氨基酸,此外,在培养基中还可以含有少量的维生素和核酸。

[0272] 5. PETase配制剂和用途

[0273] 如本领域技术人员将理解的,本发明的变体Bhr-PETase的配制剂取决于其最终用途和相关联的条件。本发明变体Bhr-PETase的合适配制剂包括液体配制剂、干燥配制剂(包括喷雾干燥配制剂)、粉末状配制剂、颗粒配制剂和丸状配制剂。Bhr-PETase还可以配制为

“嵌入PET颗粒中”以进行自然降解。

[0274] 在一些实施方案中,本发明的酶组合物(即,多肽组合物)可以为适合使用的任何形式,诸如,除去或未除去细胞的粗发酵肉汤、具有或不具有细胞碎片的细胞裂解物、半纯化或纯化的酶组合物,或宿主细胞,作为酶的来源。

[0275] 在一些实施方案中,酶组合物可以是干粉或颗粒、无粉颗粒、液体、稳定化液体或稳定化的受保护的酶。例如,可以通过根据已建立的过程添加稳定剂诸如糖、糖醇或另一种多元醇,和/或乳酸或另一种有机酸来稳定化液体酶组合物。

[0276] 在一些实施方案中,本发明的多肽组合物的剂量和其他条件(在该条件下使用该组合物)可以基于本领域已知的方法来确定。

[0277] 上述组合物适用于PET生物降解、PET生物循环、PET升级再造和/或PET表面改性过程。

[0278] 在一些实施方案中,上述组合物用于降解预处理的PET。PET预处理可以在酶促降解步骤之前进行。常用的PET预处理可以大体上分类成a)机械预处理、b)热机械预处理和c)化学预处理。机械过程可以涉及将PET薄膜研磨成筛分后小于约500 μm 的颗粒。该过程可以与将PET薄膜浸入液氮中结合起来,主要以便于研磨的过程。这种类型的机械预处理的优点可以是由于减小的颗粒尺寸导致的酶可接近性。在热机械降解中,主链断裂反应可以影响环状低聚物的稳定性。在热机械预处理中,高度结晶的PET薄片可以使用配有熔体泵的挤压机(extruder)在非常高的温度(>260 $^{\circ}\text{C}$)下无定形化,并然后微粉化至小于500 μm 的颗粒尺寸。预处理PET的商业方法的实例是通过使用挤压铸造过程,即将熔融聚合物铸造到冷却的PET辊上以固化。热机械预处理可以降低工业级PET的结晶度以及颗粒尺寸,这允许酶将其解聚的可接近性。在化学预处理的情况下,可以使用离子液体、强酸、碱、溶剂等以降低PET的结晶度或变化PET的表面结构,以促进酶的接近,以将其进一步解聚成其单体。

[0279] 无论使用化学方法还是生物方法,回收塑料中的两个显著的障碍可以是材料的可变性以及识别废塑料并将其分离成可识别的等级范围相关联的成本。不同类型和等级的塑料在密度和分子量中不同。了解回收过程中特定塑料的特性的优势将使其在投入有价值的二次使用时更容易确定其价值和耐用性。但是,从资源利用、时间管理和成本效益的角度来看,分选的过程是一个主要阻碍。因此,当寻找生物缓解以克服与差异化塑料分选相关联的路障时,使用具有广泛底物特异性的稳健酶对混合塑料进行解聚成为最高优先事项。混合塑料是涵盖了以下的术语:来自生活垃圾流的所有非瓶塑料包装,并且它包括通常在家庭垃圾箱中发现的具有各种聚合物类型和颜色的刚性和柔性塑料制品。混合塑料指不同的塑料的混合物。各种聚合物类型可以指PET和/或生物或化学衍生的PET类似物、类PET或PET替代物。PET类似物、类PET或PET替代物的实例包括但不限于聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚碳酸酯(PC)、聚己内酯(PCL)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)和高密度聚乙烯(HDPE)。单独或与其他辅助酶结合的Bhr-PETase可以彻底改变混合塑料的解聚的生物方法。与化学方法相对,混合塑料的酶促解聚的过程可能在环境上更加安全,并且能够保留二次使用应用的市场价值。此类生物处理还可以与温和的化学预处理或热机械预处理组合,以实现更高的解聚效率。

[0280] PET预处理和酶促降解后,产品可以回收并生成其他有价值的化学品。在一个实施方案中,TPA(对苯二甲酸)使用工业相关过程进行纯化,并且该过程还可以生产硫酸钠,一

种常用于洗涤剂、造纸工业和玻璃工业的化学品。在另一个实施方案中,回收的TPA用作合成原始PET的起始物料。从回收的TPA合成的PET可以表现出与使用石油化工TPA合成的PET相似的特性,诸如平均分子量和特性黏度(intrinsic viscosity)。在一个实施方案中,从回收的PET吹制的瓶展示出与通常的PET瓶相比相似的机械性能和更好的明度(lightness)值。

[0281] 在一些实施方案中,本发明提供了制备酶混合物的方法,该酶混合物包含如本文所述的变体Bhr-PETase与其他降解PET的辅助酶和下游MHETase,以产生用于预处理的PET的高效翻转(turn-over)的降解PET的酶混合物。

实施例

[0282] 实施例1:PET水解酶基因选择、合成和克隆

[0283] 基于生物信息学分析,选择了多种新型PET水解酶,并由GeneWiz (<https://www.genewiz.com/en/>) 合成。将合成的基因克隆到pET28b(+) 载体(Millipore Inc., 目录号69865)中。选择三种水解酶(Lcc-PETase、Bhr-PETase、Is-PETase)进行进一步纯化和表征。

[0284] 实施例2:在250ml摇瓶中通过大肠杆菌产生的PET水解酶的制备

[0285] 将含有来自单一菌落的编码重组水解酶的基因的BL21 (DE3) 化学感受态大肠杆菌(ThermoFisher Scientific, USA: 目录号C600003)接种到含有具有1%葡萄糖和50 μ g/mL卡那霉素的5mL溶源肉汤(LB肉汤)的单个培养管中。培养物在30 $^{\circ}$ C、200rpm和85%湿度下生长过夜。将1mL的过夜培养物转移至含有50mL的具有50 μ g/mL卡那霉素的极品肉汤(terrific broth) (TB肉汤)的摇瓶中。然后将烧瓶在37 $^{\circ}$ C、250rpm和85%湿度下温育2-2.5小时。在2-2.5小时测量预诱导OD,并且如果OD₆₀₀达到0.6-0.8左右,则用IPTG(异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷)进行诱导以获得烧瓶中0.5mM IPTG的终浓度。然后将烧瓶在30 $^{\circ}$ C、250rpm和85%湿度下温育18-24小时,除Is-PETase外,所有均在16 $^{\circ}$ C下生长。在活性测定之前,将上清液和裂解物转移至50mL离心管并储存在-20 $^{\circ}$ C下。基于本文的规程,总共使三种候选物(Lcc-PETase、Bhr-PETase、Is-PETase)生长。

[0286] 实施例3:自摇瓶产生的His标签PET水解酶的Ni柱纯化

[0287] 将每个样品浓缩至15-20mL,然后使用Thermo Scientific HisPurTM Ni-NTA旋转柱(目录号88226)。从细胞培养物中纯化三种PET水解酶(Lcc-PETase、Bhr-PETase、Is-PETase)。根据制造商的指南遵循方案。在250mM咪唑中进行多重洗脱,并基于各个级分中洗脱液的蛋白质条带强度(使用凝胶定量测量的),将合并级分的储备溶液用于脱盐步骤。

[0288] 实施例4:自摇瓶产生的纯化PET水解酶的脱盐

[0289] 使用一次性使用的Thermo Scientific ZebaTM旋转脱盐柱,从Ni纯化的酶中除去7K MWC0(目录号89892)、咪唑和NaCl。根据制造商的指南遵循脱盐方案。然后对脱盐酶进行定量以确定蛋白质浓度(g/L)。

[0290] 实施例5:使用BHET(双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯)作为底物对大肠杆菌产生的PET水解酶进行热稳定性测试

[0291] 每个候选物的归一化PET水解酶蛋白在30 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C或70 $^{\circ}$ C下经受1.5小时的攻击。同时将酶保持于冰上充当未攻击条件。攻击后,向Costar Deep孔板中添加250 μ L的10mM

BHET(双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯)、62.5 μ L未攻击的和攻击的酶以及170 μ L 0.1M磷酸钠缓冲液(pH 8)。将板在50℃下温育2小时。2小时后,将样品以4,000rpm离心2分钟。使用高效液相色谱(HPLC)分析上清液,以确定反应物中产生的TPA量。具有部件号959757-902的Zorbax Eclipse Plus C18(Rapid Resolution HD 2.1x50mm 1.8-Micron)柱与部件号82175-901的保护柱一起使用。设置0.6mL/分钟的流速和35℃的柱温用于在HPLC中运行。使用梯度法来检测对苯二甲酸(TPA),流动相1由具有0.1%三氟乙酸的水组成,并且流动相2由具有0.1%三氟乙酸的乙腈组成。每种PET水解酶的残留%通过以下公式计算:(在攻击条件下产生的MHET+TPA)/(在未攻击条件下产生的MHET+TPA)*100。

[0292] 图4中显示了三种候选物(Lcc-PETase、Bhr-PETase、Is-PETase)的热稳定性结果。在目前的实验条件下,Is-PETase是最不稳定的候选物,其在50℃时失去90%的活性。Bhr-PETase和Lcc-PETase在所有测试温度下均保持 $\geq$ 80%的残留活性。

[0293] 实施例6:评价大肠杆菌产生的PET水解酶的大规模PET薄膜测定

[0294] 这些实验在250ml玻璃瓶中进行。在这些实验中,使用了两种类型的PET底物。A)无定形PET薄膜获得自Goodfellow(目录号ES301445),厚度为0.25mm。使用切纸机将PET薄膜切割成1x 30cm的条,并且然后再次切割至大约1x 0.25cm的条。将PET薄膜的条用机械研磨机研磨成细粉。B)结晶度 $>$ 40%的高结晶PET粉末获得自Goodfellow(目录#ES306031/1)。在0.1M磷酸钠缓冲液(pH 8.0)中进行2-10g/L PET粉末加载至50ml的终体积。使用不同剂量的三种候选物的归一化蛋白质在65℃或者72℃下以200rpm摇动进行评价。反应持续6-144小时之间的任何时间。在不同的时间点对瓶进行取样,并使用高效液相色谱(HPLC)分析反应物以确定反应物中产生的TPA量。具有部件号959757-902的Zorbax Eclipse Plus C18(Rapid Resolution HD 2.1x50mm 1.8-Micron)柱与部件号82175-901的保护柱一起使用。设置0.6mL/分钟的流速和35℃的柱温以在HPLC中运行。使用梯度法来检测对苯二甲酸(TPA),流动相1由含0.1%三氟乙酸的水组成,并且流动相2由含0.1%三氟乙酸的乙腈组成。

[0295] PET测定的结果汇总于图5和图6中。在无定形和 $>$ 40%结晶PET两者中,Bhr-PETase均优于Lcc-PETase。结果进一步表明,与Bhr-PETase相比,Lcc-PETase更不热稳定,无论底物类型如何。与在65℃和72℃两者下酶载量为2.4mg/g PET时可以解聚 $>$ 90%无定形PET的Bhr-PETase(图5)相比,较高剂量下的Lcc-PETase的解聚活性显著较低(数据未显示)。图6进一步表明,Bhr-PETase不可以完全降解高度结晶的PET,并可能需要额外的预处理或辅助酶来做到这一点。

[0296] 总体而言,将Bhr-PETase鉴定为所有已经评价的中性能最好的PET水解酶。因此,选择Bhr-PETase作为进一步改善的靶标。

[0297] 实施例7:Bhr-PETase集合的设计和构建

[0298] 为了进一步改善Bhr-PETase的活性和热稳定性,基于序列和结构分析设计了多个G1变体集合。该设计包括每个变体的一到多个特定突变。随后使用标准定点诱变方法在Bhr-PETase G1P(野生型Bhr-PETase,第1代亲本)上构建G1变体集合,并随后将其克隆到pET28b(+)载体(Millipore Inc.,目录号69865)中,用于大肠杆菌中的产生。

[0299] 为了进一步改善Bhr-PETase的活性和热稳定性,基于序列和结构分析设计了多个G2变体集合。该设计包括每个变体的一到多个特定突变。使用标准定点诱变方法在Bhr-

PETase G2P (第2代亲本,即具有氨基酸取代S27L的G1P)上构建G2变体集合,并随后阿静器克隆到相关载体中以用于在期望的宿主中的产生。

[0300] 实施例8:HTP生长:微量滴定板中Bhr-PETase G1P、G1变体、G2P和G2变体的制备

[0301] 将含有来自单一菌落的编码重组PETase的基因的BL21 (DE3) 化学感受态大肠杆菌 (ThermoFisher Scientific, USA: 目录号C6000003) 接种到含有具有1%葡萄糖和50 μ g/mL卡那霉素的180 μ L溶源肉汤 (LB肉汤) 的96孔板的单个孔中。培养物在30 $^{\circ}$ C、200rpm和85%湿度下生长过夜。将20 μ L的过夜培养物从每个孔转移到含有具有50 μ g/mL卡那霉素的380 μ L极好的肉汤 (TB肉汤) 的96孔板中。然后将板在37 $^{\circ}$ C、250rpm和85%湿度下温育2-2.5小时。在2-2.5小时测量预诱导OD,并且如果OD600达到0.6-0.8左右,则用IPTG (异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷) 进行诱导以获得孔中0.5mM IPTG的终浓度。然后将板在30 $^{\circ}$ C、250rpm和85%湿度下温育18-24小时。在活性测定之前,将上清液转移至圆底板并储存于-20 $^{\circ}$ C。

[0302] 将含有来自单一菌落的编码重组Bhr-PETase的基因的宿主接种到含有相关培养基的24或96孔板的单个孔中。然后,培养物在30 $^{\circ}$ C、200rpm和85%湿度下生长过夜。过夜培养物传代培养至含有相关培养基的24或96孔板中。然后将板在30 $^{\circ}$ C、200rpm和85%湿度下温育。每24小时用各自的诱导剂诱导一次培养物,持续多达120小时。在期望的收获时间将上清液转移至圆底板,并在活性测定前储存于-20 $^{\circ}$ C。

[0303] 实施例9:评价Bhr-PETase G1P、G1变体、G2P和G2变体活性/热稳定性的HTP PET薄膜测定

[0304] 对于总活性测试,从Goodfellow (目录号ES301445) 获得无定形PET薄膜,厚度为0.25mm。使用切纸机将PET薄膜切割成1x 30cm的条,并且然后再次切割至大约1x 0.25cm的条。将PET薄膜的条用机械研磨机研磨成细粉。使用树脂加载机将PET粉末加载到96孔板中。96costar深孔中的每个中分配了大约8-9mg的PET粉末。向含有PET粉末的costar深孔中添加1.4mL的0.1M磷酸钠缓冲液 (pH 8.0)。将100 μ L的酶分配到costar深孔中,密封板,然后在65 $^{\circ}$ C下温育72小时。72小时后,将板以4,000rpm离心2分钟。将180 μ L的上述反应物转移至costar圆底板中,并向其中添加20 μ L的内部 (in-house) 制备的Is-MHETase。将板在50 $^{\circ}$ C下温育30分钟。30分钟后,将板以4,000rpm离心2分钟。使用磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 在添加有50 μ L的10mM EDTA和50 μ L的10mM FeSO₄的Costar Deep中将反应混合物稀释以进行线性测定检测。将反应物在黑暗中温育10分钟,并以4,000rpm将板离心2分钟,然后将200 μ L反应物转移至黑色透明底荧光板中。10分钟后,用328nm激发光和421nm发射光针对TPA (对苯二甲酸) 活性测量终点读数。

[0305] 对于热稳定性测试,将150 μ L的酶转移至PCR板中。将板在86 $^{\circ}$ C下温育3小时。3小时后,将100 μ L的酶转移至含有1.4mL的0.1M磷酸钠缓冲液 (pH 8.0) 和8-9mg/孔研磨的PET粉末的costar深孔板中。将板在65 $^{\circ}$ C下放置72小时。72小时后,将板以4,000rpm离心2分钟。将180 μ L的上述反应物转移至costar圆底板并向其中添加20 μ L的Is-MHETase。将板在50 $^{\circ}$ C下温育30分钟。30分钟后,将板以4,000rpm离心2分钟。使用高效液相色谱 (HPLC) 分析反应物,以确定反应物中产生的TPA量。具有部件号959757-902的Zorbax Eclipse Plus C18 (Rapid Resolution HD 2.1x50mm 1.8-Micron) 柱与部件号82175-901的保护柱一起使用。设置0.6mL/分钟的流速和35 $^{\circ}$ C的柱温以在HPLC中运行。使用梯度法来检测对苯二甲酸 (TPA),流动相1由含0.1%三氟乙酸的水组成,并且流动相2由含0.1%三氟乙酸的乙腈组

成。

[0306] 结果汇总于图7、图8和图9中。所有G1变体均显示出相比于Bhr-PETase G1P(野生型Bhr-PETase)改善的总活性和/或热稳定性。与Bhr-PETase G1P相比,具有氨基酸取代S27L的Bhr-PETase G1变体展示出1.80倍改善的总活性以及3.36倍改善的热稳定性,并且因此将其选择为Bhr-PETase G2P。所有G2变体均显示出比Bhr-PETase G2P进一步改善的总活性。

```
1  snpyqrgpnp  trsalttdgp  fsvatysvsr  lsvsgfgggv  iyyptgttlt  fggiamspgy
61  tadasslawl  grrlashgfv  vivintnsrl  dfpdsrasql  saalnlyrts  spsavrarld
121  anrlavaghs  mgggatlrir  eqiptlkagv  pltpwhtdkt  fntpvppqliv  gaeadtvapv
181  sqhaipfyqn  lpsttpkvyy  eldnathfap  nspnaaisvy  tiswmklwvd  ndtryrqflc
241  nvndpalsdf  rsnnrhcg
```

图1

	1				50
SEQ_ID_NO_1	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ_ID_NO_4	H-----	-----	-----	-----	-----
SEQ_ID_NO_6	-----	-----	-----	-----	-----
Q47RJ7	-----	-MPPHAARPG	PAQNRRGRAM	AVITPRRERS	SLLS-----
CBY05529	-----	-MPPHAARPG	PAQNRRGCAM	AVMTPRRERS	SLLS-----
PZN61876	-----	-----	-----M	AVMTPRRERS	SLLS-----
AAZ54921	-----	-----	-----M	AVMTPRRERS	SLLS-----
BAK48590	-----	-----	-----M	SVTTPRR-ET	SLLS-----
A0A147KJY8	-----	-----	-----M	SVTTPRR-RT	PLLS-----
WP_083947829	-----	-----	-----	-----	-MLS-----
A0A4R6UW92	-----	-----	MNMTNSTLDQ	PTESPAKSAS	PLSRG-----
A0A5Q2RDB8	-----	-----	-----M	KGKPHMTTTA	RRRQ-----
ACU97777	-----	-----	---MRIRRQ	AGTGARASMA	RAIG-----
A0A561WKJ0	-----	-----	-----M	SVLHQT---	-----
G0FYZ7	-----	-----	-----M	SALTSQPTSS	GSSEKIPRLR
A0A0N0A0T6	-----	-----	-----	-----	---MPNEVYS
A0A1W2C2B9	-----	-----	---MRTWSPW	LQGRGRSSPC	S--LPNEVYS
A0A2T0T7X1	-----	-----	-----M	LPGRFPSRRF	G--VYNDVQL
A0A5Q0HE30	-----	-----	-----	-----	-----
A0A1Q4WZS7	-----	-----	-----	-----	-----
A0A4R4NB20	-MTGDFADAR	GPAACADCAR	PGAGPRLRPV	PGSRLPAPPP	EQERTDVRSL
A0A1D8SZ57	-----	-----	-----M	QRNPRTRT--	-----RAT
Q9L2J6	-----	-----	-----M	QQNPHTHAAP	GAARPVLRGV
A0A089Z882	-----	-----	-----M	QQQHRTDSAT	P-----RRR
A0A1H9JKT6	-----	-----	-----M	EPQQHDTTPG	TATR--HRGA
A0A1Y5XYT9	-----	-----	-----M	RRGVRIITGL	TIAP-----
R4SZ25	-----	-----	-----M	RSTTRILCGL	-----
A0A1Q8CLB3	-----	-----	-----M	RRTLRTLCLGL	A-----
U5W5F9	-----	-----	-----M	QSPTIPARLR	AR-----
AAE13316	-----	-----	-----	-----	-----

图2A

	51				100
SEQ_ID_NO_1	-----	-----	-----	-----	---SNPYQRG
SEQ_ID_NO_4	----HHHHHS	SGLVPR----	-----	-----	-G SHMSNPYQRG
SEQ_ID_NO_6	-----	-----	-----	-----	--QTNPYARG
Q47RJ7	-RALRFTAAA	ATALVTAVSL	-----	-----	-AAP AHAANPYERG
CBY05529	-RALQVTAAA	ATALVTAVSL	-----	-----	-AAP AHAANPYERG
PZN61876	-RALQVTAAA	ATALVTAVSL	-----	-----	-AAP AHAANPYERG
AAZ54921	-RALQVTAAA	ATALVTAVSL	-----	-----	-AAP AHAANPYERG
BAK48590	-RALRATAAA	ATAVVATVAL	-----	-----	-AAP AQAANPYERG
A0A147KJY8	-RVLRTAAVA	ATAAASVLAL	-----	-----	-SAP AQAANPYERG
WP_083947829	-QVTAVVAAA	A----AAVTL	-----	-----	-SAP ALAANPYERG
A0A4R6UW92	VRTAIRTAVA	AALVAGGVGI	-----	-----	-ASP AYAANPYERG
A0A5Q2RDB8	-TFVAIIAML	LASLALSPGA	-----	-----	-DAQ AS--NPYQRG
ACU97777	-VMTTALAVL	VGAVGGVAGA	-----	-----	-EVS TAQDNPYERG
A0A561WKJ0	-WRSALATTL	IAAIVTLLG-	-----	-----	-APA--RAANPYERG
G0FYZ7	GWRAKAAGVV	LAALALTG-	-----	-----	-VAAPA PAAANPYERG
A0A0N0A0T6	-AVQLRTLIP	LALTLLVLVTG	-----	-----	-TAA QAADNPYERG
A0A1W2C2B9	-AVQLRTLIP	IALSMVLLGG	-----	-----	-TVA QAADNPYERG
A0A2T0T7X1	RSVFTTVTLV	AALVGGAIGA	-----	-----	-SPA IAAENPYERG
A0A5Q0HE30	-----	---MALALAA	-----	-----	-PQA TAAETERYRG
A0A1Q4WZS7	----MPALI	PALALSLGV	-----	-----	-TPA TGAEEEFRRG
A0A4R4NB20	PSRAAKTLA	TALAAGALAV	PQ-----	----	-ALSQAA QAADNPYERG
A0A1D8SZ57	RR--RFAGVT	AAVAAVLA--	---LSTLTGP	-----	-GA QAADNPYERG
Q9L2J6	RR--RLAAVT	AAVAAVLV--	---LGTLTGP	-----	-GA QAADNPYERG
A0A089Z882	RRTGRLTGLA	AATAAVIG--	---LSTLSGT	-----	-GA HAADNPYERG
A0A1H9JKT6	PR--RLTKLG	VALAMVLGGV	GVALPTAQAT	QDSGAAPAAV	QAAENPYERG
A0A1Y5XYT9	----VIGAVV	AAGVPATALG	AVVTGTPTTA	IG-----	-AVE LSAENPYERG
R4SZ25	-----ATVA	ALTVAPTAY-	-----	-----	-AAENPYERG
A0A1Q8CLB3	----LAGSV	LAGTASTAS-	-----	-----	-AQENPYERG
U5W5F9	-RLFVTAAAT	LTLVAGSLTG	-----	-----	-ATAA QAAENPYERG
AAE13316	-----MKFF	TTILST----	-----	-----	-AS LVAALPAAVD

图2B

	101				150
SEQ_ID_NO_1	PNPTRSALT	-DGPFSVATY	SVSRLSVSGF	GGGVIYYPTG	TTL-TFGGIA
SEQ_ID_NO_4	PNPTRSALTA	-DGPFSVATY	TVSRLSVSGF	GGGVIYYPTG	TSL-TFGGIA
SEQ_ID_NO_6	PNPTAASLEA	SAGPFTVRSF	TVSRP--SGY	GAGTVYYPTN	AGG-TVGAI
Q47RJ7	PNPTDALLEA	RSGPFSVSEE	RASRFGADGF	GGGTIYYPR-	ENN-TYGAVA
CBY05529	PNPTDALLEA	RSGPFSVSEE	NVSRLGASGF	GGGTIYYPR-	ENN-TYGAVA
PZN61876	PNPTDALLEA	RSGPFSVSEE	NVSRLSASGF	GGGTIYYPR-	ENN-TYGAVA
AAZ54921	PNPTDALLEA	SSGPFSVSEE	NVSRLSASGF	GGGTIYYPR-	ENN-TYGAVA
BAK48590	PNPTESMLEA	RSGPFSVSEE	RASRFGADGF	GGGTIYYPR-	ENN-TYGAI
AOA147KJY8	PNPTQALLEA	RSGPFSVSSE	RAWRLGSDGF	GGGTIYYPR-	ENN-TYGAVA
WP_083947829	PDPTQASLEA	SRGPFPVSEE	RVSSP-VSGF	GGGTIYYPQ-	ENN-TYGAVA
AOA4R6UW92	PDPTDSSVEA	LRGPYSVDDT	SVSSL-VSGF	GGGTVYYPTG	TNE-TFGAVV
AOA5Q2RDB8	PNPTQSSIEA	LRGPYSTTTT	SVSSF-VSGF	GGGTIYYPTG	TNE-TFGGVV
ACU97777	PDPTEDSIEA	IRGPFSVATE	RVSSF-ASGF	GGGTIYYPRE	TDEGTFGAVA
AOA561WKJ0	PAPTTASIEA	TRGPFAIAQL	TVARSSVSGF	GGGTVYYPTD	TSAGTFGAVA
G0FYZ7	PDPTTASIEA	TSGSFATSTV	TVSRLAVSGF	GGGTIYYPTT	TTAGTFGALS
AOA0N0A0T6	PAPTVSSIEA	LRGPFAVSET	SVSSL-VGGF	GGGTIYYPTS	TTSCTFGAVA
AOA1W2C2B9	PAPTNSSIEA	SRGSFAVSET	SVSSL-VSGF	GGGTIYYPTS	TSAGTFGAVA
AOA2T0T7X1	PAPTNSSIEA	SRGSFAVSET	SVSSLSVTGF	GGGTIYYPTS	TSAGTFGAI
AOA5Q0HE30	PAPTNSSIEA	LRGPFAVSET	SVSSLVVTGF	GGGTIYYPTS	TAEGTFGAVA
AOA1Q4WZS7	PAPTNSSIEA	SRGPFAVSST	TVSSLVVTGF	GGGTIYYPTS	TAEGTFGAI
AOA4R4NB20	PAPTQSSIEA	LRGPFAVSQT	SVSSLVSGF	GGGTIYYPTS	TAAGTFGAVA
AOA1D8SZ57	PAPTESSIEA	SRGSYSVADT	RVSSLAVTGF	GGGTIYYPTS	TADGTFGAVV
Q9L2J6	PAPTESSIEA	LRGPYSVADT	SVSSLAVTGF	GGGTIYYPTS	TSAGTFGAVV
AOA089Z882	PAPTQSSIEA	LRGPYAVSQT	SVSSLAVTGF	GGGTIYYPTS	TADGTFGAVA
AOA1H9JKT6	PDPTERSIEA	ARGPYSVSET	RVSSLVVTGF	GGGTIYYPTT	TSAGTFGAVA
AOA1Y5XYT9	PDPTESIEA	SRGPFSVSQT	TVSRLSATGF	GGGTIYYPTS	TSECTFGALA
R4SZ25	PDPTESIEA	SRGSFAVSQT	SVSSLAVTGF	GGGTIYYPTS	TAQCTFGAVA
AOA1Q8CLB3	PDPTENSIEA	TRGPFAVSQT	SVSSLVVTGF	GGGTIYYPTS	TAEGTFGAVA
U5W5F9	PAPTSAVLDA	SRGPFAVSQT	SVSSLVSGF	GGGVIYYPTS	TSAGTFGGIA
AAE13316	SNHTPAAPEL	VARQLGAIE	GLESGSANAC	PDAILIFARG	STEPGNMGIT

图2C

	151				200
SEQ_ID_NO_1	MSPGYTADAS	SLAWLGRRRLA	SHGFVVIVIN	TNSRLDFPDS	RASQLSAAL-
SEQ_ID_NO_4	MSPGYTADAS	SLAWLGRRRLA	SHGFVVLVIN	TNSRFDYPDS	RASQLSAAL-
SEQ_ID_NO_6	IVPGYTARQS	SIKWVGPERLA	SHGFVVITID	TNSTLDQPS	RSSSQMAALR
Q47RJ7	ISPGYTGTQA	SVAWLGERIA	SHGFVVITID	TNTTLDQPS	RARQLNAAL-
CBY05529	ISPGYTGTQA	SVAWLGKRIA	SHGFVVITID	TITTLDQPS	RARQLNAAL-
PZN61876	ISPGYTGTEA	SIAWLGERIA	SHGFVVITID	TITTLDQPS	RAEQLNAAL-
AAZ54921	ISPGYTGTEA	SIAWLGERIA	SHGFVVITID	TITTLDQPS	RAEQLNAAL-
BAK48590	ISPGYTGTQS	SIAWLGERIA	SHGFVVIAID	TNTTLDQPS	RARQLNAAL-
A0A147KJY8	ISPGYTGTQA	SVAWLGERIA	SHGFVVITID	TNTTLDQPS	RARQLDAAL-
WP_083947829	ISPGYTATQS	SVAWLGERIA	SHGFVVITID	TNTTLDQPS	RADQLEAAL-
A0A4R6UW92	IAPGYTASSS	SMSWMGERLA	SQGFVIFTID	TNTRYDQPS	RGDQISAAAL-
A0A5Q2RDB8	VAPGFTASQS	SMSWLGHRLA	SQGFVVFTID	TNGRFDQPS	RADQLLAAA-
ACU97777	VAPGFTASQG	SMSWYGERVA	SQGFVIFTID	TNTRLDDQPGQ	RGRQLLAAL-
A0A561WKJ0	ISPGFTASQS	SVSWLGPRIA	SQGFVVITID	TLSVYDQPS	RGTQLLAAL-
G0FYZ7	IAPGFTATQS	SIAWLGPERLA	SQGFVVFTID	TLTTSDDQPS	RGRQLLASL-
A0A0N0A0T6	VSPGYTGTQS	SISWLGPRLA	SQGFVVFTID	TNTIYDQPS	RASQLLAAL-
A0A1W2C2B9	ISPGYTGTQS	TISWLGPRLA	SQGFVIFTID	TNSRYDQPS	RASQLLAAL-
A0A2T0T7X1	VSPGYTGTQS	SISWLGPRIA	SQGFVVFTID	TITTLDQPS	RASQLLAAL-
A0A5Q0HE30	ISPGYTGTQS	SISWLGPRLA	SQGFVVFTID	TNTTLDQPS	RADQLLAAL-
A0A1Q4WZS7	VSPGYTASQS	SMAWLGPRIA	SQGFVVFTID	TNSRYDQPS	RASQLLSAAL-
A0A4R4NB20	VAPGFTADQS	SMAWLGPRLA	SQGFVIFTID	TNTRLDDQPS	RARQLNAAL-
A0A1D8SZ57	ISPGYTAYQS	SIAWLGPERLA	SQGFVVFTID	TNTTLDQPS	RGRQLLAAL-
Q9L2J6	IAPGFTAYQS	SIAWLGPERLA	SQGFVVFTID	TNTTLDQPS	RGRQLLAAL-
A0A089Z882	ISPGFTAYES	SIAWLGPERLA	SQGFVVFTID	TNTTMDQPS	RGDQLLAAL-
A0A1H9JKT6	VSPGYTADQS	SMAWYGPERLA	SQGFVVFTID	TNTRYDQPS	RGDQLLAAL-
A0A1Y5XYT9	ISPGFTATQS	SISWMGPRLA	SQGFVVITID	TLSTLDQPS	RGDQLRAAL-
R4SZ25	ISPGFTATQS	SIAWIGPERLA	SQGFVVFTID	TNTIYDQPS	RGDQLLAAL-
A0A1Q8CLB3	VSPGFTATQS	SIAWIGPERLA	SQGFVVITID	TLTVLDQPS	RGDQLLAAL-
U5W5F9	ISPGYTASWS	SISWLGPRIA	SHGFVVIGIE	TNSVFDQPS	RGNQLLAAL-
AAE13316	VGPALANG--	-----LE	SHIRNIWIQ	VGGPYDAALA	TN-----

图2D

	201			250
SEQ_ID_NO_1	--NYLRTSSP	SAVRARLDAN	RLAVAGHSMG	GGATLRISQ IPTLKAGVPL
SEQ_ID_NO_4	--NYLRTSSP	SAVRARLDAN	RLAVAGHSMG	GGGTLRIAEQ NPSLKAAVPL
SEQ_ID_NO_6	QVASLNGTSS	SPIYGVDTA	RMGVMGWSMG	GGGSLISAAN NPSLKAAAPQ
Q47RJ7	--DYMINDAS	SAVRSRIDSS	RLAVMGHSMG	GGGTLRLASQ RPDCLKAAIPL
CBY05529	--DYMINDAS	SAVRSRIDSS	RLAVMGHSMG	GGGSLRLASQ RPDCLKAAIPL
PZN61876	--NHMINRAS	STVRSRIDSS	RLAVMGHSMG	GGGSLRLASQ RPDCLKAAIPL
AAZ54921	--NHMINRAS	STVRSRIDSS	RLAVMGHSMG	GGGTLRLASQ RPDCLKAAIPL
BAK48590	--DYMLTDAS	SAVRNRIDAS	RLAVMGHSMG	GGGTLRLASQ RPDCLKAAIPL
A0A147KJY8	--DHMLNDAS	SAVRSRIDRN	RLAVMGHSMG	GGGTLRLASQ RPDCLKAAIPL
WP_083947829	--DHMVDGAS	STVRSRIDRN	RLAVMGHSMG	GGGTLRLASQ RPDCLKAAIPL
A0A4R6UW92	--DYLVEDST	SAVRNRIDPD	RLAAMGHSMG	GGGTLAVAAD RPELKAIIPL
A0A5Q2RDB8	--DYLADDSS	SAVQARLDDSS	RLAVMGHSMG	GGGSIEASSD RSSLKASIIPL
ACU97777	--DYLVERSD	RKVRERLDPN	RLAVMGHSMG	GGGSLEATVM RPSLKASIIPL
A0A561WKJ0	--DYLTGSSA	--VRTRIDAT	RLGVMGHSMG	GGGSLAASRT RPAQAAVPL
G0FYZ7	--DYLTQQSS	--VRSRIDST	RLGVVGHSMG	GGGTLEAARS RPTLQAAVPL
A0A0N0A0T6	--DYLTQQSS	--VRSRIDAT	RLGVMGHSMG	GGGTLRAASQ RPTLQAAIPL
A0A1W2C2B9	--DYLTQQSS	--VRTRIDSS	RLGVMGHSMG	GGGTLRAASQ RPSLQAAIPL
A0A2T0T7X1	--DYLTQRSA	--VRARIDAT	RLGVMGHSMG	GGGTLRAAAN RPAQAAIPL
A0A5Q0HE30	--DYLTQRSS	--VRTRIDNT	RLGVMGHSMG	GGGTLRAAEQ RPSLQAAIPL
A0A1Q4WZS7	--DYLTQRSS	--VRSRIDAS	RLGVMGHSMG	GGGTLRAAEQ RPAQAAIPL
A0A4R4NB20	--DYLTQRSS	--VRSRIDAS	RLGVMGHSMG	GGGTLEIAED RPQLQAAIPL
A0A1D8SZ57	--DYLTGRSS	--VREERIDSS	RLGVMGHSMG	GGGSLEAAKS RPSLQAAIPL
Q9L2J6	--DYLTGRSS	--VRGRIDSG	RLGVMGHSMG	GGGTLEAAKS RPSLQAAIPL
A0A089Z882	--DYLTQRSS	--VRGRVDAT	RLGVMGHSMG	GGGSLEAAKD RPSLQAAIPL
A0A1H9JKT6	--DYLTQRSS	--VRGRIDSG	RLAVMGHSMG	GGGSLEAAKD RPSLKAAIPL
A0A1Y5XYT9	--TYLTQRST	--VRTRIDAS	RLAVAGHSMG	GGGSLEAAAD QPTLQAAIPI
R4SZ25	--DYLTQRST	--VRSRIDTS	RLAVAGHSMG	GGGSLEAAQD RPSLQAAVPL
A0A1Q8CLB3	--DYLTQRSS	--VRGRIDAS	RLAVSGHSMG	GGGSLEATET RPSLQASVPL
U5W5F9	--DYLTTRSS	--VRTRVDAS	RLAVAGHSMG	GGGSLEAAKD RPSLQAAVPL
AAE13316	---FLPRGTS	---QANIDEG	KRLFALANQK	CPNTPVVAGG YSQGAALIAA

图2E

	251	300
SEQ_ID_NO_1	TPWHTDKTFN -TPVPQLIVG	AEADTVAPVS QHAIPFYQNL PSTTPKVYVE
SEQ_ID_NO_4	TPWHTDKTFN -TSVPVLIVG	AEADTVAPVS QHAIPFYQNL PSTTPKVYVE
SEQ_ID_NO_6	APWDSSTNFS SVTVPTLIIF	CENDSIAPVN SSALPIYDSM SRN-AKQFLE
Q47RJ7	TPWHLNKNWS SVRVPTLIIG	ADLDTIAPVL THARPFYNSL PTSISKAYLE
CBY05529	TPWHLNKNWS SVRVPTLIIG	ADLDTIAPVL THARPFYNSL PTSISKAYLE
PZN61876	TPWHLNKNWS SVTVPTLIIG	ADLDTIAPVA THAKPFYNSL PSSISKAYLE
AAZ54921	TPWHLNKNWS SVTVPTLIIG	ADLDTIAPVA THAKPFYNSL PSSISKAYLE
BAK48590	TPWHLNKSWS DITVPTLIIG	AEYDTIASVT LHSKPFYNSI PSPTDKAYLE
A0A147KJY8	TPWHLNKSWS NVQVPTLIIG	ADLDTIAPVL THAEFFYNSI PTSTRKAYLE
WP_083947829	TPWHLNKSWS NVQVPTLIIG	AENDTVAPVA LHAEPFYSYTSI PTSTRKAYLE
A0A4R6UW92	TPWHLNKTWS EVDVPTMIIG	AENDTVASVS SHSIPFYNSL SGAPDKVYLE
A0A5Q2RDB8	TPWHTRKTWS SVQVPTLVVG	AENDSVASTS SHAIPLYNGL PSSLDKAYLE
ACU97777	TPWNLDKTWG QVQVPTFIIG	AELDTIASVR THAKPFYESL PSSLPKAYME
A0A561WKJ0	APWHTTKSWS TDRVPTLIIG	AESDTVAPVA SHAEFFYTSL PSTLDKAYLE
G0FYZ7	TAWDLTKNWS TLQVPTLVVG	AQSDTVAPVA SHSIPFYTSL PSTLDRAYLE
A0A0N0A0T6	TAWHTTKNWS SVRVPTLVVG	AEDDSIAPVA THSEPFYTTL PSTLDKAYLE
A0A1W2C2B9	TGWHTTKNWS SVRVPTLVVG	AENDSVASVS SHSEPFYTSL PSTLDKAYLE
A0A2T0T7X1	TGWHTDKTWG DVRVPTLVVG	ADGDTIAPVA THSKPFYNSL PSSLDKAYLE
A0A5Q0HE30	TGWHTDKTWG SVRVPTLVIG	ADGDTIAPVS SHSEPFYTTL PSTLDKAYLE
A0A1Q4WZS7	TGWHTDKTWG SVRVPTLVVG	AENDSVASVS SHSIPFYNSL PSTLDKAYLE
A0A4R4NB20	TPWDLQKNFS DVRVPTMIIG	AEADTIAPVA THSKPFYTSI PASSEKAYLE
A0A1D8SZ57	TPWNLDKTWP EVSTPTLVVG	ADGDTIAPVA SHAEFFYSSL PSATDRAYLE
Q9L2J6	TPWNLDKSWP EVSTPTLVVG	ADGDTIAPVA SHAEFFYSSL PSSTDRAYLE
A0A089Z882	TPWNLDKTWS EVRTPTLIIF	ADGDTIAPVS SHAEFFYQNL PSSLDKAYLE
A0A1H9JKT6	TPWNLDKTWR EITVPTFIVG	ADGDSIASVR SHAEPFYESL PSSTDRAYME
A0A1Y5XYT9	AAWNTQKTWS TLRVPTFVIG	GESDSVAPVA SHSIPFYTSI PASAEKAYME
R4SZ25	APWNTQKSWS SLRVPTFIIG	GESDSVAPVA SHSIPFYTSI PATAEKAYME
A0A1Q8CLB3	APWNADKTWS SVRTPTFIIG	GESDSVASVS SHSIPFYQSI PAASEKAYME
U5W5F9	APWNTTKTWS GLQVPTLIIG	GESDTVAPVS SHSIPFYNSI PSSAEKAYLE
AAE13316	AVSELGSAVK EQVKGVALFG	YTQN---LQN RGGIPNY--- PRERTKVFCN

图2F

	301	350
SEQ_ID_NO_1	LDNATHFAPN SPNAA---IS VYTISWMKLW VDNDTRYRQF LCN---VND	
SEQ_ID_NO_4	LDNASHFAPN SNNAA---IS VYTISWMKLW VDNDTRYRQF LCN---VND	
SEQ_ID_NO_6	INGGSHSCAN SGNSNQALIG KKGVAWMKRF MDNDTRYSTF ACENPNSTRV	
Q47RJ7	LDGATHFAPN IPNKI---IG KYSAWLKRF VDNDTRYTQF LCPGPRDGLF	
CBY05529	LDGATHFAPN IPNKI---IG KYSAWLKRF VDNDTRYTQF LCPGPRDGLF	
PZN61876	LDGATHFAPN IPNKI---IG KYSAWLKRF VDNDTRYTQF LCPGPRDGLF	
AAZ54921	LDGATHFAPN IPNKI---IG KYSAWLKRF VDNDTRYTQF LCPGPRDGLF	
BAK48590	LDGASHFAPN ITNKT---IG MYSAWLKRF VDEDTRYTQF LCPGPRTGLL	
A0A147KJY8	LDGATHFAPN ITNST---IG MYSAWLKRF VDEDTRYTQF LCPGPRTGLF	
WP_083947829	LNGASHFAPS VANAT---IG MYGVAWLKRF VDEDTRYTRF LCPGPRTGLF	
A0A4R6UW92	LDGASHFAPN LSNTT---IA KYISWLKRF VDEDTRYSQF LCPGPSTGLG	
A0A5Q2RDB8	LDGASHFAPN SNNTT---IA AYISWLKRF VDNDTRYDQF LCG-PNHTAD	
ACU97777	LDGATHFAPN IPNTT---IA KYISWLKRF VDEDTRYSQF LC--PN-PTD	
A0A561WKJ0	LNNASHSAPT SANVT---VA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PAPSGS	
G0FYZ7	LRGASHFAPN SPNTT---IA KYTLWLKRF IDNDTRYEQF LC--PI PSTS	
A0A0N0A0T6	LNNATHFAPN SNNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PAPGRS	
A0A1W2C2B9	LNNASHFAPN SPNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PAPGRS	
A0A2T0T7X1	LRGATHFTPN SSNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PTPSSS	
A0A5Q0HE30	LNGATHFTPN TSNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PAPRG-	
A0A1Q4WZS7	LNGASHFAPN SSNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PSPANS	
A0A4R4NB20	LNGASHFAPN IANTT---IA KYISWLKRY IDNDTRYDQF LC--PGPSRD	
A0A1D8SZ57	LNNATHFSPN TSNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PLPRPS	
Q9L2J6	LNNATHFSPN TSNTT---IA KYISWLKRF IDDDTRYEQF LC--PLPRPS	
A0A089Z882	LNNATHFTPN SNTT---IA KYISWLKRF IDNDTRYEQF LC--PLPRPS	
A0A1H9JKT6	LNNATHFTPN TSNTT---IA KYISWLKRF VDNDTRYEQF LC--PLPRPS	
A0A1Y5XYT9	LDNASHFFPQ TPNTT---MA KYMISWLKRF VDNDTRYEQF LC--PAPN-D	
R4SZ25	LDNASHFFPN TANTT---MA KYTISWLKRF VDNDTRYEQF LC--PAPD-D	
A0A1Q8CLB3	LDGASHFFPN TPNTT---MA KYLISWMKRF VDNDTRYEQF LC--PPPN-D	
U5W5F9	LNNASHFFPQ STNTP---TG RQAVAWLKRF VDNDTRYDQF IC--PGPS-S	
AAE13316	VGDAVCTG-- -----TL IITPAHLSYT IEARGEARF LR-----	

图2G

	351					400
SEQ_ID_NO_1	PALSDFRSNN	RHCQ-----	-----	-----	-----	
SEQ_ID_NO_4	PALSDFRTNN	RHCQ-----	-----	-----	-----	
SEQ_ID_NO_6	SDFRTANCSL	EHHHHHH---	-----	-----	-----	
Q47RJ7	GEVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
CBY05529	GEVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
PZN61876	GEVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
AAZ54921	GEVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
BAK48590	SDVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
A0A147KJY8	SDVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
WP_083947829	SDVEEYRSTC	PF-----	-----	-----	-----	
A0A4R6UW92	SDVSDYRNTC	PV-----	-----	-----	-----	
A0A5Q2RDB8	RDISDYRSTC	PYSPVDPGDP	GDPGTPGGEC	VRTHTRNHVD	AGRATNVWGT	
ACU97777	RAIEEYRSTC	PY-----	-----	-----	-----	
A0A561WKJ0	-AIQEYRDTC	PHS-----	-----	-----	-----	
G0FYZ7	LSISDYRGNC	PHNG-----	-----	-----	-----	
A0A0N0A0T6	TLIEEYRDTC	PHS-----	-----	-----	-----	
A0A1W2C2B9	TLIEEYRDTC	PHS-----	-----	-----	-----	
A0A2T0T7X1	LLIAEFRGNC	PHSS-----	-----	-----	-----	
A0A5Q0HE30	AAIQEYRDTC	PHST-----	-----	-----	-----	
A0A1Q4WZS7	SLISDYRDTC	PHGV-----	-----	-----	-----	
A0A4R4NB20	LNISEYRDTC	PNS-----	-----	-----	-----	
A0A1D8SZ57	LTIEEYRGNC	PHGS-----	-----	-----	-----	
Q9L2J6	LTIEEYRGNC	PHGS-----	-----	-----	-----	
A0A089Z882	LTIEEYRGNC	PHTS-----	-----	-----	-----	
A0A1H9JKT6	LAIEEFRGNC	PH-----	-----	-----	-----	
A0A1Y5XYT9	REISDYRDTC	PHS-----	-----	-----	-----	
R4SZ25	RAISDYRDTC	PHA-----	-----	-----	-----	
A0A1Q8CLB3	SDIEEYRHTC	PHV-----	-----	-----	-----	
U5W5F9	SSISDYRNSC	PLT-----	-----	-----	-----	
AAE13316	---DRIRA--	-----	-----	-----	-----	

图2H

	401			435
SEQ_ID_NO_1	-----	-----	-----	-----
SEQ_ID_NO_4	-----	-----	-----	-----
SEQ_ID_NO_6	-----	-----	-----	-----
Q47RJ7	-----	-----	-----	-----
CBY05529	-----	-----	-----	-----
PZN61876	-----	-----	-----	-----
AAZ54921	-----	-----	-----	-----
BAK48590	-----	-----	-----	-----
A0A147KJY8	-----	-----	-----	-----
WP_083947829	-----	-----	-----	-----
A0A4R6UW92	-----	-----	-----	-----
A0A5Q2RDB8	AYAVGSGDNL	GSHSYFNYVS	LQSISSGGWTE	VSSCP
ACU97777	-----	-----	-----	-----
A0A561WKJ0	-----	-----	-----	-----
G0FYZ7	-----	-----	-----	-----
A0A0N0A0T6	-----	-----	-----	-----
A0A1W2C2B9	-----	-----	-----	-----
A0A2T0T7X1	-----	-----	-----	-----
A0A5Q0HE30	-----	-----	-----	-----
A0A1Q4WZS7	-----	-----	-----	-----
A0A4R4NB20	-----	-----	-----	-----
A0A1D8SZ57	-----	-----	-----	-----
Q9L2J6	-----	-----	-----	-----
A0A089Z882	-----	-----	-----	-----
A0A1H9JKT6	-----	-----	-----	-----
A0A1Y5XYT9	-----	-----	-----	-----
R4SZ25	-----	-----	-----	-----
A0A1Q8CLB3	-----	-----	-----	-----
U5W5F9	-----	-----	-----	-----
AAE13316	-----	-----	-----	-----

图2I

	相对于SEQ ID NO: 1的序列同一性%
SEQ ID NO:4	94
SEQ ID NO:6	42
Q47RJ7	55
CBY05529	56
PZN61876	56
AAZ54921	56
BAK48590	56
A0A147KJY8	55
WP_083947829	54
A0A4R6UW92	56
A0A5Q2RDB8	58
ACU97777	55
A0A561WKJ0	55
G0FYZ7	55
A0A0N0A0T6	57
A0A1W2C2B9	57
A0A2T0T7X1	56
A0A5Q0HE30	56
A0A1Q4WZS7	58
A0A4R4NB20	56
A0A1D8SZ57	54
Q9L2J6	54
A0A089Z882	55
A0A1H9JKT6	56
A0A1Y5XYT9	55
R4SZ25	55
A0A1Q8CLB3	55
U5W5F9	57
AAE13316.1	13

图3

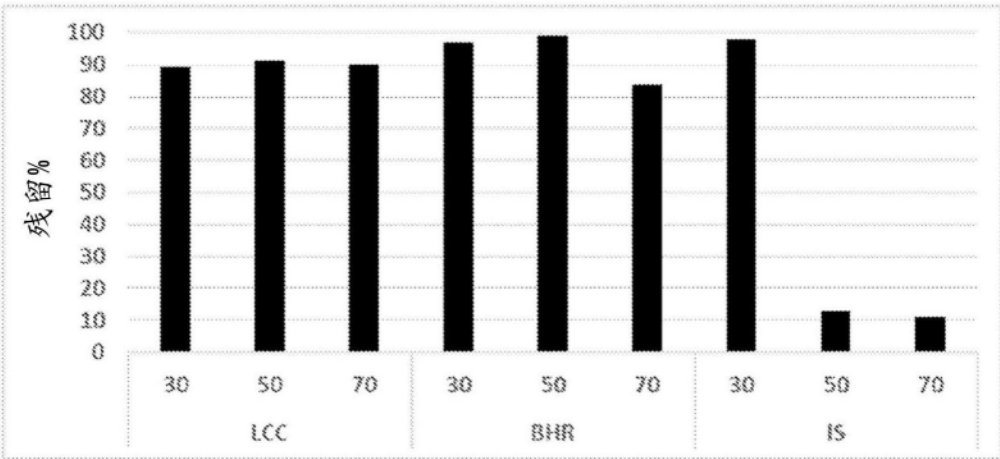


图4

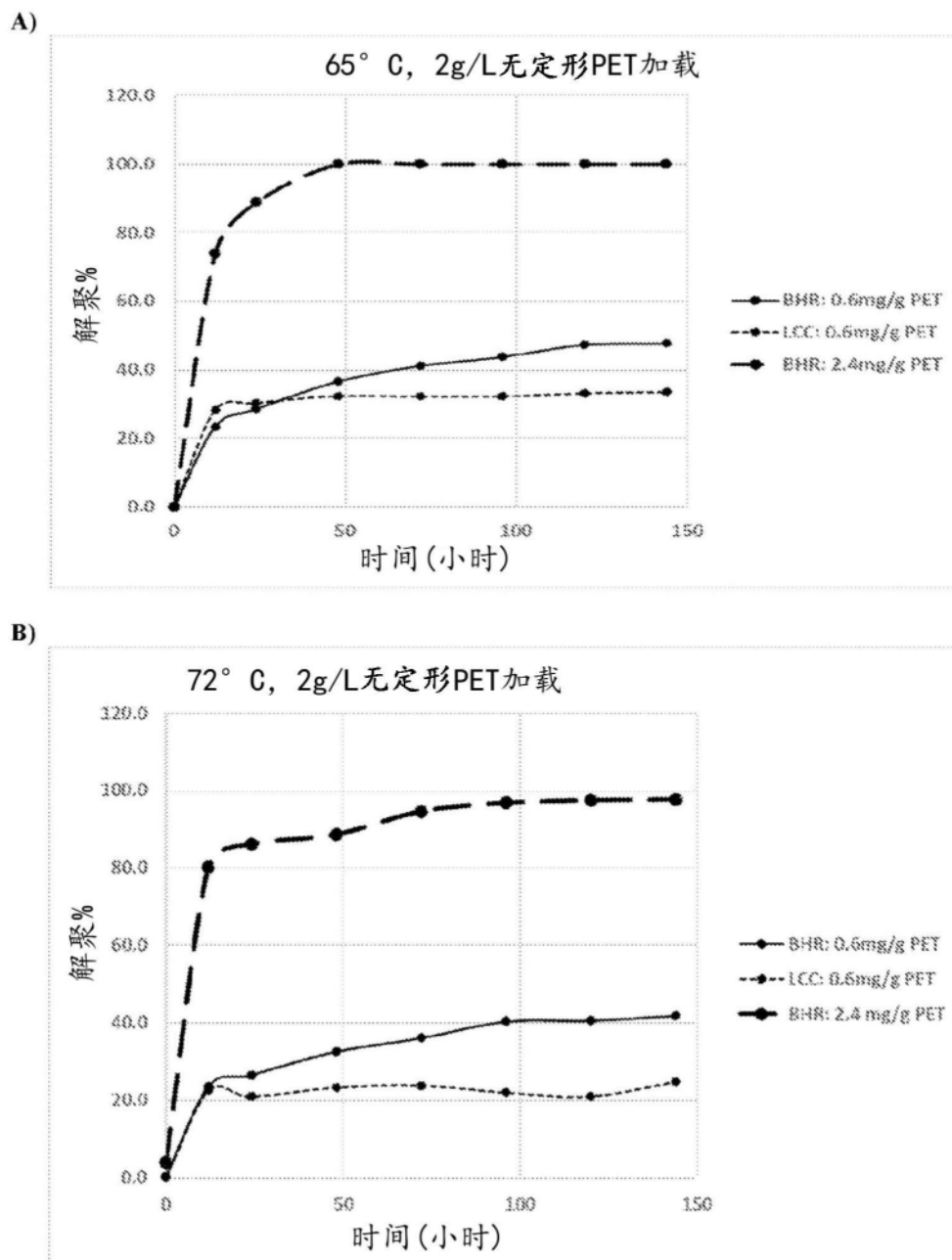


图5

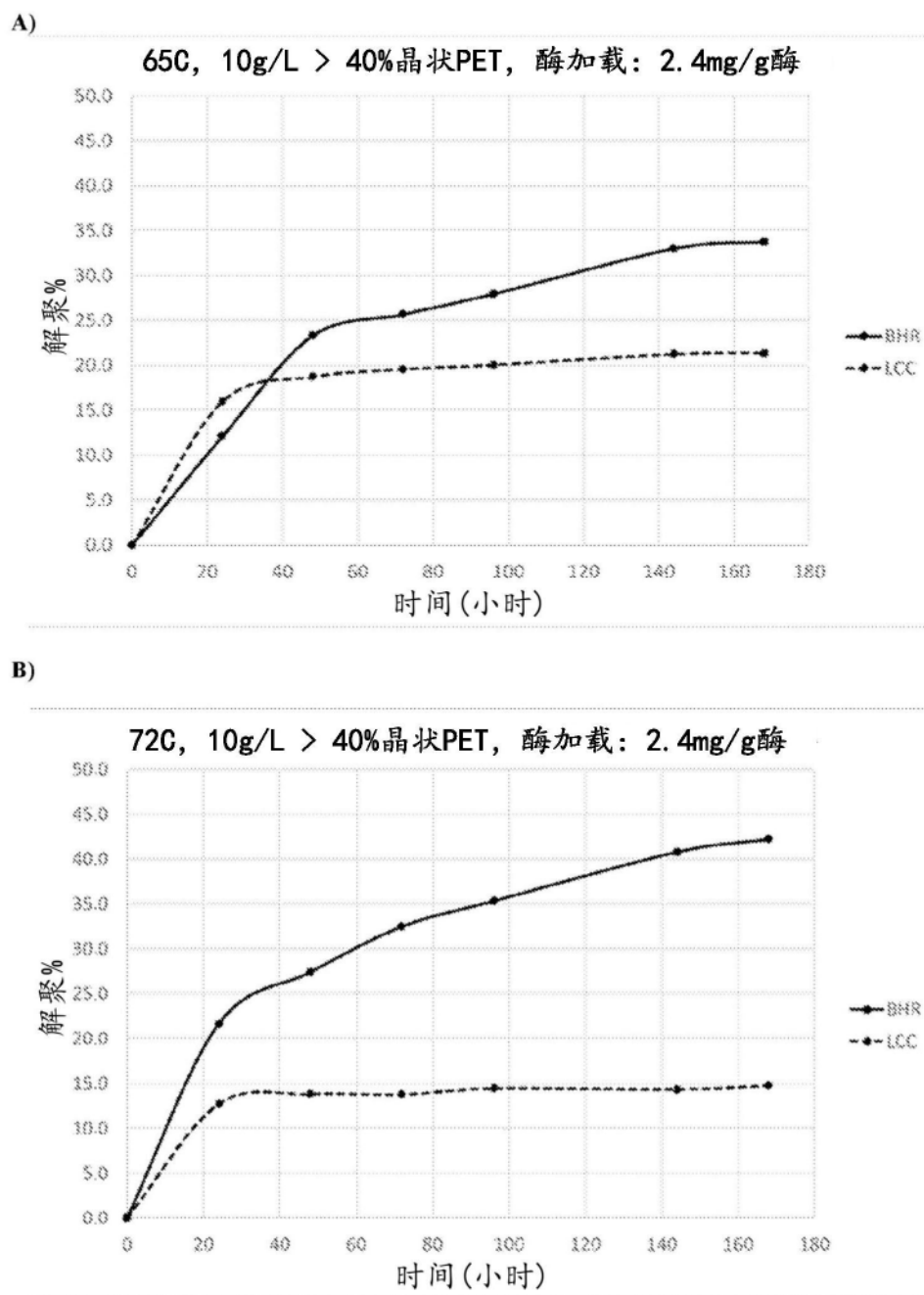


图6

菌落 追踪号	pH8.0、65° C、 72小时下相对 于G1P:PF的 总活性的改善	86° C、3小时继 之pH8.0、65° C、 72小时下相对 于G1P:PF的热稳定 性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00002082	1.09	1.60	T136A
ICL00002119	1.38	1.73	L90Y
ICL00002250	1.32	1.34	D158L
ICL00002407	1.09	1.35	F92G
ICL00002455	1.86	2.04	A127S
ICL00002587	1.67	1.50	F92L
ICL00002892	1.10	1.59	D158E
ICL00002957	1.20	2.00	D158I
ICL00003148	1.17	4.79	S212F
ICL00003268	2.23	2.96	N211F
ICL00003464	1.69	7.47	N211M
ICL00003521	2.11	3.17	N211V
ICL00003619	1.79	3.87	S212L
ICL00004007	1.34	1.66	S212M
ICL00004572	1.08	2.00	T136V
ICL00004599	2.52	3.03	S181R
ICL00004620	1.04	5.11	N211L
ICL00004701	2.79	3.51	S181C
ICL00004746	2.54	1.81	R251K
ICL00004960	1.30	10.50	D203R
ICL00005328	1.21	1.47	T17A/S27T/I82L/S252T
ICL00005456	1.35	1.10	T17A/S27T/T48S/I82L
ICL00005564	3.91	3.24	S27T/T48S/I82L/F92Y/S252T
ICL00005612	1.19	1.53	T17A/S27T/T48S
ICL00005678	1.50	1.35	T17A/S27T
ICL00005703	1.99	4.82	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S252T
ICL00005893	1.41	1.32	D18R/V40T/I139A/D203N
ICL00006174	1.55	2.69	D18R
ICL00007723	1.32	1.59	S32K
ICL00007799	1.71	1.07	T48S
ICL00007884	1.22	1.56	T25V
ICL00007898	1.20	1.18	V23T
ICL00007932	1.02	1.45	S27W
ICL00007957	1.01	1.06	S22I/Y26K
ICL00008145	1.52	1.13	V23L

图7A

菌落 追踪号	pH8.0、65° C、 72小时下相对 于G1P:PF的 总活性的改善	86° C、3小时继 之pH8.0、65° C、 72小时下相对于 G1P:PF的热稳定性 的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00008196	1.23	1.70	S27F
ICL00008216	1.17	1.41	A24V
ICL00008219	1.12	1.31	Y26L
ICL00008225	1.21	1.48	S22V
ICL00008265	1.46	1.57	S13R
ICL00008348	1.16	1.37	S22K
ICL00008461	1.09	1.30	A14K
ICL00008475	1.06	1.17	S32Q
ICL00008588	1.21	1.26	N9S
ICL00008962	1.07	1.09	P20T
ICL00008996	1.18	1.15	N2R
ICL00009048	1.19	1.37	S1A
ICL00009065	1.03	1.24	N9E
ICL00009097	1.80	3.36	S27L (G2P)
ICL00009224	1.13	1.30	Y26T
ICL00010754	1.35	1.01	N204S
ICL00010780	1.25	1.10	S193K
ICL00010882	1.33	1.44	V219L
ICL00010896	1.19	1.23	S193N
ICL00010936	1.01	1.23	N204K
ICL00010943	1.19	1.48	S193P
ICL00011142	1.20	3.14	R255L
ICL00011148	1.03	1.38	N231S
ICL00011374	1.14	1.29	S193H
ICL00011392	1.17	1.12	R255V
ICL00011544	1.07	1.29	A246D
ICL00011557	1.14	1.39	R255M
ICL00011716	1.17	1.63	Q189L
ICL00011873	1.09	1.73	S193E
ICL00012205	1.07	1.03	S98N
ICL00012227	1.63	1.23	S113K
ICL00012261	1.06	1.41	T160V
ICL00012306	1.01	1.20	N162R
ICL00012320	1.15	2.86	N87I
ICL00012326	1.12	1.90	N122E

图7B

菌落 追踪号	pH8.0、65° C、 72小时下相对 于G1P:PF的 总活性的改善	86° C、3小时继 之pH8.0、65° C、 72小时下相对于 G1P:PF的热稳定性 的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00012345	1.06	2.64	N87L
ICL00012356	1.13	1.18	S101K
ICL00012359	1.29	1.31	S101A
ICL00012402	1.30	1.17	Q142L
ICL00012403	1.23	1.21	A114K
ICL00012416	1.14	1.11	S101F/T136A
ICL00012464	1.19	1.24	S110R
ICL00012482	1.10	1.02	S98V
ICL00012493	1.14	1.80	T160K
ICL00012514	1.03	1.38	R108K
ICL00012584	1.27	1.39	S98L
ICL00012627	1.49	1.30	R108T
ICL00012633	1.14	1.34	N87V
ICL00012656	1.04	1.30	S113Q
ICL00012658	1.31	1.02	T109L
ICL00012662	1.15	1.33	R108H
ICL00012671	1.03	1.65	S101H
ICL00012729	1.09	1.45	N87H
ICL00012758	1.09	1.66	N87M
ICL00012801	1.01	1.16	T109K
ICL00012844	1.02	1.43	R108E
ICL00012857	1.06	1.26	S113A
ICL00012942	1.15	1.53	S98A
ICL00012974	1.11	1.09	N122A
ICL00013044	1.01	1.02	S101W
ICL00013060	1.20	1.28	N122S
ICL00013096	1.76	2.67	N87F
ICL00013100	1.23	2.22	Q142W
ICL00013155	1.01	1.47	T160R
ICL00013169	1.19	1.46	S98T
ICL00013185	1.10	1.04	S110G
ICL00013203	1.05	1.06	S101N
ICL00013205	1.60	1.17	N122P
ICL00013208	1.03	1.19	N87R
ICL00013211	1.07	1.65	S101Q

图7C

菌落 追踪号	pH8.0 、 65° C、72小时 下相对于 G1P:PF的总活 性的改善	86° C、3小时继 之pH8.0、65° C、 72小时下相对于 G1P:PF的热稳定性 的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00013218	1.05	1.32	S113R
ICL00013227	1.35	1.06	R108C
ICL00013243	1.43	2.00	N87Y
ICL00013247	1.37	1.27	R108Q
ICL00013314	1.19	1.40	R108S
ICL00013329	1.05	1.03	R108P
ICL00013378	1.12	1.06	N122H
ICL00013380	1.25	1.08	A114V
ICL00013386	1.18	1.67	S98E
ICL00013398	1.03	1.24	S113N
ICL00013405	1.33	1.41	I82F
ICL00013444	1.02	1.28	S98M
ICL00014454	1.20	1.05	T17L
ICL00014577	1.86	1.20	Y60H
ICL00014581	1.17	1.54	S252T
ICL00014863	1.05	1.08	T17C
ICL00014900	1.18	1.07	T17G
ICL00014910	1.29	1.26	T17S
ICL00014948	1.42	1.12	V229I

图7D

菌落追踪号	86° C、3小时继之 pH8.0、65° C、72小时 下相对于G1P:PF的 热稳定性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00003326	1.45	S181A
ICL00003543	1.45	T206G
ICL00003873	4.05	N211I
ICL00004073	1.89	D203V
ICL00004246	1.25	D158K
ICL00004507	2.03	A174K
ICL00004604	3.85	A174R
ICL00004797	5.11	E173R
ICL00005377	1.51	T17A/S27T/I82L
ICL00008040	1.07	S1M
ICL00008384	1.23	T25F
ICL00008521	1.08	S32M
ICL00008535	1.18	Y26K
ICL00008555	1.39	S34R
ICL00008628	1.18	S22R
ICL00008912	1.17	T25Q
ICL00008957	1.08	T25R
ICL00008972	1.39	T48N
ICL00011040	1.63	R236C
ICL00011072	1.83	A216P
ICL00011100	1.21	V219K
ICL00011261	1.14	N231L
ICL00011269	1.30	N231Q
ICL00011336	1.02	V219R
ICL00011353	1.02	F250Y
ICL00011377	1.44	Q189I
ICL00011563	1.15	I222L
ICL00011570	1.02	V219I
ICL00012235	1.49	T160Q
ICL00012311	1.70	N87K
ICL00012329	1.30	I82M
ICL00012335	1.32	S98Q/A209V
ICL00012728	1.05	K147N
ICL00012740	1.77	S101R
ICL00012777	1.01	S101D
ICL00013327	1.11	R108V

图8A

菌落追踪号	86° C、3小时继之 pH8.0、65° C、72小时 下相对于G1P:PF的 热稳定性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00013334	1.01	T160S
ICL00013955	1.03	T17A
ICL00014745	1.09	T17K/A125S
ICL00014884	1.36	T17Q

图8B

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00002273	1.68	F92V
ICL00002384	1.83	F92I
ICL00002394	1.31	R138L
ICL00002395	2.29	S57V
ICL00002398	2.10	M56I
ICL00002408	1.41	T136M
ICL00002426	1.77	S57M
ICL00002451	1.71	M56L
ICL00002454	1.47	A127V
ICL00002458	1.26	S88K
ICL00002463	1.17	T153L
ICL00002464	1.39	L70M
ICL00002490	1.19	T157A
ICL00002492	1.05	G149V
ICL00002511	1.34	L90K
ICL00002572	1.74	F92K
ICL00002575	1.50	V150L
ICL00002726	1.48	F92N
ICL00002830	1.35	A97F
ICL00002907	1.18	A55V
ICL00002926	1.16	T136S
ICL00003056	1.08	A102V/T136M
ICL00003247	1.19	T206P
ICL00003278	1.21	P179Q
ICL00003410	2.43	F208L
ICL00003475	1.29	V170L
ICL00003638	2.11	T206R
ICL00003718	1.62	T206L
ICL00003752	2.12	T206K
ICL00004309	1.03	A55L
ICL00004349	1.64	F208T
ICL00004360	1.17	F208G
ICL00004409	1.23	T157G
ICL00004439	1.24	S57I
ICL00004440	1.04	G149S
ICL00004447	1.47	F92Q

图9A

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00004493	1.02	I139T
ICL00004570	1.10	G149C
ICL00004663	1.13	R251I
ICL00004687	2.28	R251V
ICL00004709	1.10	F161W
ICL00004829	1.20	Q182T
ICL00004900	2.36	I217S
ICL00004929	1.06	F208R
ICL00004936	1.64	I185L
ICL00004989	1.14	I185Y
ICL00005005	1.31	P213R
ICL00005066	1.15	D249T
ICL00005133	1.61	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V/P213N/S252T
ICL00005159	1.88	T17A/S27T/L90F/F92Y/P213N
ICL00005170	1.43	T17A/S27T/T48S/A135G/Q167V/P213N
ICL00005175	1.46	T17A/S27T/L90F/A135G/S140A/Q167V/P213N/S252T
ICL00005183	1.13	T17A/T48S/P213N
ICL00005218	1.46	T17A/S27T/I82L/L90F/F92Y/Q167V
ICL00005240	3.46	T17A/T48S/I82L/F92Y/Q167V/S252T
ICL00005248	1.49	S27T/T48S/I82L/S140A/I143N/G149A
ICL00005327	1.14	T17A/S27T/I82L/T145S/G149A/P213N
ICL00005347	1.02	T17A/S27T/T48S/I82L/P213N/S252T
ICL00005408	1.07	T17A/Q167V
ICL00005428	3.20	T17A/I82L/F92Y/P213N
ICL00005493	2.02	T17A/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/Q167V
ICL00005494	1.45	S27T/I82L/P213N
ICL00005495	1.74	T17A/S27T/I82L/P213N
ICL00005508	2.19	T17A/I82L/L90F/F92Y/Q167V
ICL00005512	1.08	T17A/T48S/I82L
ICL00005528	5.36	T17A/S27T/T48S/L90F/F92Y
ICL00005536	1.55	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/Q167V
ICL00005568	1.65	T17A/I82L/L90F/F92Y/A135G/S140A/I143N/G149A/Q167V
ICL00005577	2.43	T17A/S27T/L90F/F92Y/A135G/Q167V/S252T
ICL00005594	1.04	T17A/S27T/T48S/P213N
ICL00005609	1.70	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/P213N/S252T

图9B

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00005649	1.35	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S/P213N
ICL00005661	1.42	T17A/S27T/I82L/P213N/S252T
ICL00005697	1.83	S27T/T48S/I82L/L90F/A135G/S140A/I143N/T145S/P213N
ICL00005699	1.34	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/S140A/T145S
ICL00005719	1.18	T17A/S27T/T48S/A135G/S140A
ICL00005720	1.06	T17A/S27T/I82L/G149A/Q167V/P213N
ICL00005732	1.25	T17A/I82L/S140A/I143N/Q167V/P213N/S252T
ICL00005743	1.38	T17A/S27T/T48S/T145S/Q167V
ICL00005745	2.06	T17A/S27T/T48S/I82L/L90F/F92Y/Q167V/S252T
ICL00005778	1.90	I82F/R108T/L119I/V150I/F161W/Q167T/T194S/D203N
ICL00005815	4.18	N9A/D18R/M56I/N85D/L119I/N254R
ICL00006031	1.13	R108T/L119I/K147Q/F161W/A184S/D203N
ICL00006249	1.51	T16E/D18R/M56I/K147Q/Q167T/A184S/D203N
ICL00006285	1.60	T16E/D18R/R108T/K147Q/Q167T/A184S/N190S/T194S
ICL00006354	2.63	Q5E/S22A/R72P/H77Q/F92Q
ICL00006389	1.21	T16E/D18R/S22A/V40T/A97G/S101L/L119I/A127M/Q167 T/D203N
ICL00006409	2.23	D18R/M56I/R72P/H77Q/F92Q/A127M/V150I/A184S/D203 N/N254R
ICL00006438	1.08	T16E/D18R/Y26T/S88T/S101L/H156N/V200L
ICL00006466	1.48	T16E/D18R/S22A/M56I/N85D/L119I/A184S
ICL00006472	2.11	T16E/D18R/V40T/S88T/L119I/A127M/V150I/D203N
ICL00006482	1.30	M56I/S88T/R108T/N190S/L227R
ICL00006522	3.10	N9A/S22A/G46S/M56I/R72P/F92Q/L119I/T221S/M225L
ICL00006530	2.26	A14S/L15I/S22A/F92Q/I143R/Q167T/V219K
ICL00006562	3.09	D18R/M56I/I139A/L227R/W228F
ICL00006566	2.95	S22A/I54V/R72P/F92Q/V150I/V200L
ICL00006581	1.09	S22A/G46S/S101L/F161W/D203N/R236E
ICL00006661	1.90	T16E/D18R/G53A/I54V/R72P/L119I/A127M/Q167T/V200 L
ICL00006710	3.67	D18R/I54V/I82F/R108T/V150I/N253Y/N254R
ICL00006743	2.42	T16E/D18R/M56I/N85D/S88T/R108T/F161W/Q167T
ICL00006771	1.71	G53A/R108T/Q167T/A184S/T194S/N243P
ICL00006790	1.90	N9A/S22A/Q167T
ICL00006811	2.84	T16E/D18R/M56I/A127M/R138E/T194S/V200L/M225L

图9C

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00006843	1.72	S22A/A97G/V150I/D203N/M225L/R236E
ICL00006877	3.91	D18R/I54V/M56I/R138E/I139A/T194S/D203N/V219K/F250I
ICL00006896	1.26	D18R/V40T/I82F/S101L/N105D/L119I/H156N/F161W/N190S/T194S/D203N
ICL00006914	2.47	N9A/V40T/L49G/I54V/R108T/V150I/D203N/T221S/M225L
ICL00006921	1.65	D18R/I54V/I82F/N105D/A127M/A184S/S218A/V219K/M225L/N241P/N243P
ICL00006928	1.73	L15I/D18R/R108T/R138E/I139A/F161W/A184S/N190S/D203N
ICL00006935	1.23	S22A/L49G/M56I/V83T/S101L/R108T/L119I/A127M/T194S
ICL00006942	1.94	M56I/I82F/R108T/I139A/F161W/T194S/D203N/N241P
ICL00006978	1.34	I143R/Q167T/V198A/W228F
ICL00006980	1.07	S22A/A24S/G46S/V150I/Q167T
ICL00006984	2.13	S88T/R108T/V150I/A184S/D203N/T221S/M225L/N243P
ICL00007007	1.65	Q5E/N9A/M56I/F92Q/R108T/L119I/Q167T/N253Y
ICL00007084	2.24	T16E/D18R/V40T/M56I/I82F/R108T/L119I/F161W/L227R/Q258P
ICL00007113	1.70	D18R/V40T/M56I/R108T/R138E/H156N
ICL00007179	1.57	D18R/M56I/R138E/I139A/N190S/D203N/M225L
ICL00007298	1.37	T16E/D18R/M56I/V150I/S218A/V219K
ICL00007465	1.48	T16E/D18R/S88T/R108T/W228F
ICL00007504	1.56	D18R/N85D/R108T/L119I/N190S/T194S
ICL00007604	1.35	D18R/G46S/M56I/R108T/A127M/R138E/I139A/N190S/L227R/W228F/R236E
ICL00007658	1.83	D18R/I139A/F161W/W228F
ICL00007805	1.15	G46L
ICL00007887	1.29	S1G
ICL00007890	2.02	S32Y/A62T
ICL00008057	1.08	S13L
ICL00008180	1.21	N9S/T25H
ICL00008192	1.35	R30K
ICL00008296	1.12	T25A
ICL00008309	1.25	V33T
ICL00008359	1.26	V33Q
ICL00008376	1.82	V33G
ICL00008393	1.15	A68F

图9D

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00008636	1.09	S27H
ICL00008936	1.28	S22P
ICL00009061	1.21	S1R
ICL00010801	2.21	V177A/A216L
ICL00010809	1.01	R255E
ICL00010811	1.01	S193V
ICL00010827	1.02	A246K
ICL00010831	1.01	R236K
ICL00010885	1.14	R255Y
ICL00010888	1.07	N204A
ICL00010945	1.17	S193F
ICL00010950	1.10	A246T
ICL00010970	1.25	N204R
ICL00010981	1.24	T194S
ICL00011066	1.08	V219F
ICL00011150	1.54	N204A/Q237R
ICL00011156	1.09	A216V
ICL00011159	1.06	T194G
ICL00011246	1.06	R255W
ICL00011384	1.09	R236Q
ICL00011413	1.58	R255S
ICL00011509	1.09	S193T
ICL00011585	1.02	R255G
ICL00011635	1.08	A216S
ICL00011679	1.34	S223A
ICL00011733	1.40	Q189V
ICL00011827	2.22	A246S
ICL00011919	1.04	V242T
ICL00012070	1.47	S223C
ICL00012171	1.31	A117N
ICL00012175	1.20	N122R
ICL00012281	1.10	R108N
ICL00012342	1.15	S101V
ICL00012400	1.81	N162E
ICL00012534	1.35	T109F
ICL00012591	1.03	T109R

图9E

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00012596	1.14	A117Q
ICL00012912	1.21	K147F
ICL00012929	1.22	A117G
ICL00012941	1.02	S110H
ICL00012945	1.22	L74W
ICL00013009	1.25	S113Y
ICL00013089	1.30	A117S
ICL00013150	1.33	S98D
ICL00013160	1.12	K147G
ICL00013170	1.09	P164S
ICL00013172	1.24	N162H
ICL00013228	1.26	S113T
ICL00013231	1.28	S101M
ICL00013248	1.03	T109N
ICL00013251	1.30	A121S
ICL00013266	1.06	A114S
ICL00013343	1.08	A114L
ICL00013423	1.12	N87W
ICL00013433	1.08	S113P
ICL00013476	1.56	N162P
ICL00013866	1.01	V229C
ICL00013929	1.16	A125S
ICL00014084	1.95	Y60A
ICL00014177	1.30	Y60I
ICL00014360	2.06	T163S
ICL00014465	1.21	T17H
ICL00014486	1.04	L119M
ICL00014565	1.01	R12K
ICL00014609	2.12	T195F
ICL00014700	1.16	F21W

图9F

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00024094	1.56	L90F/F92G/D158L/A174R/D203V
ICL00024108	1.69	V23L/A24V/S32K/N87F/F92Y/A125S/T136A
ICL00024121	2.61	P20T/L90Y/F92L/S101M/D158E/A174K/I222L
ICL00024155	1.32	D18R/S32K/Y60H/L90F
ICL00024157	2.22	P20T/F21W/A24V/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136A
ICL00024167	1.91	Y60H/S101A/A114K/A117Q/D203R/I222L
ICL00024241	1.41	S32Q/F92G/S101Q/A114K/Q142W/D158I/D203R/I222L
ICL00024247	1.26	T17G/L90F/F92L/T109R/A114K/D158E/D203V/I222L
ICL00024297	1.49	R12K/S32K/F92L/T136A/D158E/A174R
ICL00024334	2.11	L90F/F92G/T109K/A125S/A174K
ICL00024335	1.96	S32K/L90F/F92L/T109K/A114K/Q142W
ICL00024354	1.20	V23T/S32Q/N87I/L90F/F92Y/S101N/A114V/Q142W/A174R/D203R/I222L/V229I
ICL00024372	2.46	S32Q/F92G/A114V/D203V
ICL00024388	2.67	R12K/S32K/L90Y/F92L/T136A/A174K/D203V/I222L
ICL00024391	3.17	R12K/A14K/V23T/L90Y/F92G/S101A/D203R
ICL00024401	2.75	T17G/S32M/L90Y/F92Y/D203R/A216P
ICL00024406	1.70	S32Q/F92L/A114V/A125S
ICL00024416	2.18	P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/A114K/A125S/T136V/D158E/A174K/D203V/I222L
ICL00024437	1.34	R12K/F21W/S32K/F92L/T109K/A125S/T136V/D158E/D203R
ICL00024448	3.00	T17Q/L90Y/F92L/A174K/D203V/I222L
ICL00024524	1.43	F21W/F92L/S101A/A117Q/D203R
ICL00024546	1.26	T17A/S32M/Y60H/Q142L/D203V/I222L
ICL00024565	2.14	R12K/Y60H/L90F/S101R/A114V/A117N/D158E
ICL00024581	1.77	T17S/D18R/L90Y/F92G/A114V/A117Q/D203R
ICL00024595	1.58	L90Y/F92L/S101A/S110R/A125S/Q142W/A174R/A216P
ICL00024600	1.07	S32M/S110R/A125S/D158E
ICL00024625	2.14	R12K/V23L/A24V/F92G/T136V/D203R
ICL00024627	3.74	A24V/S32Q/F92L/T136V
ICL00024632	3.27	S32K/L90Y/F92G/A114K/D203V
ICL00024661	1.68	S32M/L90F/F92G/A114V/A117N/A125S/A174K/D203R
ICL00024669	1.20	R12K/T17A/V23L/A24V/L90F/F92G/S101N/A125S/Q142W/D158I/D203R
ICL00024670	1.23	P20T/F21W/Y60I/S101A/T109K/A174K
ICL00024675	1.41	T17C/L90Y/F92L/S101N/T109L/S110R/A125S/A174K/D203R

图9G

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00024684	2.91	T17Q/L90F/F92G/S101M/A117Q/T136A/D158I/A174R
ICL00024718	3.31	V23L/L90F/F92G/A125S/D203V/I222L
ICL00024772	3.93	T17C/L90Y/F92L/A125S/T136V/D158E/A174K
ICL00024785	1.32	V23L/S32Q/Y60I/A117Q/T136A/A174K/V229C
ICL00024799	3.23	V23T/L90F/F92Y/D203V
ICL00024813	2.12	R12K/A24V/Y60H/A174R
ICL00024825	1.10	T17G/P20T/Y60I/F92G/D203V
ICL00024839	2.67	L90Y/F92L/S110R/A125S/D158E/D203V
ICL00024847	2.79	T17Q/L90Y/F92L/T109L/T136A/D158E/A174R/D203V/V229C
ICL00024914	2.33	R12K/V23T/A24V/S32Q/F92G/D158L/A174R/D203R
ICL00024925	2.71	S32M/N87Y/L90F/F92G/A174K/D203V
ICL00024934	1.41	T17S/V23L/S32Q/L90F/F92L/A114K/A117N/A125S/T136V/D158E/D203V/V229I
ICL00024942	2.77	P20T/F21W/S32M/L90Y/F92G/T109L/S110R
ICL00024943	2.49	A14K/S32M/L90Y/S101R/A114V/T136A/A216P
ICL00024962	2.43	P20T/F21W/L90Y/F92G/A125S/A174K/V229I
ICL00024966	1.60	V23L/S32K/L90F/F92L/S101R/T109R/T136V/I222L
ICL00025010	2.36	A24V/F92L/Q142L/A216P
ICL00025986	2.67	F92G/A125S/T136A/D158E/A216P
ICL00026026	1.62	N87R/F92G/A117N/D203V/A216P
ICL00026034	1.10	R12K/A14K/F92G/S110R/A117N/A125S/A174R/D203R
ICL00026058	2.38	S32Q/N87F/L90F/F92G/S101M/A114V/A117Q/D203V
ICL00026071	1.79	T17Q/A24V/N87M/F92G/A114K/A117N/D158E/D203R/I222L
ICL00026072	1.95	N2R/S32Q/L90F/F92G/Q142L/D203V
ICL00026095	1.55	A14K/S32Q/L90F/F92G/A114K/A117N/A174R/D203V/A216P/I222L
ICL00026110	1.08	R12K/P20T/D158E/D203R/I222L
ICL00026111	1.82	N2R/A14K/T17A/L90F/F92G/S101H/A174R/D203V
ICL00026144	3.04	T17G/A24V/L90F/F92G/Q142W
ICL00026159	3.27	S32K/L90Y/F92Y/S101A
ICL00026164	3.13	V23T/N87I/F92G/A125S/T136A/D158L/D203R

图9H

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G1P:PF的总 活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00026166	1.15	T17S/N87L/V229I
ICL00026190	1.83	A24T/L90F/F92L/A125S/T136A/D203V
ICL00026191	2.53	R12K/A14K/F92G/T109R/T136A/Q142L/D158E/A174K/D 203R/I222L
ICL00026196	2.15	A24V/S32Q/Y60A/T136A
ICL00026232	1.32	D18R/S32Q/N87H/L90Y/F92G/S101K/Q142L/D158I/A174 R
ICL00026236	2.64	T17A/F21W/S32K/N87F/L90F/F92Y/S101Q/T136A/D203R
ICL00026238	2.36	A24V/L90F/F92G/A114V/A117N/T136V/Q142L/D203V/V 229C
ICL00026256	2.62	T17Q/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/T136V/Q142L/D2 03V/A216P
ICL00026306	3.43	S32Q/L90Y/F92L/T109K/A125S/T136V
ICL00026310	1.87	Y60H/N87K/A114K/A117Q/D158E/A174K/A216P
ICL00026327	1.54	P20T/L90Y/T109K/T136A/D158I/D203R
ICL00026342	2.37	T17L/Y60A/D203V
ICL00026344	2.55	N2R/S32Q/L90Y/F92Y/T109K/D203V
ICL00026349	1.35	T17H/A24V/S32Q/L90Y/F92L/S101H/A114K/D158I/A174 R/D203V
ICL00026353	1.30	N2R/S32M/F92Y/T109K/S110R/I222L
ICL00026354	1.44	P20T/F92Y/S101K/A125S/D158E/D203R
ICL00026368	1.56	R12K/A14K/P20T/F21W/S32M/F92L
ICL00026393	1.42	R12K/A14K/V23T/A24V/L90F/F92L/S101W/T136A/D203 V
ICL00026466	2.15	T17L/S32K/F92L/T109L/A114V/T136V/D158L/R236H
ICL00026476	2.25	P20T/F21W/S32Q/N87F/F92L/D158E/D203V
ICL00026496	2.81	F21W/L90F/F92G/S101A/A114V/A125S/T136V/Q142L/D2 03V/A216P
ICL00026534	1.94	P20T/F21W/S32K/F92G/A125S/V229I
ICL00026535	2.53	V23T/A24V/L90Y/F92G/A125S/T136V/D203V
ICL00026552	1.99	P20T/S32K/L90Y/F92G/S101N/T109L/S110R/A125S/A174 K/D203R/A216P
ICL00026561	1.57	V23L/L90F/F92L/T136A/D203R/I222L
ICL00026618	3.01	R12K/A14K/A24V/N87L/L90Y/A125S/T136V/A216P
ICL00026643	1.55	P20T/F21W/L90Y/A125S
ICL00026671	1.44	N2R/L90Y/A114K/A117Q/D203V/V229I
ICL00026673	1.56	F21W/S32K/L90Y/A125S/D158E/A216P/V229I

图9I

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00015105	1.35	S27L/T136V
ICL00015156	1.03	S27L/P8T/T17Q/F21W/S101A/T136V/Q142L
ICL00015324	1.02	S27L/N2R/T17L
ICL00015579	1.11	S27L/V23T/A24V/T136A/Q142W
ICL00015633	1.11	S27L/F21W/T136V
ICL00015643	1.31	S27L/T17Q/T109K/A114K/T136V/V229I
ICL00015653	1.19	S27L/T17Q
ICL00015773	1.42	S27L/T136V/I222L/V229C
ICL00015796	1.36	S27L/T17A/A114V/A117N/T136A
ICL00015830	1.07	S27L/N2R/T136A
ICL00015846	1.02	S27L/N2R/T17A
ICL00015853	1.16	S27L/T17C/S101A/T136V
ICL00015873	1.04	S27L/P20T/T136A
ICL00015972	1.12	S27L/T136V/Q142W/V229I
ICL00016002	1.05	S27L/T109K/T136V/I222L/V229I
ICL00016095	1.01	S27L/T17L/S101H/A117N/Q142L/I222L/V229I
ICL00016114	1.22	S27L/S101Q/T109L/A117N/T136A/Q142L
ICL00016342	1.03	S27L/T109K/S110R/S193N/S252T/R255M
ICL00016399	1.19	S27L/S22R/Y26K/R236Q
ICL00016411	1.67	S27L/L90F/F92L/S98E/S113Y/A114K/T136A/D158E/S181R/T206G/S212M/V219I
ICL00016478	1.55	S27L/N9S/S22P/T48N/L90Y/F92G/T109K/S110R/T136A/Q189V/N211F/R236Q
ICL00016797	1.02	S27L/T17A/Y26L/T48N/I82M/S101D/R236Q
ICL00016852	1.24	S27L/Y26T/S101D/D158E/V219I/S252T
ICL00016862	1.36	S27L/S13R/S98E/T136V/S181R/T206G/V229I/N231S
ICL00016937	1.36	S27L/F21W/F92L/S98N/S193P/I222L
ICL00017036	1.46	S27L/S1G/Y26K/L90Y/S113Y/A114V/T136A/Q189V/N204R/N211L/R236Q
ICL00017369	2.59	S27L/S22K/I82L/L90Y/F92G/R108S/A117N/D158E/S193N
ICL00017517	1.33	S27L/S1G/N9S/T48S/L90Y/S98T/S101A/S113N/A114K/L119M/S193N/T206G/S252T
ICL00017595	1.12	S27L/N9E/R12K/S22P/V23L/T160R/D203R/I222L
ICL00017708	1.12	S27L/N9E/R12K/S22P/V23T/T48S/S98E/R108S/T160S/Q189V/T206G/S212L/V229I

图9J

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00017714	1.45	S27L/S1A/N2R/N9S/T48N/L90F/F92L/D203V/S223A
ICL00017757	2.78	S27L/N9E/R12K/V23T/I82M/L90Y/F92L/T136V/N204K/N 231S/R255M
ICL00017873	1.49	S27L/S1G/N9S/S22V/I82F/L90Y/F92L/A117N/L119M/Q14 2L/T206G/S212L/S223A
ICL00017905	1.55	S27L/N9S/Y60H/R108C/S193P/V219L
ICL00017934	1.47	S27L/N9E/S22K/S32M/L90F/F92G/R108T/L119M/Q189V/ I222L/S223A/R236Q
ICL00017976	1.39	S27L/T17Q/F92G/S98N/Q142L/Q189L/R236C
ICL00018033	1.50	S27L/N9E/R12K/Q142W/T160Q/T206G/S212M
ICL00018093	1.39	S27L/Y26T/S113N/A114V/T136A/D158E/D203R/N211F/R 236Q/S252T/R255M
ICL00018101	2.45	S27L/S1A/T17H/S22V/L90Y/F92G/S98E/A114V/T136A
ICL00018188	1.97	S27L/N9E/T48S/I82M/L90Y/F92L/N122A/A127S/T160S/A 174R/T206G/S212L/R255M
ICL00018404	1.57	S27L/N9S/S22P/V23L/L90Y/F92G/A125S/T160S/N204R/I 222L/S223A/R236Q
ICL00018431	1.14	S27L/N9E/S22P/T48S/L90Y/F92L/T109R/E173R/A174K/D 203V/S223A
ICL00018459	1.25	S27L/R12K/Y26K/T48N/I82L/L90F/A125S/N211I/A216P
ICL00018572	1.39	S27L/N9S/R12K/F92Y/T109K/S110R/T160K/Q189L/S223 A/S252T/R255M
ICL00018576	1.01	S27L/S1A/N2R/N9E/R12K/S32K/N87F/R108T/N211I/V21 9K/R255M
ICL00018627	1.05	S27L/L90F/F92G/N122A/T136A/T160V/E173R/D203R/S2 52T
ICL00018644	2.41	S27L/L90Y/F92G/S98T/T109L/D158I/S193K/V219K/R236 Q/S252T
ICL00018837	1.15	S27L/N9E/R12K/T48N/L90F/S98L/R108Q/A117Q/T136A/ T206G/S212F/V219I/V229I/R255L
ICL00018957	1.19	S27L/S1A/S22V/N87K/R108K/N122E/D158E/S193P/V219 I/R255M
ICL00019051	1.05	S27L/F21W/Y26T/S34R/R108H/L119M/N211M/R236C/S2 52T
ICL00019281	2.22	S27L/S1A/N9E/R12K/V23T/T48S/N87H/S101Q/Q189L/N2 11M/V219I/R236Q/R255M
ICL00019296	1.99	S27L/N9S/T25Q/L90Y/S101D/T136A/Q142L/Q189L/R236 Q
ICL00019312	2.68	S27L/A14K/I82F/F92G/S98E/R108C/A117N/L119M/Q189 V/T206G/I222L/S223A

图9K

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00019341	2.33	S27L/T17C/Y26T/N87V/R108C/N122E/T136V/S193P/S25 2T/R255M
ICL00019489	2.81	S27L/L90Y/F92G/T109L/N122S/R255M
ICL00019574	1.37	S27L/R12K/L90Y/T160V/A174R/R236Q
ICL00019589	1.04	S27L/N9E/R12K/T48N/L90Y/F92G/S98T/S113R/N122R/A 127S/T136A/A174K/N204K/S212L
ICL00019618	1.61	S27L/V23T/L90Y/F92G/S98E/T109L/A125S/T160V/A174 K/S181C/S193K/T206G/S212M/R255M
ICL00019634	1.03	S27L/A24V/F92G/S101D/A114V/A117N/A125S/T136V/D 203R
ICL00019661	1.12	S27L/R12K/S32Q/S101Q
ICL00019736	1.70	S27L/L90F/F92G/T136V/A174R/D203R
ICL00019743	1.27	S27L/P20T/S32K/L90Y/D203V
ICL00019873	1.19	S27L/N2R/A14K/T17S/L90Y/T109K/T136V/A216P
ICL00019890	1.19	S27L/N2R/V23T/A24V/S32M/L90Y/F92G
ICL00020004	1.65	S27L/A14K/L90Y/F92L/S101D/A117N/D158I/D203R
ICL00020035	1.37	S27L/F21W/N87H/A114V/A117N/T136V
ICL00020130	1.19	S27L/N2R/V23T/A24V/N87M/F92L/S101K/A125S/T136A
ICL00020240	1.24	S27L/L90Y/F92L/S101N/T109R/S110R/Q142W
ICL00020265	1.45	S27L/S32M/F92G/A216P
ICL00020456	1.46	S27L/F21W/L90Y/F92L/A114K/A117N/T136A/D203V
ICL00020806	1.09	S27L/N2R/V23T/S32M/N87M/F92L/T136A
ICL00020830	1.93	S27L/R12K/L90F/F92G/S101A/D203V
ICL00020832	1.82	S27L/A24V/L90F/F92G
ICL00020874	1.36	S27L/R12K/F92L/S101A/A125S/T136A/D203R
ICL00021047	1.18	S27L/R12K/V23L/L90F/F92L/A114K/T136A/D158E/D203 V/I222L
ICL00021082	1.68	S27L/L90F/F92G
ICL00021198	1.17	S27L/T17L/L90F/F92G/A125S/A174R/D203V
ICL00022077	1.37	S27L/N2R/N87K/A114K/A117Q/T136V/D203V
ICL00022293	1.11	S27L/N2R/A114K/T136V/D203V
ICL00022297	1.32	S27L/N2R/T17A/T136V/A216P
ICL00022389	1.33	S27L/N2R/R12K/N87F/T136V/D158E/A174R
ICL00022421	1.38	S27L/D203R
ICL00022429	1.38	S27L/R12K/T17Q/T136V/D203V/A216P

图9L

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00022507	1.69	S27L/N87F/T109L/Q142L
ICL00022559	1.02	S27L/N2R/T17Q/A24V/A114K/A117Q/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L
ICL00022567	1.07	S27L/N2R/P20T/F21W/N87M/T109R/A117N/A125S/T136V/D203V/I222L
ICL00022638	1.44	S27L/V23T/A24V/T136A/D158E/A174K/D203V/I222L
ICL00022671	1.03	S27L/R12K/V23L/A114K/T136A/D158I/D203V/I222L
ICL00022776	1.77	S27L/N87Y/T136V/D158E/D203V
ICL00022809	1.08	S27L/T109K/S110R/D203R
ICL00022817	1.06	S27L/N2R/T17L/A125S/T136A/D158E
ICL00022909	1.13	S27L/A24V/D158E/A174K/A216P
ICL00022974	1.06	S27L/T17G/V23L/N87L/A117Q/A125S/T136V/D158E/V229C
ICL00022977	2.32	S27L/V23L/N87L/T109R/A114K/A117N/A125S/T136V/Q142L
ICL00023114	1.63	S27L/N87Y/S101A/A114V/A117Q/T136V/A174K/A216P/I222L
ICL00023130	1.21	S27L/R12K/T109R/Q142L
ICL00023421	1.09	S27L/D203V
ICL00023612	1.48	S27L/T17G/N87F/S101A/D203V
ICL00023655	1.06	S27L/T17L/N87M/Q142L/D203V
ICL00023715	1.05	S27L/N2R/R12K/S101D/A117N/T136A/D203V
ICL00023819	1.23	S27L/R12K/P20T/F21W/A114K/Q142W/D203R
ICL00023836	1.01	S27L/N2R/T17G/T109L/S110R/A114K/A117Q/T136V/Q142L/D203R
ICL00023911	1.06	S27L/N2R
ICL00026699	1.58	S27L/S32K/L90F/F92G/S101M/A114V/A117N/A125S/T136A/D158E/D203V
ICL00026739	1.83	S27L/R12K/T17A/F21W/S32Q/Y60H/D203R
ICL00026757	2.05	S27L/R12K/F92L/S110R/T136V/I222L
ICL00026766	2.38	S27L/A14K/V23T/A24V/L90Y/F92G/A114V/A117Q/Q142L/A174R/I222L
ICL00026785	1.37	S27L/F21W/S32Q/L90Y/S101D/T109K/A125S/T136A/A174K
ICL00026858	2.42	S27L/V23T/L90Y/F92G/T136A/D203V/A216P
ICL00026885	3.31	S27L/T17S/L90Y/F92G/A117N/T136A/D158L
ICL00026903	1.12	S27L/A14K/V23L/A24V/F92L/Q142W/D203V
ICL00026906	2.14	S27L/T17L/L90F/F92G/S101K/A174K

图9M

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00026952	1.01	S27L/L90F/F92L/A125S/T136V/A174K/D203V/A216P/I222L
ICL00026975	1.69	S27L/R12K/P20T/S32M/L90F/F92G/S101M/A114V/D203V
ICL00027010	1.35	S27L/T17A/S32Q/L90F/F92L/T136V/Q142W/A174K/D203R
ICL00027020	1.34	S27L/R12K/S32M/L90F/F92G/S101W/A114V/D158I/I222L
ICL00027052	2.34	S27L/P20T/S32M/L90Y/F92L/A114V/A117N/I222L
ICL00027066	2.07	S27L/T17C/L90Y/F92G/T136A/A174K/D203V
ICL00027067	1.30	S27L/S32Q/N87Y/F92G/T109K/A114K/A117N/T136V/D203V/V229C
ICL00027073	1.83	S27L/F21W/L90F/F92G/T136V/A174R
ICL00027087	1.05	S27L/P20T/N87Y/T136A/D203V/I222L
ICL00027091	2.27	S27L/A24V/L90Y/F92L/D158I/A174K/D203R/I222L
ICL00027102	1.56	S27L/F21W/S32Q/L90Y/S110R/A114K/T136V/D203R/A216P/V229I
ICL00027186	2.19	S27L/N87H/F92G/D203R
ICL00027190	1.15	S27L/R12K/S32K/Y60A/A125S/T136V/D158L
ICL00027212	1.45	S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92L/T136A
ICL00027275	1.25	S27L/F92L/A114V/D158E/D203R
ICL00027329	1.73	S27L/S32Q/L90Y/D203V/V229I
ICL00027330	1.07	S27L/V23T/S32Q/Y60H/T109K/T136V/A216P/I222L
ICL00027332	1.05	S27L/A14K/A24V/L90F/F92G/T109K/T136V/D158L/A174R/D203V/I222L/V229I
ICL00027420	1.48	S27L/R12K/N87F/A174K
ICL00027421	1.46	S27L/P20T/S32Q/Y60H/T109K/A114V/T136A/A174K
ICL00027432	1.04	S27L/V23T/A24V/Y60A/A125S/A174R/A216P
ICL00027436	1.84	S27L/F92Y/D158L/I222L
ICL00027502	1.54	S27L/V23L/A24V/L90Y/F92G/D203V/I222L
ICL00027545	1.24	S27L/V23T/A24V/S32Q/L90F/F92G/S101H/T136A/A174K/D203V/V229C
ICL00027572	1.12	S27L/S32K/N87H/A125S
ICL00027600	1.61	S27L/P20T/F21W/F92G/A114V
ICL00027601	1.83	S27L/T17L/V23L/A24V/L90Y/F92L/A117N/T136V/L137M/Q142L
ICL00027603	1.74	S27L/P20T/L90Y/D203R
ICL00027613	1.13	S27L/S110R/Q142L/D158I/D203R/V229I
ICL00027615	1.01	S27L/P20T/S32Q/L90F/F92L/T109K/S110R/A125S/D203V

图9N

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00027619	1.87	S27L/V23T/A24V/L90F/F92G/D158E/D203R
ICL00028399	1.49	S27L/F92G/T136A/A174R/D203V/V229C
ICL00028473	1.26	S27L/P20T/L90Y/F92G/T109R/S110R/A125S/D203R
ICL00028524	1.61	S27L/A14K/L90Y/F92L/D158L/A174R/D203V
ICL00028530	1.25	S27L/F21W/S32Q/L90Y/F92G/T109L/S110R/A117N/D158 I/A174K/D203V
ICL00028665	1.33	S27L/R12K/A114K/A117N/D158E/D203V
ICL00028670	1.05	S27L/T17S/N87H/T109R/A114K/A117N/T136V/Q142W/D 203V
ICL00028711	1.06	S27L/N2R/N87Y
ICL00028716	1.03	S27L/T17S/V23T/A24V/S32Q/Y60H/N87K/T136A/D203R
ICL00028725	1.49	S27L/P20T/F92Y/T109K/D158E/D203V
ICL00028798	1.18	S27L/S32K/N87M/F92L/S101M/T109L/S110R/D203V
ICL00028833	2.82	S27L/L90Y/F92G/T136A/D158E/D203V/A216P/V229I
ICL00028865	1.71	S27L/A14K/S32M/F92L/A125S
ICL00028868	2.86	S27L/L90Y/F92G/T136V/D158L/D203V
ICL00028895	2.18	S27L/A24V/L90Y/F92G/S101A/T109L/S110R/A117Q/A17 4R/D203R
ICL00028917	1.93	S27L/P20T/S101D/A114V/T136V/Q142W/D158E/D203R/ A216P
ICL00028920	1.34	S27L/N87Y/F92G/S101Q/A114K/A117N/T136A/D158L/D 203R/A216P
ICL00028962	1.64	S27L/V23T/A24V/N87Y/L90Y/F92L/S101D/T109R/A174 K/D203R/A216P
ICL00028982	1.05	S27L/N2R/P20T/F21W/L90F/F92Y
ICL00029054	1.54	S27L/L90Y/F92G/D158I/D203V/V229C
ICL00029064	2.00	S27L/S32Q/F92G/Q142W/I222L
ICL00029068	1.12	S27L/N2R/R12K/S32M/N87Q/L90F/F92L/I222L
ICL00029092	1.40	S27L/R12K/S32K/F92L/A114V/A117Q/T136A/D158E/A2 16P
ICL00029093	3.13	S27L/L90Y/F92G
ICL00029107	1.32	S27L/R12K/F21W/S32M/F92G/T136V/Q142L/D203R
ICL00029140	2.12	S27L/R12K/A14K/L90Y/F92L/A125S/A174K
ICL00029141	1.02	S27L/A24V/A114V/A117Q/T136V/D203V
ICL00029149	2.97	S27L/R12K/T17Q/V23L/S32M/L90Y/F92G/S101D/T136V/ I222L
ICL00029167	1.09	S27L/V23T/A24V/S32Q/F92L/S101N/T109L/S110R/D203 R
ICL00029172	1.38	S27L/P20T/Y60H/N87K/T136A/A174R/D203V

图90

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00029173	1.48	S27L/P20T/F21W/L90Y/F92L/T136A/A174R/D203V/V229 C
ICL00029174	1.49	S27L/T17G/F21W/S32K/L90F/F92G/A125S/T136A/A174 K
ICL00029199	1.31	S27L/T17G/N87Y/T136A/D203V/A216P
ICL00029219	1.42	S27L/F21W/L90F/F92G/S101D/A117N/T136A/A174K/D2 03V
ICL00029303	1.16	S27L/R12K/A14K/A24V/L90Y/D203V
ICL00029304	1.19	S27L/N2R/L90F/F92G/S101M/Q142L/D158L
ICL00029361	1.08	S27L/N2R/T17C/A24V/N87K/A174K/A216P
ICL00029375	1.14	S27L/N87M/Q142L/I222L
ICL00031774	1.16	S27L/F92L/S98T/R108C/A117Q/A127S/Q142L/Q189V/A2 16P/R236Q
ICL00031820	1.45	S27L/S22K/F92L/R108H/A127S/T136A/N211I
ICL00031919	1.80	S27L/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109L/A127S/T136V/N204 K/S223A
ICL00031936	1.45	S27L/T17L/L90Y/F92L/S98M/A174K/D203V/N211M/S21 2L/S223A
ICL00031945	1.56	S27L/N87K/S98M/N211M
ICL00032000	1.29	S27L/N9E/S22P/L90Y/N204K
ICL00032160	1.78	S27L/S32M/T48S/F92G/A127S/Q142W
ICL00032187	1.24	S27L/T17S/S22K/L90F/F92L/D158E/D203V/V219I/S252T
ICL00032196	1.28	S27L/L90F/F92L/A127S/D203V
ICL00032208	1.52	S27L/T25F/L90Y/F92G/N204R/S223A/N231S/R236C
ICL00032229	1.34	S27L/F21W/S22V/T48S/L90F/F92L
ICL00032231	2.39	S27L/S1A/S98T/S113K/A114V/L119M/A127S/Q142W/S1 93K/V219K/S252T/R255L
ICL00032241	2.17	S27L/A24V/I82L/L90F/F92G/T109L/L119M/A127S/E173 R/N204K
ICL00032282	1.03	S27L/T17C/Y60H/L90F/A127S/E173R/A174R/N204K
ICL00032284	1.53	S27L/L90F/F92L/Q142W/D203V/S223A
ICL00032351	1.64	S27L/P20Q/L90Y/Q142L/S223A
ICL00032357	1.35	S27L/N9S/Y60A/A216P/R236Q/R255M
ICL00032378	2.34	S27L/F92G/R108C/S110R/A117Q/T136A/N211M
ICL00032380	1.17	S27L/S22P/Y60H/S98A/S113K/A114K/T136V/Q189L/S19 3H
ICL00032410	1.58	S27L/V23L/S98A/Q142L/N211M
ICL00032471	1.39	S27L/V23L/Y26L/L31M/T48S/F92G/A174R/N204K/S252 T

图9P

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00032491	1.34	S27L/S13R/A14K/Y26T/T136A/S181R/N211M/S212M
ICL00032493	2.62	S27L/F21W/I82F/L90Y/F92G/A127S/N211M
ICL00032565	2.08	S27L/P20T/Y60H/S98L/T136A/R255L
ICL00032569	1.08	S27L/P20T/S34R/N87M/D158E/S252T
ICL00032570	1.82	S27L/T25A/L90F/F92G/Q189L/S193P/V229I
ICL00032573	1.08	S27L/V219L/I222L
ICL00032659	1.02	S27L/N9E/T48S/L90F/F92L/S98N/R108H/S110R/S113Y/N 211V/S212L/S252T
ICL00032721	1.71	S27L/L90F/F92Y/S113R/V219I/R255L
ICL00032725	1.53	S27L/F21W/S22K/T48S/F92G/T109R/A127S
ICL00032765	1.86	S27L/S1G/A14K/P20T/S32K/T48S/L90Y/F92L/T109L/T16 0R/V219L/I222L/S252T/R255L
ICL00032814	1.71	S27L/L90F/F92G/D158E/T160R/S193N/N204K/S223A
ICL00032848	1.73	S27L/A14K/Y26T/F92L/Q142L/S212L
ICL00032855	1.78	S27L/S22R/L90Y/F92G/V126I/A127S/A174K/N204K
ICL00032968	1.37	S27L/P20T/T25A/L90F/F92L/A117N/L119M/S252T/R255 L
ICL00033027	1.58	S27L/T17A/A24V/T48S/L90F/F92G/T109R/A127S/T160K/ D203R/S223A
ICL00033067	1.07	S27L/F21W/T48S/T109L/A127S/V219I/R255L
ICL00033176	1.10	S27L/A14K/S22P/T48S/L90F/F92L/T109L/A127S/Q142L/ A174R/N204K/S223A
ICL00033197	1.01	S27L/T136A/S212M/N231S
ICL00033301	1.57	S27L/F21W/L90F/F92G/A127S/S223A
ICL00033317	2.06	S27L/T48S/L90Y/F92L/R108S/S110R/A127S/T136V/E173 R/S223A
ICL00033533	1.86	S27L/T48S/F92G/S98E/Q142L/Q189V/S193P/N204R/S223 A
ICL00033548	1.30	S27L/T17S/L90F/F92Y/S101K/A127S/T136V/N204R/N21 1I/V229I/N231S
ICL00033559	2.40	S27L/N9E/F21W/T48S/L90Y/F92L/T109R/N204K/R236Q
ICL00033571	1.20	S27L/N9E/S22R/T48S/F92L/S101N/A127S/E173R/N204R
ICL00033575	1.24	S27L/S22K/N87F/A117Q/S181C/N204K/N211M/V229I/N2 31S/R236Q
ICL00033591	1.54	S27L/N9S/T48S/L90F/F92G/S101N/A127S/N204K/A216P/ S252T/R255M
ICL00033593	1.70	S27L/I82L/S193H/N211M/S212F/S223A
ICL00033594	2.02	S27L/A14K/P20T/T48S/L90F/F92G/S98N/R108C/T136A/ N204K/N211L/S212L/R236Q/S252T

图9Q

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00033653	1.71	S27L/S13R/T17L/T25Q/L90F/F92G/R108C/A127S/T160R/ I222L/R255L
ICL00033677	2.53	S27L/T48S/L90Y/F92G/T109L/S193N
ICL00033696	2.36	S27L/S22V/T48S/L90Y/F92L/S98E/A127S/T136A/N204K/ A216P/S223A
ICL00033714	1.65	S27L/V23L/N87H/F92L/R108C/S110R/N122A/T160S/Q18 9L/S193P/N204K/S223A/R255L
ICL00033737	1.36	S27L/F92G/A127S/A174R/S223A/V229I/N231S/R236C
ICL00033740	1.61	S27L/S1G/L90Y/A127S/E173R/S223A
ICL00033846	2.10	S27L/F92Y/S98N/Q142W
ICL00033909	1.48	S27L/P20T/S32M/S34R/T48S/L90Y/F92L/R108K/A127S/ Q142W/A174R/N204K/V219I/S252T
ICL00034025	2.25	S27L/F92G/A127S/Q189V/S193N/S223A
ICL00034065	1.08	S27L/S34R/F92G/S110R/D158L/D203V/R255M
ICL00034182	2.12	S27L/N9E/F21W/T48S/F92G/T109L/A127S/R236C
ICL00034192	1.71	S27L/S1A/S22P/T48S/L90Y/F92G/A127S/E173R/A174R/ N204K/S223A
ICL00034240	1.01	S27L/S22K/T48S/T160S/N204K
ICL00034243	1.33	S27L/F21W/T48S/L90Y/F92G/S98V/R108C/A127S/N211L /S212M/N231S/R236C
ICL00034264	1.05	S27L/V23L/A24V/A114K/T136A/I222L/V229I
ICL00034622	1.39	S27L/P20T/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I222L/V2 29I
ICL00035440	1.21	S27L/V23L/S101H/T109K/A114K/A117N/T136V/Q142L/I 222L/V229I
ICL00035481	1.09	S27L/T17L/F21W/S101H/T109R/A114V/T136A/Q142L/I2 22L/V229I
ICL00035505	1.40	S27L/T17S/T136V/Q142L/I222L/V229C
ICL00035526	1.36	S27L/T17C/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/P192A/ S193H/N204K/S223A/V229I/N231S/R236Q/R255L
ICL00035531	1.22	S27L/N9E/T48N/N87H/F92L/A174K/Q189L/S193K/N204 R/V219I
ICL00035551	1.40	S27L/A14K/V23L/Y26L/L90F/F92G/S98E/S113K/A114K/ T136A/V229I/N231S
ICL00035558	2.51	S27L/L90Y/F92L/S101D/A117N/Q142L/S193N
ICL00035590	1.01	S27L/S22K/T25A/L90Y/Q142L/E173R/N204K/S223A
ICL00035602	1.07	S27L/P20T/L90Y/T109L/A127S/A174K/V229C
ICL00035610	1.97	S27L/S22V/L90Y/F92L/A117Q/R236C/R255L
ICL00035710	2.23	S27L/V23L/A24G/Y26T/I82F/L90Y/F92G/R108H/T136A/ D158L/T160K/D203V

图9R

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00035724	1.52	S27L/A14K/S22K/F92G/A127S/N204K/V229I
ICL00035770	1.19	S27L/S22V/L90F/F92G/A127S/A174R/A216P/R236C
ICL00035778	1.61	S27L/V23L/Y60A/S98T/T109L/A127S/T136V/T160Q/N204K/S223A/R255L
ICL00035819	1.71	S27L/S13R/L90Y/S98L/T160V/Q189L/S193P/A216P/S252T/N253S/R255L
ICL00035823	1.62	S27L/S22R/I82M/F92L/T109L/A127S/Q142W/Q189L/S223A
ICL00035834	2.14	S27L/S1G/Y60A/L90F/F92L/N122E/T136A/N204K/S223A/N231S
ICL00035839	2.20	S27L/S32K/F92G/S98L/R108Q/S110R/R255L
ICL00035855	2.09	S27L/L90Y/F92G/L119M/A127S/A174R/S252T
ICL00035862	1.19	S27L/L90F/S110R/S181R/N211F
ICL00035934	1.37	S27L/A14K/S22P/Y60H/S110R/N122S/D158I/N204K/S223A/R255M
ICL00036094	1.05	S27L/F92L/S98V/T109L/N122A/E173R/R255L
ICL00036169	1.53	S27L/S22R/N87L/F92G/R236C
ICL00036178	1.34	S27L/S32M/S34R/I82L/F92G/N204K/S223A
ICL00036235	1.55	S27L/A24V/T25Q/Y60I/A127S/A174K/N204K/V219I/S223A/S252T/R255M
ICL00036239	2.11	S27L/S98V/T136A/N211F
ICL00036276	1.70	S27L/N9S/L90F/F92L/A127S/N204R/S212M
ICL00036287	1.02	S27L/S22R/T48S/F92G/R108H/S110R/A127S/E173R/N204K/S223A/R236Q
ICL00036293	2.84	S27L/A14K/L90Y/F92G/A127S
ICL00036332	1.09	S27L/A14K/T48S/F92G/E173R/N204R/S223A/N231S
ICL00036349	1.76	S27L/L90Y/T109R/S113N/V219L/I222L
ICL00036373	2.09	S27L/N9S/T48S/L90Y/T136A/T206G/S223A
ICL00036387	1.63	S27L/S22K/T48N/L90F/F92G/N204K/S223A/V229C/N231S
ICL00036443	1.34	S27L/S22P/T48S/L90F/F92G/A127S/A174R/N204R/S223A
ICL00036446	1.03	S27L/S1G/P20T/S32K/S34R/T48S/N87F/S98A/A127S/T136A
ICL00036453	1.24	S27L/F21W/S22R/S98E/Q142L/T160V/S223A/S252T/R255L
ICL00036454	1.84	S27L/P20T/T48S/F92Y/R108K/S110R/A127S/V219L/S223A/V229I/R236Q
ICL00036455	2.54	S27L/Y26T/L90Y/F92L/A127S/V219L/S252T/R255L
ICL00036510	1.05	S27L/N9S/F21W/T48S/F92L/A127S/D203V/S212F

图9S

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00036526	1.19	S27L/F21W/Y60H/S98E/L119M/D158E/R236Q
ICL00036577	1.39	S27L/F21W/S22R/L90F/F92L/N122S/Q142W/R236Q
ICL00036610	2.07	S27L/F21W/T48S/L90F/F92G/T109K
ICL00036629	2.11	S27L/L90Y/F92L/T109R/A127S/E173R/N204K/S223A
ICL00036782	2.58	S27L/N9S/F21W/T48S/L90Y/F92G/A127S/N204K/V219I/ R255M
ICL00036790	1.82	S27L/N9E/I82F/L90Y/F92L/S95N/T109L/A127S/A174R/S 223A
ICL00036809	1.30	S27L/L90F/F92L/S98L/N204K/A216P
ICL00036837	1.62	S27L/A24V/T48S/A117Q/N211M/S212M/S223A
ICL00036848	2.43	S27L/L90Y/F92G/T109L/A127S/N204R/S223A
ICL00036911	1.01	S27L/N2R/S32Q/N87K/A125S/V219L
ICL00037006	1.78	S27L/S22P/T48S/L90F/F92L/S193N/V219L/S223A
ICL00037042	1.91	S27L/T25Q/L119M/N211M/R236Q
ICL00037061	2.58	S27L/L90Y/F92G/N122S/A127S/E173R/A216P/R236Q
ICL00037075	1.85	S27L/P20T/S32K/L90F/F92G/N122E/D158E/T160S/Q189L /S223A/S252T
ICL00037121	1.93	S27L/N9S/F21W/T48S/N87H/L90F/F92L/S113N/V229C
ICL00037148	1.96	S27L/T25Q/I82L/L90F/F92G/S98L/S113R/A114V/T136A/ S181R
ICL00037152	3.42	S27L/P20T/R108Q/S110R/D203V/N211I
ICL00037185	1.89	S27L/S1G/N2R/P20T/Y26T/S32M/T48S/L90Y/F92L/A127 S/N204R/V219L
ICL00037200	2.01	S27L/A14K/P20T/T48N/L90F/F92G/A117Q/A127S
ICL00037224	1.51	S27L/N9S/T48N/L90Y/F92L/S98M/T109K/A127S/N204R/ N211I/S212L/V219I
ICL00037313	1.21	S27L/F21W/S22R/T48S/L90F/F92L/R108Q/A174K/N204K /S212F/S223A
ICL00037319	1.35	S27L/S22R/Y60H/S98T/T136V/S193K/R236Q
ICL00037336	2.70	S27L/S22K/Y26K/N87Y/L90Y/F92G/T109R/A127S/S252T /R255L
ICL00037337	1.58	S27L/L90F/F92L/T109L
ICL00037371	1.49	S27L/F21W/F92L/N204K/S252T/R255L
ICL00037378	2.44	S27L/V23L/L90Y/F92G/A127S/S193K/N204R/V219I/R23 6C/R255L
ICL00037436	2.29	S27L/F21W/L90Y/F92G/A114V/N122S/A127S/N204K/S2 23A/S252T
ICL00037450	1.92	S27L/P20T/Y60A/T109L/Q189L/S212L
ICL00037473	3.18	S27L/S22V/T48S/L90Y/F92G/N204K

图9T

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时下相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00037489	1.66	S27L/S22V/S32K/T48S/I82F/F92G/A127S/N204K/S223A
ICL00037554	2.16	S27L/A55L
ICL00037558	1.20	S27L/A97V
ICL00037611	1.02	S27L/F250L
ICL00037629	1.05	S27L/T109G
ICL00037651	1.02	S27L/G38D
ICL00037677	1.13	S27L/A97S
ICL00037847	1.26	S27L/A55V/A216T
ICL00037864	1.11	S27L/P20D
ICL00037901	1.27	S27L/A55V
ICL00037943	1.03	S27L/T109Y
ICL00037946	1.11	S27L/V165I
ICL00037948	1.12	S27L/A184G
ICL00037955	1.28	S27L/A97E
ICL00037961	1.10	S27L/A184S
ICL00037963	1.15	S27L/A97F
ICL00037988	1.40	S27L/A97T
ICL00038033	1.13	S27L/K197Y
ICL00038067	1.39	S27L/A55I
ICL00038071	1.06	S27L/A97P
ICL00038085	1.14	S27L/A55M
ICL00038089	1.01	S27L/P20E
ICL00038124	1.12	S27L/A117L
ICL00038135	1.11	S27L/T109L
ICL00038140	1.08	S27L/K197T
ICL00038189	1.09	S27L/T136S
ICL00038207	1.45	S27L/A97L
ICL00038219	1.13	S27L/T109A
ICL00038277	1.15	S27L/P20I
ICL00038296	1.05	S27L/L191V
ICL00038299	1.08	S27L/A184C
ICL00038304	1.09	S27L/A97Q
ICL00038308	1.03	S27L/F250V
ICL00038341	1.13	S27L/K197V
ICL00038353	1.05	S27L/A117S
ICL00038364	1.08	S27L/K197R

图9U

菌落 追踪号	pH8.0、 65° C、72小 时相对于 G2P:PF的 总活性的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00038379	1.06	S27L/T109K
ICL00038424	1.23	S27L/A55C
ICL00038486	1.51	S27L/N2S/V177A
ICL00038559	1.33	S27L/Q142D
ICL00038580	1.31	S27L/G149C
ICL00038591	1.15	S27L/F21Y
ICL00038623	1.26	S27L/G149A
ICL00038726	1.21	S27L/P164E
ICL00038757	1.16	S27L/Y26C
ICL00038766	1.04	S27L/T17N
ICL00038783	1.32	S27L/S57M
ICL00038791	1.01	S27L/D249I
ICL00038792	1.01	S27L/T17S
ICL00038834	1.06	S27L/P164T
ICL00038837	1.09	S27L/Q142L
ICL00038861	1.32	S27L/D249N
ICL00038862	1.06	S27L/I185R
ICL00038865	1.27	S27L/V83L
ICL00038866	1.32	S27L/G149S
ICL00038869	1.02	S27L/A24D
ICL00038901	1.24	S27L/R251V
ICL00038914	1.02	S27L/V83I
ICL00038944	1.05	S27L/S110N
ICL00039000	1.10	S27L/T17M
ICL00039034	1.14	S27L/F161W
ICL00039051	1.09	S27L/G46E
ICL00039053	1.02	S27L/D249T
ICL00039063	1.06	S27L/T17I
ICL00039064	1.61	S27L/S57C
ICL00039113	1.30	S27L/S57T
ICL00039173	1.67	S27L/S57L
ICL00039195	1.07	S27L/Q167T
ICL00039260	1.76	S27L/S57E
ICL00039288	1.10	S27L/T17K
ICL00039321	1.45	S27L/G149N
ICL00039344	1.06	S27L/Q142E

图9V

菌落 追踪号	pH8.0、65° C 、72小时下总 活性:PF的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00039414	1.38	S27L/S57F
ICL00039500	1.17	S27L/T17A
ICL00039501	1.13	S27L/P164H
ICL00039564	1.47	S27L/T17R
ICL00039573	1.22	S27L/G149T
ICL00039613	1.12	S27L/R251T
ICL00039624	1.07	S27L/S101Y
ICL00039636	1.56	S27L/S57V
ICL00039637	1.13	S27L/A24T
ICL00039669	1.14	S27L/I185E
ICL00039701	1.35	S27L/G46N
ICL00039711	1.02	S27L/P164N
ICL00039733	1.83	S27L/P164S
ICL00039734	1.28	S27L/Q167V
ICL00039757	1.37	S27L/F161V
ICL00039766	1.61	S27L/S57I
ICL00039771	1.53	S27L/G149D
ICL00039784	1.12	S27L/Q167I
ICL00039794	1.05	S27L/I185Q
ICL00043486	1.01	S27L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I
ICL00043848	1.54	S27L/A24V/V229C
ICL00044168	1.11	S27L/F21W
ICL00043551	1.07	S27L/F21W/A114V/T136A/I222L/V229I
ICL00044152	1.37	S27L/F21W/A24V
ICL00044069	1.39	S27L/F21W/A24V/A114V/A117Q/Q142W/I222L/V229C
ICL00043633	1.36	S27L/F21W/I222L/V229C
ICL00043952	1.43	S27L/F21W/I222L/V229I
ICL00043637	1.34	S27L/F21W/Q142L/I222L/V229C
ICL00044295	1.27	S27L/F21W/S101M/I222L/V229C
ICL00043472	1.26	S27L/F21W/T109K/S110R/T136A/V229I
ICL00044315	1.10	S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/I222L/V229I
ICL00044330	1.57	S27L/F21W/T109R/A117N/T136V/Q142W/I222L/V229C
ICL00043752	1.25	S27L/F21W/T136A

图9W

菌落 追踪号	pH8.0、65° C 、72小时下总 活性:PF的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00043749	1.34	S27L/I222L/V229I
ICL00044510	1.39	S27L/P20T/A117Q/I222L/V229C
ICL00044441	1.02	S27L/P20T/A24V/S101Q/T109R/A117Q/I222L/V229I
ICL00044350	1.34	S27L/P20T/F21W/I222L/V229C
ICL00044428	1.30	S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229C
ICL00044371	1.43	S27L/P20T/F21W/Q142W/I222L/V229I
ICL00043526	1.62	S27L/P20T/F21W/T109K/A117N/I222L/V229C
ICL00043688	1.50	S27L/P20T/F21W/T109L/T136A/Q142W/I222L/V229C
ICL00043610	1.62	S27L/P20T/F21W/T109R/A117Q/T136V/Q142L/I222L/V229I
ICL00043813	1.25	S27L/P20T/F21W/T136A/Q142L/I222L/V229I
ICL00043577	1.39	S27L/P20T/F21W/V229I
ICL00044052	1.21	S27L/P20T/I222L/V229C
ICL00043941	1.18	S27L/P20T/S101H/A114V/A117N/I222L/V229I
ICL00044090	1.34	S27L/P20T/S101M/A114V/A117N/Q142W/I222L/V229C
ICL00043686	1.64	S27L/P20T/S101M/I222L/V229I
ICL00044408	1.55	S27L/P20T/T109K/A114K/Q142W/I222L/V229C
ICL00043842	1.26	S27L/P20T/T109L/S110R/A117N/I222L/V229I
ICL00043764	1.28	S27L/P20T/T109R/A114K/A117Q/T136V/I222L/V229C
ICL00043458	1.17	S27L/P20T/V23T/A24V/I222L/V229I
ICL00043499	1.48	S27L/P20T/V23T/A24V/T109L/S110R/I222L/V229I
ICL00043924	1.35	S27L/S101M/A114V/A117Q/T136A
ICL00043528	1.36	S27L/S101M/T136A/I222L/V229I
ICL00044207	1.30	S27L/S101N/A117Q/I222L
ICL00043491	1.35	S27L/S101Q/Q142L/I222L/V229I
ICL00043684	1.70	S27L/S101W/A114V/T136V/V229C
ICL00044177	1.22	S27L/T109K/A117N/T136V/I222L/V229C
ICL00043973	1.05	S27L/T109R/A117N/I222L/V229C
ICL00043940	1.42	S27L/T109R/I222L/V229I
ICL00043944	1.23	S27L/T136V/Q142W/I222L/V229I
ICL00043759	1.61	S27L/T17A/A24V/S101D/S110R/T136A
ICL00043639	1.25	S27L/T17A/F21W/S101Q/I222L/V229C
ICL00043731	1.29	S27L/T17A/F21W/T109R/S110R/I222L/V229I
ICL00044539	1.13	S27L/T17A/P20T/S101Q/T109K/S110R/T136A/I222L/V229C
ICL00043846	1.43	S27L/T17A/V23L/S101M/T109K/S110R/A114V/A117Q/T136V/V229I

图9X

菌落 追踪号	pH8.0、65° C 、72小时下总 活性:PF的改善	相对于G1P的AA突变
ICL00043721	1.19	S27L/T17A/V23T/A24V/T136A
ICL00044006	1.29	S27L/T17C/A114K/A117N/T136V/I222L/V229I
ICL00043926	1.26	S27L/T17C/T109K/A117N/T136A/I222L/V229I
ICL00043983	1.25	S27L/T17G/F21W/A117N/I222L/V229I
ICL00044547	1.39	S27L/T17G/P20T/F21W/A117Q/I222L/V229C
ICL00043831	1.04	S27L/T17G/V23T/A24V/T109L/A117Q/T136A/I222L/V229I
ICL00043487	1.34	S27L/T17H/F21W/T136V/Q142W/I222L/V229I
ICL00043844	1.83	S27L/T17H/S101Q/T136V/Q142L/V229C
ICL00044382	1.24	S27L/T17L/S101M/T109K/S110R/A117Q/I222L/V229C
ICL00043812	1.25	S27L/T17L/T109L/S110R/A117Q/I222L/V229I
ICL00043849	1.34	S27L/T17Q/A24V/S101W/T136A
ICL00044328	1.60	S27L/T17Q/Q142L/I222L/V229I
ICL00044164	1.56	S27L/T17Q/S101D/T136A/I222L/V229I
ICL00044355	1.24	S27L/T17Q/T136A/I222L/V229C
ICL00044226	1.31	S27L/T17Q/T136A/I222L/V229I
ICL00043568	1.39	S27L/T17Q/V23T/A24V/I222L/V229I
ICL00044481	1.25	S27L/T17S/F21W/Q142L
ICL00043742	1.20	S27L/T17S/S101N/T109K/A117N/T136V/Q142L/I222L/V229C
ICL00044186	1.31	S27L/T17S/V229I
ICL00043608	1.24	S27L/V229I
ICL00044340	1.12	S27L/V23L/A114V/A117N/T136A/I222L/V229I
ICL00044232	1.26	S27L/V23L/A117Q
ICL00043536	1.06	S27L/V23L/A24V/S101K/A117N/I222L/V229C
ICL00043839	1.28	S27L/V23L/A24V/T136A/Q142W/I222L/V229I
ICL00043592	1.29	S27L/V23L/I222L/V229C
ICL00043955	1.14	S27L/V23L/T136A/I222L/V229I
ICL00043772	2.02	S27L/V23T/A24V/I222L/V229C
ICL00044326	1.15	S27L/V23T/A24V/T109K/A114K/A117Q/T136A/I222L/V229C
ICL00044127	1.40	S27L/V23T/Q142L/I222L/V229C
ICL00043537	1.33	S27L/V23T/T109L/A114V/T136A/Q142L/I222L/V229C
ICL00040026	1.27	S27L/A117Y
ICL00040387	1.38	S27L/A24D/K197L
ICL00040146	1.48	S27L/A24D/L191F/R251Q
ICL00040453	1.42	S27L/A24D/S110K

图9Y

菌落 追踪号	pH8.0、65° C 、72小时下总 活性:PF的改 善	相对于G1P的AA突变
ICL00041680	1.57	S27L/A24D/T109L/K197L
ICL00040241	1.50	S27L/A24D/T136S/F250V
ICL00040069	1.78	S27L/A24H/G46E
ICL00040102	1.07	S27L/A24H/R251V
ICL00040329	1.13	S27L/A24N
ICL00041935	1.26	S27L/A24N/P164S/K197V/R251T
ICL00041682	1.26	S27L/A55V/V83L/A117T
ICL00040423	1.04	S27L/F21Y/A184S
ICL00041467	1.06	S27L/F21Y/A55T/T109A/A184S
ICL00040495	1.14	S27L/F21Y/G46E/A117T/T136S/G149C/R251Q
ICL00040518	1.16	S27L/F250L/R251Q
ICL00040336	1.34	S27L/G46E/A55I/Q142E
ICL00041273	1.14	S27L/G46N/I139T/Q142E/P164T/I185A/V229L/F250V
ICL00041071	1.11	S27L/G46R/T109K/T136S/D249T
ICL00040224	1.07	S27L/I139T/Q142E/I169V
ICL00042190	1.24	S27L/K197R/R251E
ICL00042046	1.11	S27L/N2E/G46N/A55V/I185Y/D249I
ICL00040842	1.27	S27L/N2E/G46S/V83L/T136S/A172T/V229C/D249N
ICL00041002	1.51	S27L/N2E/I169L/F250L/R251Q
ICL00041977	1.54	S27L/N2E/P20E/F250V/R251L
ICL00040909	1.30	S27L/N2E/P20I/T109L/L191V/K197L/V229C
ICL00039972	1.19	S27L/N2E/R251L
ICL00040106	1.22	S27L/N2F
ICL00041835	1.39	S27L/N2F/D249N/F250L
ICL00041533	1.23	S27L/N2F/G46E
ICL00040002	1.54	S27L/N2F/P20E
ICL00042252	1.04	S27L/N2F/P20E/S110D/A184S/L191V/R251V
ICL00040887	1.23	S27L/N2F/P20I/F21Y/R251Q
ICL00041364	1.34	S27L/N2F/R251Q
ICL00041574	1.10	S27L/N2F/S101C/A117F/P164S
ICL00041845	1.08	S27L/N2F/S101Y/Q142L/G149T/Q167I/I169C/V229L
ICL00040388	1.29	S27L/N2L
ICL00042100	1.32	S27L/N2L/A172T
ICL00039916	1.33	S27L/N2L/A24H/A55C/V229L
ICL00040800	1.23	S27L/N2L/A24T
ICL00041736	1.31	S27L/N2L/G46E/T109K/F161V

图9Z

菌落 追踪号	pH8.0、65° C 、72小时下总 活性:PF的改 善	相对于G1P的AA突变
ICL00040487	1.33	S27L/N2L/P20E/F21Y/V229L
ICL00040442	1.01	S27L/N2L/T17I/T136S/P164H/D249M
ICL00041938	1.27	S27L/N2L/T17N/S57C/S110D/A117L/P164N/I185G/V229 L/R251T
ICL00041080	1.67	S27L/N2S/A24D/S101Y/P164E/V165I/I185E
ICL00040174	1.52	S27L/N2S/A24N/G46E/A55L/Q142D/V229C/R251L
ICL00040463	1.08	S27L/N2S/A55V/I185Q/R251E
ICL00040566	1.35	S27L/N2S/P20D/A97C/A117F/F250L/R251E
ICL00040090	1.20	S27L/N2S/V83L/A184S
ICL00040060	1.14	S27L/P164T/V165I/R251E
ICL00040865	1.20	S27L/P20D/A55T/A117Y/K197R
ICL00041737	1.05	S27L/P20D/F21Y/A55T/F250L/R251V
ICL00039868	1.32	S27L/P20D/F21Y/F250V
ICL00042042	1.54	S27L/P20D/F21Y/G46N/S110K/T163I/Q167V
ICL00041640	1.73	S27L/P20D/G46N/A55C/S110N/T163I/A184S
ICL00040630	1.27	S27L/P20D/G46S/A55I/K197T
ICL00042201	1.20	S27L/P20D/S57E/S101C
ICL00040296	1.42	S27L/P20E/A24D/D249S/F250V
ICL00042171	1.25	S27L/P20E/F21Y/G46E/V83L/A97Q
ICL00041696	1.01	S27L/P20E/F21Y/I139T/P164H/K197T/R251E
ICL00041182	1.43	S27L/P20E/F21Y/K197T
ICL00040186	1.19	S27L/P20E/F21Y/S110D/A117S
ICL00040431	1.17	S27L/P20E/F21Y/S57T/P164N/A184C/V229C
ICL00040166	1.24	S27L/P20I/F21Y/A117F/I185G/D249N
ICL00041084	1.10	S27L/Q142H/I185S/R251A
ICL00040993	1.03	S27L/S110D/A184S/K197T
ICL00042211	1.07	S27L/S110K/A117Y/P164R
ICL00040629	1.12	S27L/S57C/R251E
ICL00040501	1.03	S27L/T136S/D249T
ICL00041708	1.35	S27L/T163I
ICL00041406	1.38	S27L/T17H/S110K
ICL00042123	1.21	S27L/T17I/A24D/S57I
ICL00040258	1.68	S27L/T17N/A117S/V229L/R251A
ICL00039911	1.24	S27L/T17S/R251T
ICL00040420	1.17	S27L/V83L/A97S/A184C/D249S
ICL00041699	1.11	S27L/V83L/F250V/R251E

图9AA

位置	亲本	变体	位置	亲本	变体
27	S	L, F, H, T, W	68	A	F
1	S	A, G, M, R	70	L	M
2	N	E, F, L, R, S	72	R	P
5	Q	E	74	L	W
9	N	A, E, S	77	H	Q
12	R	K	82	I	F, L, M
13	S	L, R	83	V	I, L, T
14	A	K, S	85	N	D
15	L	I	87	N	F, H, I, K, L, M, Q, R, V, W, Y
16	T	E	88	S	K, T
17	T	A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S	90	L	F, K, Y
18	D	R	92	F	G, I, K, L, N, Q, V, Y
20	P	D, E, I, Q, T	97	A	C, E, F, G, L, P, Q, S, T, V
21	F	W, Y	98	S	A, D, E, L, M, N, Q, T, V
22	S	A, I, K, P, R, V	101	S	A, C, D, F, H, K, L, M, N, Q, R, V, W, Y
23	V	L, T	102	A	V
24	A	D, G, H, N, S, T, V	105	N	D
25	T	A, F, H, Q, R, V	108	R	C, E, H, K, N, P, Q, S, T, V
26	Y	C, K, L, T	109	T	A, F, G, K, L, N, R, Y
30	R	K	110	S	D, G, H, K, N, R
32	S	K, M, Q, Y	113	S	A, K, N, P, Q, R, T, Y
33	V	G, Q, T	114	A	K, L, S, V
34	S	R	117	A	F, G, L, N, Q, S, T, Y
40	V	T	119	L	I, M
46	G	E, L, N, R, S	121	A	S
48	T	N, S	122	N	A, E, H, P, R, S
49	L	G	125	A	S
53	G	A	127	A	M, S, V
54	I	V	135	A	G
55	A	C, I, L, M, T, V	136	T	A, M, S, V
56	M	I, L	138	R	E, L
57	S	C, E, F, I, L, M, T, V	139	I	A, T
60	Y	A, H, I	140	S	A
62	A	T	142	Q	D, E, H, L, W

图10A

位置	亲本	变体	位置	亲本	变体
143	I	N, R	206	T	G, K, L, P, R
145	T	S	208	F	G, L, R, T
147	K	F, G, N, Q	209	A	V
149	G	A, C, D, N, S, T, V	211	N	F, I, L, M, V
150	V	I, L	212	S	F, L, M
153	T	L	213	P	N, R
156	H	N	216	A	L, P, S, T, V
157	T	A, G	217	I	S
158	D	E, I, K, L	218	S	A
160	T	K, Q, R, S, V	219	V	F, I, K, L, R
161	F	V, W	221	T	S
162	N	E, H, P, R	222	I	L
163	T	I, S	223	S	A, C
164	P	E, H, N, R, S, T	225	M	L
167	Q	I, T, V	227	L	R
170	V	L	228	W	F
173	E	R	229	V	C, I, L
174	A	K, R	231	N	L, Q, S
177	V	A	236	R	C, E, H, K, Q
179	P	Q	237	Q	R
181	S	A, C, R	241	N	P
182	Q	T	242	V	T
184	A	C, G, S	243	N	P
185	I	A, E, G, L, Q, R, S, Y	246	A	D, K, S, T
189	Q	I, L, V	249	D	I, M, N, S, T
190	N	S	250	F	I, L, V, Y
193	S	E, F, H, K, N, P, T, V	251	R	A, E, I, K, L, Q, T, V
194	T	G, S	252	S	T
195	T	F	253	N	S, Y
198	V	A	254	N	R
200	V	L	255	R	E, G, L, M, S, V, W, Y
203	D	N, R, V	258	Q	P
204	N	A, K, R, S			
8	P	T	165	V	I
31	L	M	169	I	C, L, V
38	G	D	172	A	T
95	S	N	191	L	F, V
126	V	I	192	P	A
137	L	M	197	K	L, R, T, V, Y

图10B

>SEQ ID NO:1 (野生型Bhr-PETase, G1P)

SNPYQRGNPTRSALTDDGPFSVATYSVSRLSVSGFGGGVIYYPTGTTLTFGGIAMSPGYTADASS
LAWLGRRRLASHGFVVIVINTNSRLDFPDSRASQLSAALNYLRTSSPSAVRARLDANRLAVAGHSMG
GGATLRRISEQIPTLKAGVPLTPWHTDKTFNTPVPQLIVGAEDTVAPVSQHAIPFYQNLPSSTTPKV
YVELDNATHFAPNSPNAAISVYTI SWMKLWVDNDTRYRQFLCNVNDPALSDFRSNNRHCQ

>SEQ ID NO:2 (编码野生型Bhr-PETase的N. A. , 密码子优化的)

TCTAACCACATACCAGAGGGGACCTAACCTACTAGGAGTGCCTTGACCACCGATGGTCCTTTCAGT
GTGCCACCTACTCTGTCTCTAGGTTGTCTGTCTCTGGTTTCGGAGGTGGAGTCATCTACTACCCA
ACCGGAACCACCTTACCTTCGGAGGTATCGCCATGTCTCCCGGATACACTGCCGATGCTTCTAGT
CTTGCTTGGTTGGGTAGGAGGCTTGCTAGTCACGGATTCTGTCGTCATCGTCATCAACACCAACAGT
AGGTTGGACTTTCCAGACAGTAGGGCCTCTCAGCTTTCTGCCGCCCTTAACCTTAGGACCTCT
TCTCCAAGTGCCGTTAGAGCTAGGTTGGACGCTAATAGATTGGCTGTGCTGGACACTCTATGGGT
GGAGGTGCCACTTTGAGGATCAGTGAGCAGATCCCTACCCTTAAAGCCGGTGTTCCCTTTGACCCCT
TGGCACACTGACAAGACCTTCAACACTCCAGTCCCACAGTTGATTGTGCGAGCCGAAGCCGATACT
GTTGCTCCAGTTTCTCAGCACGCCATCCCATTCTACCAGAACCCTTCCTAGTACCACCCCAAAGGTC
TACGTCGAGTTGGATAACGCCACCCACTTCGCTCCAAACTCTCCAAACGCTGCCATCAGTGTTTAC
ACCATTTCTTGATGAAGTTGTGGGTGACAAACGACACTAGATATAGACAGTTCCTTTGCAACGTC
AACGACCCAGCTTTGTCTGACTTTAGAAGTAACAATAGACATTGTCTAG

>SEQ ID NO:3 (编码野生型Bhr-PETase的N. A. , 密码子优化的)

AGTAACCACATACCAGCGCGGTCCGAATCCGACCCGTAGTGCGCTGACGACCGATGGTCCGTTTAGC
GTGGCCACCTACAGCGTGAGCCGTCTGAGTGTTAGCGGCTTTGGCGGCGGTGTTATCTACTACCCG
ACGGGCACACGCTGACCTTTGGTGGCATCGCCATGAGTCCGGGCTACACCGCGGACGCCAGTAGT
CTGGCGTGGCTCGGTCTGCTCTGGCGAGCCATGGCTTCGTGGTGATCGTGATCAACACCAACAGC
CGCCTCGACTTTCCAGATAGTCGTGCCAGTCAGCTGAGCGCCGCGCTGAATTATCTGCGTACCAGT
AGCCCAAGCGCGGTTTCGTGCCCCTCTGGATGCCAATCGCCTCGCCGTTGCCGTCATAGTATGGGC
GGTGGTGCCACGCTGCGTATCAGCGAACAGATTCCGACGCTGAAAGCGGGCGTGCCACTGACCCCA
TGGCACACGGACAAGACGTTTAAACACCCCGGTTCCGCAGCTCATTGTGGGTGCCGAAGCCGACACC
GTTGCCCCAGTTAGCCAGCACGCGATCCCGTTTTACCAGAATCTGCCAAGCACCACGCCGAAAGTT
TACGTGGAACTCGACAACGCGACCCACTTTGCGCCGAACAGTCCGAACGCCGCCATCAGCGTGATAC
ACCATCAGCTGGATGAACTCTGGGTGGACAACGATACCCGCTACCGCCAGTTTCTGTGCAACGTT
AATGATCCGGCGCTGAGCGACTTCCGCAGCAATAACCGCCATTGCCAG

图11A

>SEQ ID NO:4 (野生型Lcc-PETase)

HHHHHHSSGLVPRGSHMSNPYQRGPNPTRSALTADGPFPSVATYTVSRLSVSGFGGGVIYYPTGTSL
TFGGIAMSPPGYTADASSLAWLGRRRLASHGFVVLVINTNSRFDYPDSRASQLSAALNYLRTSSPSAV
RARLDANRLAVAGHSMGGGGTLRIAEQNPSLKAAPLTPWHTDKTFNTSVPVLIVGAEADTVAPVS
QHAIPFYQNLPSSTTPKVYVELDNASHFAPNSNNAISVYTI SWMKLWVDNDTRYRQFLCNVNDPAL
SDFRTNNRH CQ

>SEQ ID NO: 5 (编码野生型Lcc-PETase的N. A.)

CATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAGTAACCCATACCAG
CGCGGTCCGAATCCGACCCGTAGTGCGCTGACGGCCGATGGTCCGTTTAGCGTGCCACCTACACC
GTGAGCCGTCTGAGTGTTAGCGGCTTTGGCGGCGGTGTTATCTACTACCCGACGGGCACCACTCTG
ACCTTTGGTGGCATCGCCATGAGTCCGGGCTACACCGCGGACGCCAGTAGTCTGGCGTGGCTCGGT
CGTCGTCTGGCGAGCCATGGCTTCGTGGTGCTGGTGATCAACACCAACAGCCGCTTCGACTATCCA
GATAGTCGTGCCAGTCAGCTGAGCGCCGCGCTGAATTATCTGCGTACCAGTAGCCCAAGCGCGGTT
CGTGCCCGTCTGGATGCCAATCGCCTCGCCGTTGCCGGTCATAGTATGGGCGGTGGTGGTACGCTG
CGTATCGCCGAACAGAATCCGAGTCTGAAAGCGGCCGTGCCACTGACCCCATGGCACACGGACAAG
ACGTTTAAACACCAGCGTTCCGGTGCTCATTGTGGGTGCCGAAGCCGACACCGTTGCCCCAGTTAGC
CAGCACGCGATCCCGTTTTTACCAGAATCTGCCAAGCACCACGCCGAAAGTTTACGTGGAACTCGAC
AACGCGAGCCACTTTTGCGCCGAACAGTAATAACGCCGCCATCAGCGTGTAACCATCAGCTGGATG
AAACTCTGGGTGGACAACGATAACCCGCTACCGCCAGTTTCTGTGCAACGTTAATGATCCGGCGCTG
AGCGACTTCCGCACCAATAACCGCCATTGCCAG

>SEQ ID NO:6 (野生型Is-PETase)

QTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRPSGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIAIVPGYTARQSS
IKWWGPRLASHGFVVITIDTNSTLDQPSRSSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVDTARMGVMGW
SMGGGSLISAANNPSLKAAAPQAPWDSSTNFSSVTVP TLI FACENDS IAPVNSSALPIYDSMSRN
AKQFLEINGGSHSCANSNSNQALIGKKGVAMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFR TANCSL
EHHHHHH

>SEQ ID NO:7 (编码野生型Is-PETase的N. A.)

CAGACGAATCCATACGCCCCGCGGTCCAAATCCAACCGCGCGAGTCTGGAAGCCAGTGCGGGCCCA
TTACCCGTTTCGACGCTTTACCGTTAGTCGTCCAAGCGGTACGGTGCCGGCACCGTGTA TACTACCCG
ACGAATGCGGGTGGTACCGTGGGTGCGATCGCCATCGTTCCGGGCTATACCGCGCGCCAGAGTAGC
ATCAAATGGTGGGGTCCACGTCTGGCGAGTCATGGCTTCGTGGTGATCACGATCGACACCAATAGC
ACCTTCGATCAGCCAAGCAGCCGAGCAGTCAACAGATGGCGGCGCTGCGCCAAGTTGCCAGTCTG
AACGGCACGAGTAGCAGCCGATTTACGGTAAAGTGGACACCGCGCGTATGGGCGTGATGGGCTGG
AGCATGGGTGGTGGTGGCAGTCTGATCAGTGCCGCCAACAATCCAAGCCTCAAAGCGGCGGCGCCA
CAAGCGCCATGGGATAGCAGCACGAAC TTTAGCAGCGTGACCGTGCCAACGCTGATCTTCGCGTGC
GAAAACGACAGCATCGCCCCGGTGAATAGCAGTGCGCTGCCGATCTATGACAGCATGAGTCGCAAC
GCCAAGCAGTTTCTGGAGATCAACGGTGGCAGCCATAGCTGCGCGAACAGCGGCAACAGCAATCAA
GCCCTCATCGGTAAAAAGGGCGTGGCGTGGATGAAGCGCTTTATGGACAACGACACCCGCTACAGC
ACCTTCGCGTGCGAGAATCCGAACAGTACCCGCGTGAGCGATTTCCGCACCGCCAATTG CAGCCTC
GAGCACCACCACCACCAC

图11B