(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115605588 A
(43)申请公布日 2023.01.13

(21)申请号 202180035340.6
(22)申请日 2021.05.13
(30)优先权数据
63/024,398 2020.05.13 US
63/074,288 2020.09.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/032217 2021.05.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/231705 EN 2021.11.18
(71)申请人 居里公司
地址 美国北卡罗来纳州
(72)发明人 W.辛德尔 K.S.格德翁
E.M.米尔茨克 S.A.科斯塔
(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 9/10(2006.01)
C12N 15/52(2006.01)

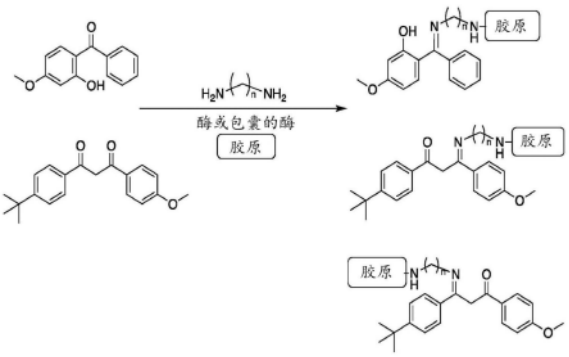
权利要求书2页 说明书42页 附图4页

(54)发明名称

转谷氨酰胺酶变体及其应用

(57)摘要

提供了茂原链霉菌(Streptomyces mobaraensis)的转谷氨酰胺酶的变体。所公开的变体与野生型酶相比展现出至少约2倍增加的酶活性。提供了用于杀生物应用以及用于将小有机分子与感兴趣的蛋白质或材料共价结合的方法和组合物。提供了用于通过将有效量的所公开的变体酶掺入产品中来增加产品,如个人护理、家用和工业产品的自身寿命的方法。转谷氨酰胺酶变体也可以用于将功能性成分如UV阻隔分子、染料或色素与蛋白质共价结合。可以将转谷氨酰胺酶和功能性成分掺入化妆品配制剂中,用于修饰皮肤、毛发或指甲蛋白或皮肤衍生蛋白,如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。



CN 115605588 A

1.SEQ ID NO:1中所示的转谷氨酰胺酶氨基酸序列的变体,其包含199位的氨基酸残基A或G和299位的氨基酸残基A、E、K或V的取代。

2.权利要求1的转谷氨酰胺酶变体,其进一步包含N端甲硫氨酸残基、C端组氨酸多组氨酸序列,和/或原序列。

3.权利要求1的转谷氨酰胺酶变体,其进一步包含2位的氨基酸残基C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y的取代。

4.权利要求3的转谷氨酰胺酶变体,其进一步包含N端甲硫氨酸残基、C端组氨酸多组氨酸序列,和/或原序列。

5.SEQ ID NO:1中所示的转谷氨酰胺酶氨基酸序列的变体,其包含282位的氨基酸残基D、E、K、M、R或Q,289位的氨基酸残基E、I、L、T、Q或V,以及299位的氨基酸残基A、E、K或V的取代。

6.权利要求5的转谷氨酰胺酶变体,其进一步包含N端甲硫氨酸残基、C端组氨酸多组氨酸序列,和/或原序列。

7.SEQ ID NO:1中所示的转谷氨酰胺酶氨基酸序列的变体,其包含SEQ ID NO:2-27中任一项所示的氨基酸序列。

8.权利要求7的转谷氨酰胺酶变体,其进一步包含N端甲硫氨酸残基、C端组氨酸多组氨酸序列,和/或原序列。

9.转谷氨酰胺酶,其包含与SEQ ID NO:2-27中所示的氨基酸序列的任一个具有至少约90%序列同一性的序列或SEQ ID NO:2-27中所示的氨基酸序列的任一个的环形置换物,其中所述变体与包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的转谷氨酰胺酶相比包含大至少约2倍的转谷氨酰胺酶的酶活性。

10.权利要求9的转谷氨酰胺酶变体,其进一步包含N端甲硫氨酸残基、C端组氨酸多组氨酸序列,和/或原序列。

11.用于增加产品的保质期的方法,其包括以一定量将权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体掺入所述产品中,所述量与不包含所述变体的相同产品相比有效地防止或减少一种或多种微生物的生长。

12.产品,其包含有效量的权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体,以与不包含所述变体的相同产品相比增加所述产品的保质期。

13.权利要求12的产品,其中所述产品是个人护理、家用、工业、食品、医药、化妆品、保健、伤口护理、海洋、油漆、涂料、能源、塑料、包装、纺织品、皮革或农业产品。

14.权利要求13的产品,其中所述产品是选自条皂、液体肥皂、洗手液、术前皮肤消毒剂、清洁湿巾、消毒湿巾、沐浴液、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌皮肤霜、洗发水、护发素、化妆品、除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、外用霜、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏和防晒乳液的个人护理产品。

15.权利要求13的产品,其中所述产品是选自伤口愈合软膏、霜和乳液、伤口覆盖物、烧伤伤口霜、绷带、胶带和无菌条的伤口护理产品。

16.酶组合物,其包含:(i)权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体,包含SEQ ID NO:1、28或29中所示的氨基酸序列的转谷氨酰胺酶,和/或赖氨酰氧化酶;和(ii)所述转谷氨酰胺酶或赖氨酰氧化酶的底物,包括遮光剂分子、色素或染料分子,或功能性成分分子。

17.权利要求16的酶组合物,其中所述遮光剂分子、色素或染料分子或功能性成分分子与包含游离氨基基团的分子缀合。

18.权利要求17的酶组合物,其中所述包含游离氨基基团的分子衍生自式$R(CH_2)_n(NH_2)$的脂肪族胺,其中n是1和30之间的整数,并且R是功能性成分。

19.权利要求18的酶组合物,其中n是5和10之间的整数。

20.权利要求17的酶组合物,其中所述包含游离氨基基团的分子衍生自赖氨酸、尸胺、腐胺、肼、己二酸二酰肼、癸二酸二酰肼和六亚甲基二胺。

21.权利要求16的酶组合物,其中所述遮光剂分子、色素或染料分子或功能性成分分子与具有游离谷氨酰胺侧链的氨基酸、肽或蛋白质缀合。

22.化妆品组合物,其包含权利要求16的酶组合物。

23.将颜色与感兴趣的材料或蛋白质结合的方法,其包括使所述感兴趣的材料或蛋白质与权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体、包含SEQ ID NO:1、28或29中所示的氨基酸序列的转谷氨酰胺酶,和/或赖氨酰氧化酶和色素或染料分子接触,其中所述转谷氨酰胺酶或赖氨酰氧化酶以有效地将所述色素或染料分子与所述感兴趣的材料或蛋白质共价结合的量存在。

24.权利要求23的方法,其中所述感兴趣的蛋白质是存在于皮肤中的蛋白质。

25.权利要求24的方法,其中所述存在于皮肤中的蛋白质包括胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。

26.产品,其包含有效量的权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体、包含SEQ ID NO:1、28或29中所示的氨基酸序列的转谷氨酰胺酶,和/或赖氨酰氧化酶,以在与所述产品接触时将功能性成分或颜色分子添加到感兴趣的蛋白质或含有蛋白质、肽或氨基酸的材料上。

27.权利要求26的产品,其中所述产品是个人护理、化妆品、纺织品、皮革、食品或农业产品。

28.修改感兴趣的蛋白质或材料的颜色的方法,其包括使所述感兴趣的蛋白质或材料与根据权利要求26的产品接触。

29.组合物,其包含与一种或多种抗微生物酶、肽或蛋白质组合的权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体,其中所述组合物包含防腐、杀生物、抗微生物或杀病毒活性。

30.权利要求29的组合物,其中所述抗微生物酶、肽或蛋白质选自溶菌酶、几丁质酶、脂肪酶、溶素、溶葡萄球菌素、葡聚糖酶、DNase、RNase、乳铁蛋白、葡萄糖氧化酶、过氧化物酶、乳过氧化物酶、内酯酶、酰化酶、分散素B、a-淀粉酶、纤维素酶、乳链菌肽、细菌素、铁载体、多粘菌素和防御素。

31.噬菌体,其包含编码权利要求1至10中任一项的转谷氨酰胺酶变体的核酸序列。

32.组合物,其包含权利要求31的噬菌体,其中所述组合物包含抗微生物活性。

33.权利要求32的组合物,其中所述组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂。

转谷氨酰胺酶变体及其应用

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年5月13日提交的美国临时申请号63/024,398和2020年9月3日提交的63/074,288的权益,两者均通过引用其整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及包含两个或更多个氨基酸取代的工程化变体微生物转谷氨酰胺酶多肽,以及编码它们的核酸。该变体可以用于缀合蛋白质、肽或小分子,与野生型茂原链霉菌(Streptomyces mobaraensis)转谷氨酰胺酶相比,具有更高的比活性,诸如在局部应用中。该变体也可以用作活性杀生物酶并在其配制剂中用作广谱微生物控制的药剂。

背景技术

[0004] 转谷氨酰胺酶(Tgase,EC 2.3.2.13)是能够催化酰基转移反应的酶,其中肽结合的谷氨酰胺残基的γ-羧基-酰胺基是酰基供体。各种化合物中的伯氨基可以作为酰基接受体发挥功能,随后形成肽结合谷氨酰胺的单取代γ-酰胺。当肽链中赖氨酸残基的ε-氨基作为酰基接受体时,Tgase形成分子内或分子间的γ-谷氨酰-ε-赖氨酰交联。催化反应经由谷氨酰胺脱氨基和在酶的活性部位形成蛋白质-谷氨酰-硫代酯进行。第二蛋白质的赖氨酰ε-氨基在硫酯中间体的羰基部分上进行的亲核攻击生成异肽交联的蛋白质,这些蛋白质对常见肽酶的蛋白分解有很大的抗性(Mariniello,et al.(2007)J Agr Food Chem.55:4717-4721)。

[0005] 由Tgase形成的键表现出对蛋白质降解(蛋白分解)的高抗性。来自微生物来源的Tgase是钙非依赖性的,这代表其实际使用的主要优势。

[0006] Tgase已经在生物技术和食品加工行业发现许多应用,它在其中赢得“肉胶”的绰号。肽交联活性已经显示出可用于各种工业目的,包括食品加工、生物技术、药品、医疗器械、个人和家用用品以及皮革和纺织品处理。最常用的Tgase是来自茂原链霉菌的微生物转谷氨酰胺酶,其具有SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列并在下文中称为Tgase。

[0007] 赖氨酰氧化酶(LOX)(也被称为蛋白质-赖氨酸6-氧化酶)是铜依赖性酶,其催化胶原和弹性蛋白前体中的赖氨酸残基形成醛。这些醛是高度反应性的,并与其他赖氨酰氧化酶衍生的醛残基或未修饰的赖氨酸残基经历自发的化学反应。这导致胶原和弹性蛋白交联。LOX蛋白已经在动物、其他真核生物以及细菌和古细菌中被发现(在Grau-Bove,et al.(2015)Scientific Reports 5:Article number:10568中综述)。

[0008] 半永久性个人护理产品在希望在日常工作中投入较少精力的那些消费者中越来越受欢迎。此外,防水和防汗的化妆品长期以来一直受到消费者和产品配方师的追捧,以实现所应用的化妆品和染料的持久效果。在这种情况下,疏水性硅树脂的使用已被广泛用于实现更持久的效果。化妆品的缺点是在应用后无法维持最初或新鲜应用的外观。液体和粉末化妆品中的应用产品位于皮肤之上,并且因此具有从皮肤、嘴唇和/或毛发上容易转移到与其接触的物体上,如玻璃器皿、杯子、织物或其他皮肤的倾向。持久唇膏、唇彩和染色剂利

用溴酸来使皮肤染色，这可能使皮肤干燥和受刺激。此外，应用产品的移动性通常允许产品容易迁移和/或集中到皮肤和/或嘴唇的细纹、皱纹、褶皱和/或毛孔中，导致不理想的不均匀外观。

[0009] 传统的化妆品粉底通常以液体、半液体或膏、或粉末形式出售。粉末型配制剂可能被认为比液体型配制剂具有更短的使用寿命(即不能提供期望的美容效果那么长)和/或更容易从皮肤到另一个表面的不良转移。这是由于粉末型粉底产品基本上是躺在皮肤表面的单个固体颗粒，几乎无法防止它们被揉搓或擦拭掉。在一天的过程中，该产品暴露于皮脂(由皮肤产生)、水分(汗液、泪液、湿度、雨水、洗涤)和油类(护肤品、其他化妆品)中。因此，常规液体和半液体产品不适合在皮肤上停留超过一天。常规遮瑕膏和粉底的一个共同缺点是，它们可能无意中转移到其他表面(例如，衣服、家具、毛发和身体的其他部位)。此类转移可能导致衣服、家具或其他表面被化妆品弄脏，和/或可能降低化妆品的有效寿命。各种机制都可能导致化妆品从皮肤上不希望出现的转移。例如，皮脂或其他在皮肤上发现的蜡质/油性物质可能阻碍粉底或遮瑕膏附着在皮肤上的能力。在一些情况下，与表面的摩擦可能使遮瑕膏或粉底从皮肤上磨掉。为了克服不良转移的缺点和/或增加产品的有效寿命，“长效”或“无转移”产品是已知的。然而，即使是常规长效或无转移产品，也可能无法提供超过24小时的适当遮盖力和/或美容增强水平，或无法提供适当的对在典型日常活动中皮肤遇到的磨损的抗性。

[0010] 此外，化妆品和其他个人护理产品通常是在同一天内应用和移除。这使得消费者生活中的许多时间点无法享受到产品的益处。

[0011] 因此，将希望提供半永久性化妆品，它能承受使用中的产品通常面临的超过二十四小时的环境损害。此外，将进一步希望提供半永久性化妆品配制剂，它表现出良好磨损抗性。此外，还将希望提供半永久性化妆品配制剂，能够在淋浴和面部清洁过程中经受住暴露于水和肥皂。

[0012] 期望一类新的化妆品和个人护理产品：半永久性的技术，其提供与最初应用产品时相同的效果，持续若干小时或若干天。此类产品不需要每天应用，也不需要常规技术的频繁润色。

[0013] 对将功能性或活性成分与皮肤结合以获得持久效果也很感兴趣。一个此类应用是通过将防晒成分与皮肤蛋白质或外源性蛋白质结合来延长紫外线保护，以达到持久保护和减少成分的皮肤渗透。

[0014] 过将这些成分锚定在高分子量、美容上可接受的肽或蛋白质上，对防止外用活性成分或功能性成分渗透皮肤也很感兴趣。例如，在局部应用前或在局部应用时将化学遮光剂分子与蛋白质或肽结合，将防止这些成分渗透和吸收到血液中(图1)。FDA最近的一项专论裁决表明，12种化学遮光剂在单次应用后在血液中的含量高于可接受水平(https://www.fda.gov/news-events/fda-voices/shedding-more-light-sunscreen-absorption)。将这些遮光剂成分锚定在高分子量的蛋白质或肽上，可以防止它们通过皮肤吸收并进入血液，提高化学遮光剂对消费者的安全性并满足监管要求。

[0015] 对向动物基产品添加颜色或对其进行染色也很感兴趣，这些产品由与人皮肤中发现的蛋白质(例如胶原、角蛋白、弹性蛋白)或类似的天然衍生结构蛋白(例如丝)组成。例如，将颜色永久粘合到皮革，丝绸，羊毛或其混纺织物上，而不使用有可能通过引起不良的

收缩,卷曲或伸长来损坏这些天然纤维的传统染色技术的能力,将是可取的。此外,这些织物的染色过程是环境污染物的一大来源,正在推动纺织和时尚行业寻找合适的替代方法。对于制造商,能够对这些织物进行染色以设计出具有时尚和视觉吸引力的服装和其他纺织品同样重要。

[0016] 对用天然染料增强食品颜色的能力也很感兴趣,这些染料在最终制备的产品中不转移或渗出,特别是当其与肉类和加工肉类产品有关时。由动物来源的皮肤纤维组成(胶原)制成的可食用食品肠衣越来越多地被用于生产法兰克福香肠和维也纳香肠,例如,在德国专利号972,854中描述了其制造。此类胶原香肠肠衣的范围从几乎无色到淡黄色,这在视觉上并不吸引人或开胃。在肠衣意在待食用的香肠中,特别是在各种滚烫的香肠如bockwurst中,消费者对颜色强烈的香肠的偏爱越来越明显。因此,在一些国家,如美国、法国和英国,某些香肠如热狗在市场上被染成红色。

[0017] 此类染色方法有若干缺点。首先,仅在非常困难的情况下获得均匀的染色。肠衣上显示染色程度较弱或根本没有染色的区域,这取决于香肠排列的紧密程度以及它们被润湿的充分程度。此外,染料往往既渗出,也迁移到香肠材料中。一种改进的香肠肠衣染色方法将是可取的。

发明内容

[0018] 本文提供了转谷氨酰胺酶(Tgase)酶。该酶是茂原链霉菌Tgase(SEQ ID NO:1)的变体。变体中的一些相比野生型茂原链霉菌酶表现出大至少约1.2倍或至少约2倍,例如,约1.2倍至约10倍的转酰胺活性的改善(酶活性改善至少约或大于约20%、50%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%中的任一项)。

[0019] 希望转谷氨酰胺酶具有较高的比活性,以允许在转酰胺反应中用较少量的酶将谷氨酰胺供体底物与胺底物交联,从而降低产品开发的成本。此外,鉴定表现出更高的初始速率以提供更短的反应时间的转谷氨酰胺酶的突变变体是有益的。此类变体可以促进快速交联以用于应用,如微生物控制。一个实例是保存,其中蛋白质如细胞表面蛋白的快速交联导致优越的微生物控制,诸如但不限于,更快或更有效的微生物杀伤率。在其他实施方案中,转谷氨酰胺酶变体可以用于应用,如染料分子或色素与胶原、角蛋白、弹性蛋白和/或其他结构性或附属的皮肤、毛发或指甲蛋白或肽的结合,它们可以在产品配制剂中或在皮肤、毛发或指甲表面找到,如用于功能性成分、颜色、染料或色素在持久局部应用产品中的半永久性或永久性应用的结合剂。

[0020] 在一个方面,提供了茂原链霉菌Tgase酶的变体。在一些实施方案中,该变体包含以下或由以下组成:相对于野生型酶序列(SEQ ID NO:1),(i)S199G和S299V(SEQ ID NO:2);(ii)H289V和S299A(SEQ ID NO:3);(iii)N292M、H289T和S299V(SEQ ID NO:4);(iv)N282E、H289V和S299K(SEQ ID NO:5);(v)S284D、H289L和S299K(SEQ ID NO:6);(vi)N282E、H289I和S299K(SEQ ID NO:7);(vii)N282K、G283A和S299V(SEQ ID NO:8);(viii)N282Q、S284P、H289E和S299V(SEQ ID NO:9);(ix)N282K、G283A、S284P和S299V(SEQ ID NO:10);(x)N282R、G283A、S284E、H289Q和S299V(SEQ ID NO:11);(xi)S199A和S299A(SEQ ID NO:12);(xii)S199A和S299E(SEQ ID NO:13);(xiii)S199A和S299K(SEQ ID NO:14);(xiv)S199A和S299V(SEQ ID NO:15);(xv)S199G和S299A(SEQ ID NO:16);(xvi)S199G和S299K

(SEQ ID NO:17)；(xvii)S2P、S199A和S299A(SEQ ID NO:18)；(xviii)S2P、S199A和S299E(SEQ ID NO:19)；(xix)S2P、S199A和S299K(SEQ ID NO:20)；(xx)S2P、S199A和S299V(SEQ ID NO:21)；(xxi)S2P、S199G和S299A (SEQ ID NO:22)；(xxii)S2P、S199G和S299E(SEQ ID NO:23)；(xxiii)S2P、S199G和S299K(SEQ ID NO:24)；(xxiv)S2P、S199G和S299V(SEQ ID NO:25)；(xxv)N292D、G283A、S284A和S299V(SEQ ID NO:26)；或(xxvi)S199G和S299E(SEQ ID NO:27)，或在氨基酸序列的其余部分内具有所公开的突变和一个或多个保守取代，例如，具有所公开的突变和与所公开的氨基酸序列至少约90％、至少约95％或至少约98％的序列同一性，或者是具有所公开的突变的变体的环形置换物(circular permutant)。

[0021] 提供了SEQ ID NO:1中描绘的Tgase序列的变体，其包含以下或由以下组成：199位的氨基酸残基A或G和299位的氨基酸残基A、E、K或V的取代，或者在氨基酸序列的其余部分内具有所公开的突变和一个或多个保守取代，例如，具有所公开的突变和与所公开的氨基酸序列至少约90％、至少约95％或至少约98％的序列同一性，或者是具有所公开的突变的变体的环形置换物。

[0022] 提供了SEQ ID NO:1中描绘的Tgase序列的变体，其包含以下或由以下组成：2位的氨基酸残基C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或199位的Y、A或G和299位的氨基酸残基A、E、K或V的取代，或者在氨基酸序列的其余部分内具有所公开的突变和一个或多个保守取代，例如，具有所公开的突变和与所公开的氨基酸序列至少约90％、至少约95％或至少约98％的序列同一性，或者是具有所公开的突变的变体的环形置换物。

[0023] 提供了SEQ ID NO:1中描绘的Tgase序列的变体，其包含以下或由以下组成：282位的的氨基酸残基E或M，位置289的氨基酸残基I、T或V，以及299位的氨基酸残基K或V的取代，或者在氨基酸序列的其余部分内具有所公开的突变和一个或多个保守取代，例如，具有所公开的突变和与所公开的氨基酸序列至少约90％、至少约95％或至少约98％的序列同一性，或者是具有所公开的突变的变体的环形置换物。

[0024] 在一些实施方案中，如本文所述的变体进一步包含C端多组氨酸序列。在一些实施方案中，如本文所述的变体进一步包含N端甲硫氨酸残基。在一些实施方案中，转谷氨酰胺酶是本文所述的任一个氨基酸序列的环形置换物，任选地进一步包含N端甲硫氨酸残基。在一些实施方案中，转谷氨酰胺酶进一步包含原序列。在一些实施方案中，如本文所公开的变体，或具有所公开的突变和与所公开的氨基酸序列至少约90％、至少约95％或至少约98％的序列同一性的变体，或具有所公开的突变的变体的环形置换物，相比具有SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列的野生型酶具有大至少约2倍的转谷氨酰胺酶活性。

[0025] 在另一个方面，提供了增加产品的保质期和/或消除产品气味的方法。该方法包括以一定量将本文所述的转谷氨酰胺酶变体掺入产品中，所述量与不包含该组合物的相同产品相比有效地防止或减少一种或多种微生物的生长。

[0026] 在另一个方面，提供的产品包含有效量的如本文所述的转谷氨酰胺酶变体，以与不包含该酶的相同产品相比增加产品的保质期。例如，该产品可以是个人护理、家用、工业、食品、医药、化妆品、保健、海洋、油漆、涂料、能源、塑料、包装或农业产品。在一些实施方案中，产品是条皂、液体肥皂、洗手液、术前皮肤消毒剂、清洁湿巾、消毒湿巾、沐浴液、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌皮肤霜、洗发水、护发素、化妆品、除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、外用霜、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏或防晒乳液。在其他实施方案中，该

产品是选自伤口愈合软膏、乳膏和乳液、伤口覆盖物、烧伤伤口膏、绷带、胶带或无菌条的伤口护理产品。

[0027] 在另一个方面，提供了酶组合物，其包含：(i)如本文所述的转谷氨酰胺酶变体酶，包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列或由其组成的转谷氨酰胺酶，包含或由其组成的转谷氨酰胺酶；和(ii)转谷氨酰胺酶的底物，如遮光剂分子、功能性成分、色素或染料分子。在一些实施方案中，遮光剂分子、功能性成分、色素或染料分子与包含游离氨基的分子缀合(图2)。例如，包含游离氨基的分子可以衍生自用接头，如赖氨酸、尸胺、腐胺、肼、己二酸二酰肼、癸二酸二酰肼或六亚甲基二胺的衍生化(图4)。

[0028] 在一些实施方案中，包含游离氨基的分子衍生自式$R(CH_2)_n(NH_2)$的脂肪族胺，其中n是1和30之间的整数，或者n是5和10之间的整数，并且R是功能性成分。先前对这种化学功能的尝试主要是在酚氧处制备氨基甲酸酯，式见图4A。(参见，例如美国专利号5,490,980)。然而，这些化合物尚未被证明是转谷氨酰胺酶的底物。本公开已经成功地证明经由在羟苯甲酮(oxybenzone)或阿伏苯宗(avobenzone)的羰基处与由$(CH2)_n$分隔的二胺进行席夫碱反应的接头(图4B-4C中的式)，其中n是1和30之间的整数，或5和10之间的整数。本公开已经表明，这些含有胺的遮光剂是转谷氨酰胺酶的底物。

[0029] 在一些实施方案中，遮光剂分子、色素或染料分子与具有游离谷氨酰胺侧链的氨基酸、肽或蛋白质缀合(图3)。还提供了包含该酶组合物的化妆品组合物。

[0030] 在另一个方面，提供了将颜色与感兴趣的材料或蛋白质结合的方法。这些方法包括将感兴趣的材料或蛋白质与本文所述的转谷氨酰胺酶变体酶和色素或染料分子接触，其中转谷氨酰胺酶变体酶以有效将色素或染料分子与感兴趣的材料或蛋白质共价结合的量存在(图7和图8)。在一个实施方案中，感兴趣的蛋白质是存在于皮肤中的蛋白质。例如，存在于皮肤中的蛋白质可以是胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。

[0031] 在另一个方面，提供的产品包含有效量的如本文所述的转谷氨酰胺酶变体酶，以在与产品接触时将颜色分子添加到蛋白质或含有蛋白质、肽或氨基酸的感兴趣的材料上。在一些实施方案中，该产品可以是个人护理、化妆品、皮革、食品或农业产品。还提供了修改感兴趣的蛋白质或材料的颜色的方法，其包括使感兴趣的蛋白质或材料与该产品接触。

[0032] 在另一个方面，提供的组合物包含如本文所述的转谷氨酰胺酶变体酶与一种或多种抗微生物酶、肽或蛋白质组合，其中该组合物具有防腐、杀生物、抗微生物或杀病毒活性。在一些实施方案中，抗微生物酶、肽或蛋白质是溶菌酶、几丁质酶、脂肪酶、溶素、溶葡萄球菌素、葡聚糖酶、DNase、RNase、乳铁蛋白、葡萄糖氧化酶、过氧化物酶、乳过氧化物酶、内酯酶、酰化酶、分散素B、a-淀粉酶、纤维素酶、乳链菌肽、细菌素、铁载体、多粘菌素或防御素。

[0033] 在另一个方面，提供了噬菌体，其包含编码如本文所述的转谷氨酰胺酶变体酶的核酸序列。在一个实施方案中，包含该噬菌体的组合物提供抗微生物活性。该组合物可以进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0034] 附图简述

[0035] 纳入本说明书并构成其部分的附图说明了所公开的方法和组合物的若干实施方案，并与描述一起，用于解释所公开的方法和组合物的原理。

[0036] 图1示意性地显示了由转谷氨酰胺酶或赖氨酰氧化酶催化的，与脂肪族二胺$(CH2)_n(NH_2)_2$缀合的遮光剂(其中遮光剂是羟苯甲酮或阿伏苯宗)与示例蛋白质(胶原)的共

价加成，以产生遮光剂-接头-胶原。该酶催化遮光剂分子上的胺基与胶原上的Gln侧链(转谷氨酰胺酶)或Lys侧链(赖氨酰氧化酶)之间的交联。该酶可以是包囊的或未包囊的。

[0037] 图2示意性地显示了由转谷氨酰胺酶催化的遮光剂-接头-NH_2与示例蛋白质(胶原)的共价加成，以产生遮光剂-接头-胶原。该酶催化接头分子上的胺基和胶原上的Gln侧链之间的交联。该酶可以是包囊的或未包囊的。

[0038] 图3示意性地显示了由转谷氨酰胺酶催化的遮光剂-接头-Gln与示例蛋白质(胶原)的共价加成，以产生遮光剂-接头-胶原。该酶催化接头分子上的Gln基团和胶原上的Lys残基的可用胺之间的交联。该酶可以是包囊的或未包囊的。

[0039] 图4A-4C例示了遮光剂和接头分子的式，这些分子可以组合以产生遮光剂-接头加合物。图4A显示了经由在酚醇处的氨基甲酸酯形成使羟苯甲酮功能化的方法，但没有证明与转谷氨酰胺酶有反应性。图4B显示了经由羟苯甲酮的羰基的亚胺形成产生转谷氨酰胺酶相容性胺供体。图4C显示了经由阿伏苯宗的羰基的亚胺形成产生两种转谷氨酰胺酶相容性胺供体的混合物。

[0040] 图5例示了1,6-己二胺(HMDA)与羟苯甲酮的反应，然后是由转谷氨酰胺酶催化的羟苯甲酮-接头加合物与示例蛋白质Cbz-Gln-Gly的共价加成，以产生遮光剂-接头-蛋白质。该酶催化二肽上的Gln侧链和遮光剂-接头上的可用胺基之间的交联。该酶可以是包囊的或未包囊的。

[0041] 图6显示了Tgase催化的羟苯甲酮-接头与Cbz-Gln-Gly偶联的反应产物的表征。该图比较了野生型Tgase、Tgase变体SEQ ID NO:28和没有Tgase的阴性对照之间的遮光剂-接头-蛋白质产物的量。Tgase SEQ ID NO:28相比野生型Tgase含有11倍更多的产物。在没有Tgase的情况下，没有观察到遮光剂-接头-蛋白质的产物。

[0042] 图7示意性地显示了由转谷氨酰胺酶催化的染料-NH_2(TAMRA-尸胺)与胶原的共价加成，以产生染料-胶原。该酶催化了染料分子上的胺基和胶原上的Gln侧链之间的交联。该酶可以是包囊的或未包囊的。

[0043] 图8示意性地显示了在由转谷氨酰胺酶催化的染料-Gln与胶原的共价加成，以产生染料-胶原。该酶催化染料(ZQG-TAMRA)上的Gln侧链和胶原上的Lys、N端或其他胺基之间的交联。该酶可以是包囊的或未包囊的。

[0044] 图9显示了由Tgase变体SEQ ID NO:28(0到0.33％w/v)催化的与胶原板共价结合的溶液中TAMRA-尸胺(1.7g/L)的酶剂量响应。染料(TAMRA-尸胺)通过渐增量的Tgase变体SEQ ID NO:28(从左到右)结合到胶原板上。作为最后列的阴性对照，Tgase由牛血清白蛋白(BSA，0.33％w/v)替换。底行显示了通过磷酸盐缓冲盐水(PBS)的清洗过程去除残留的、未结合的染料后的胶原结合的染料。

[0045] 图10显示了由Tgase变体SEQ ID NO:28催化的短染料标记的肽Cbz-Gln-Gly-TAMRA(2.5g/L)在溶液中与胶原板的共价加成。列1例示了在存在或不存在Tgase的情况下，将添加到胶原板中的缓冲液中的染料(Cbz-Gln-Gly-TAMRA)。列2例示了温育后去除多余的反应混合物。列3表示用PBS的清洗步骤，以去除未结合的染料。列4表示去除多余的未结合的染料后，与胶原结合的染料。在存在Tgase的情况下染料与胶原结合，而在不存在Tgase的情况下，观察到很少或无结合。

[0046] 发明详述

[0047] 本文提供了Tgase酶。该酶是Tgase(SEQ ID NO:1)的变体,并且相比野生型茂原链霉菌酶显示出大至少1.2倍、至少2倍、至少10倍,或至少11倍的转酰胺活性的改善。

[0048] 本文还提供了赖氨酰氧化酶(LOX)的应用,可以利用其形成反应性醛,例如在美容相关的蛋白质(如胶原)上,以与含有亲核剂(如游离R-NH_2)的功能性成分反应。

[0049] 本文所公开的交联酶可以用作新型杀生物剂用于微生物控制,应用于保健品、个人护理或化妆品配制剂、包装(例如,食品、化妆品和药品)、纺织品和皮革生产、油漆和涂料以及海洋应用包括水处理和净化。在一些实施方案中,本文公开的Tgase酶可以用于用染料或蛋白质永久修饰感兴趣的蛋白质,例如,但不限于,角蛋白和胶原。在一些实施方案中,Tgase酶可以用作防腐剂使用。

[0050] 本文公开了茂原链霉菌Tgase的突变体形式的Tgase酶。具体地,本文描述的酶是通过突变野生型Tgase的多肽序列中的至少两个氨基酸,或其环形置换物,并观察谷氨酰胺氨基酸残基和胺(或羟胺)接受体之间的转谷氨酰胺酶转酰胺基活性而获得的蛋白质。

[0051] 具有突变取代的蛋白质的重组表达方法先前已经描述,例如,Molecular Cloning,A Laboratory Manual 4th ed.,Cold Spring Harbor Press(1989),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons(1987-1997)等。点突变体酶可以使用定点诱变或本领域已知的任何其他方法生成。此类方法可以包括但不限于使用试剂盒和市售试剂,如Kunkel法、KLD法或Gapped duplex法,以及试剂盒的实例,例如QuickChange™定点诱变试剂盒(Stratagene)、GeneArt™定点诱变系统(Invitrogen)、Q5®,定点诱变系统(New England Biolabs)、TaKaRa定点诱变系统(Prime STAR®Mutagenesis Basal试剂盒或Muta-Direct ™ Site Directed Mutagenesis Kit(iNtRON),等等。

[0052] 本文提供的组合物和方法用于将功能性成分如紫外线阻隔分子和/或产色分子(如染料和色素分子)共价结合到蛋白质和肽上,在应用如化妆品和/或防晒产品中,用于遮光剂和/或色彩应用和结合到皮肤和皮肤衍生的蛋白质和肽,如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白,以及用于色彩应用和结合到食品,如可食用食品肠衣。

[0053] I.定义

[0054] 除非另有说明,分别地,核酸按5'到3'方向从左到右书写;氨基酸序列按氨基到羧基方向从左到右书写。

[0055] 本文提供的数字范围包括定义该范围的数字。

[0056] “一个”、“一种”和“该”包括复数引用,除非上下文有明确规定。

[0057] 本文使用的术语“约”是指值的正负百分之十(10%)。例如,“约100”是指90和110之间的任何数字。

[0058] 如本文在本说明书和权利要求书中所使用的,短语“和/或”,应理解为是指如此连接的,即在某些情况下是连在一起的,在其他情况下是不连在一起的元素的“任一个或两个”。除了由“和/或”分句具体确定的元素外,其他元素也可以任选地存在,无论是与那些具体确定的元素有关还是无关,除非有明确相反指示。因此,作为非限制性的实例,提及“A和/或B”,当与开放式语言如“包括”一起使用时,在一个实施方案中,可以指没有B的A(任选地包括B以外的元素);在另一个实施方案中,指没有A的B(任选地包括A以外的元素);在又一个实施方案中,同时指A和B(任选地包括其他元素);等等。

[0059] 术语“氨基酸”是指含有均与碳结合的胺基和羧基的分子，该碳被指定为α-碳。合适的30个氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸的D-和L-异构体，以及通过有机合成或其他代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，单个“氨基酸”可能有多个侧链分子，如每个扩展的脂肪族或芳香族骨架可用。除非上下文另有说明，如本文所用，术语氨基酸旨在包括氨基酸类似物。

[0060] 如本文所用，“抗微生物剂”是指旨在杀死或抑制细菌、真菌和病毒生长的物质，例如，根据环境保护署(EPA)的规定。

[0061] 如本文所用，术语“碱基对”或“bp”是指双链DNA分子中的腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)或胞嘧啶(C)与鸟嘌呤(G)的伙伴关系(即氢键配对)。在一些实施方案中，碱基对可以包括A与尿嘧啶(U)配对，例如，在DNA/RNA双链中。

[0062] “珠”是指固体颗粒，包含本文所述的聚合物或由本文所述的聚合物组成。

[0063] 如本文所用，“杀生物剂”是指杀死微生物的物质，例如，根据环境保护署(EPA)的规定。

[0064] “可生物降解”是指能够被微生物(例如细菌)或其他生物体分解的物质。

[0065] “Cbz”是苄氧羰基的缩写。

[0066] 术语“催化剂”是指化学行为体，如分子或大分子结构，其能加快化学反应的速度，在化学反应中，一种或多种反应物被转化为一种或多种产物，而催化剂本身不变成产物，或在化学反应完成后以其他方式发生变化或被消耗。催化剂参与一个化学反应后，由于它没有变化，它可以参与进一步的化学反应，作用于另外的反应物，产生另外的产物。为了加速化学反应，催化剂降低反应路径上的活化能壁垒，使其在较低的温度下发生，或在给定温度下更快地发生。通过这种方式，可以实现系统至化学平衡更迅速的方法。催化剂包括酶，它是蛋白质催化剂。

[0067] “环形置换物”是指与参考序列相比，其氨基酸序列中的氨基酸顺序有所改变的蛋白质。其导致具有不同连接性的蛋白质结构，但与参考蛋白质相比，总体上具有相似的三维(3D)形状。例如，N端的片段可能被移到蛋白质氨基酸序列的C端末端。

[0068] “着色剂”或“产色分子”是指为哺乳动物(如人)的皮肤、毛发或指甲赋予颜色的分子或化合物。着色剂可以包括染料和/或色素。着色剂的非限制性实例包括苯酚、萘酚和羟基偶氮衍生物。如本文所讨论的，着色剂可以被修饰为包括氨基(例如，烷基氨基、烷基肼、烷基酰肼或烷氧基胺分子)，直接附接到着色剂上或经由附接到着色剂上的接头间接附接。

[0069] 如本文所用，术语“组合物”是指两种或多种物质的组合，例如，包括本文所述的一种或多种交联酶和一种或多种发色团，如紫外线阻隔分子、染料、色素或其他产色分子的组合。

[0070] “保守性修饰”或“保守性取代”是指就多肽而言，用具有类似侧链的另一个氨基酸替换其中的氨基酸。具有类似侧链的氨基酸家族在本领域中是已知的。此类家族包括具有碱性侧链(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(甘氨酸、丙氨酸。缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、支链(苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)，小侧链(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸)、改变链向的侧链(甘氨酸、脯氨酸)和芳香侧链(酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)的氨基酸。

[0071] 术语“衍生自”包括术语“起源于”、“获得自”、“可获得自”、“分离自”、“纯化自”和“创造自”，并通常表示一种特定材料在另一种特定材料中找到其来源或具有可以参照另一种特定材料描述的特征。

[0072] 本文的术语“双链体”是指存在于两个多核苷酸序列之间的互补区域。术语“双链体区”是指存在于两个寡核苷酸或单个寡核苷酸的两部分之间的序列互补区。

[0073] “染料”是指有色物质，例如，用于某种物质添加颜色或改变其颜色的天然或合成物质，其通常是水溶性有机分子。

[0074] 如本文所用，“有效量”是指本文所公开的足以防止或抑制微生物生长的防腐剂组合物的量(例如，最小抑制浓度(MIC))。本文所述的防腐剂组合物可以对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母和/或霉菌具有活性。

[0075] “润肤剂”是外部应用的药剂，可以软化或舒缓皮肤，并且在本领域中通常是已知的并列在汇编中，如“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，4th Ed.，Pharmaceutical Press，2003。

[0076] “乳化剂”是表面活性物质，促进一种液体悬浮在另一种液体中，并促进疏水性和亲水性物质(如油和水)形成稳定的混合物，或乳剂。

[0077] 如本文所用，“包囊(encapsulate)”或“包囊(encapsulation)”是指将酶夹在或封闭在基质中。基质可以是单独的聚合物，也可以是具有交联剂的聚合物，以将酶共价结合到聚合物上，或基质的多孔聚合物网络结构上，或含有酶的半透膜涂层上。

[0078] 如本文所用，术语“表达”是指根据基因的核酸序列产生多肽的过程。该过程包括转录和翻译。

[0079] “功能性成分”是指在产品中执行或完成特定功能，以向消费者提供益处的成分。例如，遮光剂分子阻隔紫外线辐射，色素或染料分子改变皮肤、毛发或指甲的颜色。

[0080] “基因”是指参与产生多肽的DNA片段，包括编码区之前和之后的区，以及个体编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0081] “家用产品”是指除个人护理产品以外的、将由个人消费者使用的产品。

[0082] “杂交”和“退火”是指其中一个或多个多核苷酸反应以形成经由核苷酸残基之间的氢键稳定的复合物的反应。氢键可以通过Watson Crick碱基配对、Hoogstein结合或任何其他序列特异性方式发生。复合物可以包括形成双链体结构的两条核酸链、形成多链复合物的三条或更多条链、单个自我杂交的链，或这些的任何组合。杂交反应可以构成更广泛的过程中的步骤，如启动聚合酶链式反应(PCR)、连接反应、测序反应或裂解反应，如核酸酶对多核苷酸的酶切。可以经由氢键与第二序列的核苷酸残基稳定的第一核酸序列被称为与第二序列“可杂交”。在此类情况下，第二序列也可以说是与第一序列可杂交的。术语“杂交”是指在复合物中的多核苷酸经由核苷酸残基之间的氢键稳定。

[0083] “工业产品”是指用于工业的产品。

[0084] 本文使用的术语“分离的”、“纯化的”、“分开的”和“回收的”是指从至少一种与其天然相关的组分中去除的材料(例如蛋白质、核酸或细胞)，例如，其浓度为含有其的样品的至少90％，或至少95％，或至少98％重量。例如，这些术语可以指实质上或基本上不含通常在其原始状态(诸如例如完整的生物系统)下发现的组分的材料。分离的核酸分子包括在通常表达该核酸分子的细胞中含有的核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或不同于其天

然染色体位置的染色体位置。

[0085] “成熟的”多肽、蛋白质或酶是指酶原或原蛋白在切割其原序列后或没有原序列时的活化形式。在一些实施方案中，成熟的酶可以作为分离的多肽从原序列中产生，以便消除翻译后加工(活化)步骤。

[0086] “微珠”是指最大尺寸小于一毫米的珠。

[0087] 术语“微生物(microorganism)”和“微生物(microbe)”可以包括细菌、原生动物、真菌、藻类、变形虫、病毒和霉菌等生命形式。

[0088] 本文的术语“突变”是指引入亲本序列的变化，包括但不限于取代、插入和缺失(包括截短)，从而产生“突变体”。突变的后果包括但不限于创建亲本序列所编码的蛋白质中未发现的新特征、性质、功能、表型或性状。

[0089] 本文的术语“核苷酸”是指DNA或RNA的单体单位，由糖基(戊糖)、磷酸盐和含氮杂环碱基组成。碱基通过糖基碳(戊糖的1′碳)与糖基相连，碱基和糖的组合是核苷。当核苷含有与戊糖的3’30或5’位置结合的磷酸盐基团时，它被称为核苷酸。聚合操作连接的核苷酸的序列在本文中通常被称为“碱基序列”、“核苷酸序列”、“多核苷酸序列”、“寡核苷酸序列”或核酸或多核苷酸“链”，并在本文中由以下式表示，其从左到右的定向是常规的5’端到3’端的方向，分别指聚合序列的“5’”和“3’”末端的末端5’磷酸酯基和末端3’羟基。

[0090] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事件、情况或材料可能发生或存在，或者可能不发生或不存在，并且描述包括事件、情况或材料发生或存在的实例以及其不发生或不存在的实例。

[0091] 如本文在本说明书和权利要求书中所使用的，“或”应理解为具有与上述定义的“和/或”相同的含义。例如，在分隔列表中的项目时，“或”或“和/或”应解释为包容性的，即包括若干元素或元素列表至少一个，但也包括一个以上，以及任选的另外未列出的项目。只有明确表示相反的术语，如“仅一个”或“恰好一个”，或在权利要求书中使用时，“由……组成”，将指包含若干元素或元素列表中的恰好一个元素。一般来说，当前面有排他性的术语，如“任一”、“其中之一”、“仅一个”或“恰好一个”时，本文使用的术语“或”只应解释为表示排他性的选择(即“一个或另一个，但不是两个”)。在权利要求书中使用的“基本上由……组成”，应具有专利法领域中使用的普通含义。

[0092] 如本文所用，“病原体”是指可以引起人、动物和/或植物患病的微生物(如细菌、病毒或寄生物)。

[0093] “肽”是指由在一条链中连接的两个或更多个氨基酸组成的化合物，每个酸的羧基通过R-OC-NH-R’型的键与下一个酸的氨基连接，例如，约2至约50个氨基酸。

[0094] 如本文所用，“永久性”是指通过化学共价键而不是物理沉积或吸附，遮光剂分子或颜色分子如染料或色素分子在表面或蛋白质分子上的键合应用。

[0095] “色素”是指提供颜色的材料，例如，作为波长选择吸收的结果，改变反射或透射光的颜色的材料，它通常是不溶于水的无机物，诸如，但不限于，矿物或金属盐。

[0096] 本文的术语“聚合酶”是指催化核苷酸聚合的酶(即聚合酶活性)。术语聚合酶包括DNA聚合酶、RNA聚合酶和逆转录酶。“DNA聚合酶”催化脱氧核糖核苷酸的聚合。“RNA聚合酶”催化核糖核苷酸的聚合。“逆转录酶”催化与RNA模板互补的脱氧核糖核苷酸的聚合。

[0097] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸

的聚合形式，脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构，并且可以执行任何已知或未知的功能，可以是单链或多链(例如单链、双链、三螺旋等)，并且可以含有脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的类似物或修饰形式，包括修饰的核苷酸或碱基或其类似物。由于遗传密码是简并的，可以使用一个以上的密码子来编码特定的氨基酸，本发明涵盖编码特定氨基酸序列的多核苷酸。可以使用任何类型的修饰核苷酸或核苷酸类似物，只要多核苷酸在使用条件下保留期望的功能，包括增加核酸酶抗性的修饰(例如脱氧、2'-O-Me、硫代磷酸酯等)。为了检测或捕捉的目的，也可以掺入标签，例如，放射性或非放射性标签或锚，例如生物素。术语多核苷酸还包括肽核酸(PNA)。多核苷酸可以是天然存在的或非天然存在的。多核苷酸可以含有RNA、DNA或两者，和/或其修饰形式和/或类似物。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。一个或多个磷酸二酯键联可以由替代连接基团所替换。这些替代连接基团包括但不限于以下实施方案：磷酸酯由P(O)S(“硫酸盐”)、P(S)S(“二硫酸盐”)、(O)NR2(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH2(“缩醛(formacetal)”)替换，其中每个R或R'独立地是H或取代或未取代的烷基(1-20C)，任选地含有醚(-O-)键联、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段的编码或非编码区、基因间DNA、由连锁分析定义的位点(一个位点)、外显子、内含子、信使RNA (mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、小核仁RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针、衔接物和引物。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在，可以在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。聚合后，多核苷酸可以被进一步修饰，如通过与标记组分、标签、反应性部分或结合伙伴的缀合。如果提供多核苷酸序列，除非另有说明，否则按5'至3'方向列出。

[0098] 如本文所用，“多肽”是指由氨基酸组成的并且被本领域技术人员认定为蛋白质的组合物。本文使用常规的用于氨基酸残基的单字母或三字母编码。术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性或分支的，其可以包括改性氨基酸，并且其可以被非氨基酸中断。该术语还包括已经天然改性或通过干预改性的氨基酸聚合物；例如，二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化，或任何其他操作或修饰，如与标记组分的缀合。此外，定义中还包括，例如，含有一个或多个氨基酸类似物的多肽(包括，例如，非天然氨基酸等)，以及本领域中已知的其他修饰。

[0099] 如本文所用，“防腐剂”是指药剂，其添加到如本文所述的产品中，以防止(在一段时间内)微生物的生长，或发生不良的化学反应(如氧化或产生气味)，使产品变质或恶化，包括一种或多种效用的恶化。

[0100] 如本文所用，术语“产品”是指具有特定效用的制剂或组合物，如消费者包装的商品。实例包括但不限于个人护理产品、家用产品、化妆品、非处方药物、药物制剂、油漆、涂料、粘合剂和供消费者购买的配制剂。在某些实施方案中，产品包括用于结合遮光剂分子(发色团)、染料或色素或用遮光剂或产色分子修饰蛋白质的组合物，如化妆品或局部应用产品。

[0101] “启动子”是指参与RNA聚合酶启动基因转录的调控序列。启动子可以是诱导型启动子或组成型5启动子。“诱导型启动子”是指在环境或发育调控条件下具有活性的启动子。

[0102] “原序列”是指表达的蛋白质内的多肽序列，例如酶原或原蛋白，如转谷氨酰胺酶，其通常从蛋白质中切割以产生活性蛋白，如酶。在一些实施方案中，原序列可能对蛋白质的正确折叠至关重要。在一些实施方案中，原序列的切割导致非活性酶向活性酶的转变。在一些实施方案中，原序列可以在原蛋白序列内的多个位置被切割，这可能导致相对于天然成熟酶序列的提高的酶活性或稳定性。

[0103] 术语“重组体”是指已经修饰以改变其序列或表达特征的遗传物质(即核酸、其编码的多肽以及包含此类多核苷酸的载体和细胞)，诸如通过突变编码序列以产生改变的多肽、将编码序列与另一个基因的编码序列融合、将基因置于不同的启动子控制之下、在异源生物体中表达基因、以降低或提高的水平表达基因、以不同于其天然表达的方式条件性或组成性表达基因，等等。一般来说，重组核酸、多肽和基于其的细胞经过操作，使得它们与自然界中发现的相关核酸、多肽和细胞不相同。重组细胞也可以被称为“工程化”。

[0104] “可逆可溶性聚合物”是指可以响应于环境中的可控刺激，诸如但不限于pH、温度或离子强度，在溶液中从可溶性材料转换为不溶性材料的聚合物。这种转换过程可以在阶段之间重复循环。

[0105] “保质期”是指物品(例如，如本文所述的产品)保持可使用、适合消费或可销售的时间长度。

[0106] 在至少两种核酸的上下文中，短语“基本相似”和“基本相同”通常是指多核苷酸包括与参考(例如，野生型)多核苷酸或多肽相比，具有至少约35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或甚至99.5％序列一致性的序列。可以使用已知的程序，如使用标准参数的BLAST、ALIGN和CLUSTAL来确定序列同一性。(参见例如Altshul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:403-410;Henikoff et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.89:10915;Karin et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.90:5873;和Higgins et al.(1988)Gene 73:237)。执行BLAST分析的软件通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开可用。同样，可以用FASTA搜索数据库(Pearson et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:2444-2448)。在一些实施方案中，基本相同的核酸分子在严格的条件下(例如，在中到高的严格程度范围内)相互杂交。本文的核酸“合成”是指以模板依赖性方式制备新的多核苷酸链或延长现有多核苷酸(即DNA或RNA)的任何体外方法。根据本发明，合成可以包括扩增，其使用聚合酶增加多核苷酸模板序列的拷贝数。多核苷酸合成(例如扩增)导致将核苷酸掺入多核苷酸(例如从引物延伸)，从而形成与多核苷酸模板互补的新多核苷酸分子。形成的多核苷酸分子及其模板可以用作模板来合成另外的多核苷酸分子。如本文所用，“DNA合成”包括但不限于聚合酶链反应(PCR)，并且可以包括使用标记的核苷酸，例如用于探针和寡核苷酸引物，或用于多核苷酸测序。“在转录控制下”是在本领域很好理解的术语，表示多核苷酸序列的转录取决于其与有助于启动或促进转录的元件可操作地连接。

[0107] “表面活性剂”是降低表面张力并因此提高产品的乳化、发泡、分散、扩散和润湿特性的表面活性剂。

[0108] 术语“遮光剂”是指能够保护和阻隔人皮肤免受紫外线A(UVA)和/或紫外线B(UVB)辐射的有机化合物或有机化合物的混合物。吸收紫外线的遮光剂化合物的非限制性实例包

括苯甲酸盐、羟苯甲酮和肉桂酸。示例性有机遮光剂包括但不限于对氨基苯甲酸、三乙醇胺水杨酸盐、西诺沙酯(cinoxate)、二羟苯宗(dioxybenzone)、恩索利唑(ensulizole)、胡莫柳酯(homosalate)、美拉地酯(meradimate)、辛诺沙酯(octinoxate)、水杨酸辛酯(octisalate)、奥克立林(octocrylene)、padimate O、舒利苯酮(sulisobenzone)、羟苯甲酮和阿伏苯宗。遮光剂可以由食品和药物管理局(FDA)或其他国际监管机构批准,用于阻隔UVA和/或UVB辐射的目的。遮光剂也可以是提供UVA和/或UVB保护,但尚未被FDA或其他国际监管机构批准用于阻隔UVA和/或UVB辐射的目的的分子。遮光剂也可以是具有与FDA或其他国际监管机构批准的分子类似的结构,并且也提供UVA和/或UVB保护的分子(遮光剂类似物)。遮光剂也可以由接头和/或其他小分子修饰,并仍然提供UVA和/或UVB保护,无论是与接头附接还是水解后(遮光剂-接头加合物)。本文的"遮光剂"可以指遮光剂分子、遮光剂类似物和/或遮光剂-接头加合物。如本文所述,遮光剂分子可以被修饰为包括氨基(如烷基氨基、烷基肼、烷基酰肼或烷氧基胺部分),直接附接到遮光剂分子上或经由接头(如作为接头的一部分)间接附接到遮光剂分子上。

[0109] "TAMRA"是羧基四甲基罗丹明的缩写。

[0110] 相关的(和衍生化)蛋白质包括"变体"蛋白质。变体蛋白与另一种(即亲本)蛋白和/或彼此之间的区别在于少量的氨基酸残基。变体与其所衍生自的亲本蛋白相比可以包括一个或多个氨基酸突变(例如,氨基酸的缺失、插入或取代)。替代地或者另外地,变体可以与参考蛋白或核酸具有特定程度的序列同一性,例如,如使用序列比对工具,如BLAST、ALIGN和CLUSTAL(见下文)所确定。例如,变体蛋白或核酸与参考序列具有至少约35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至99.5%的氨基酸序列同一性。

[0111] "酶原"或"原酶"是指酶的非活性前体,其可以通过催化作用,如经由原序列的蛋白水解切割转化为活性酶。

[0112] 除非本文另有定义,与本公开有关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员普遍理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,复数术语应包括单数。本公开的方法和技术通常按照本领域众所周知的常规方法进行。通常,与本文所述的生物化学、酶学、分子和细胞生物学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交有关的术语和技术是本领域众所周知和常用的术语和技术。除非另有说明,本公开的方法和技术通常是根据本领域众所周知的常规方法以及在本说明书中引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献所描述的方法和技术进行的。

[0113] II.转谷氨酰胺酶变体

[0114] 本文提供的Tgase酶是Ca^{2+}非依赖性微生物转谷氨酰胺酶(Tgase)茂原链霉菌的变体。本文公开了相对于茂原链霉菌的野生型酶(SEQ ID NO:1),其酶活性改善至少约1.2倍(20%)或2倍(100%)的Tgase变体。

[0115] 野生型茂原链霉菌Tgase的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:1。本文所述的Tgase变体可以通过突变野生型Tgase多肽序列中的至少两个氨基酸,并观察谷氨酰胺氨基酸残基和胺(或羟胺)接受体之间的转谷氨酰胺酶转酰胺活性而获得。重组表达具有突变取代的蛋白质的方法先前已经描述,并且是本领域众所周知的,例如Molecular Cloning,A Laboratory Manual 4th ed.,Cold Spring Harbor Press(1989),Current Protocols in

Molecular Biology,John Wiley&Sons(1987-1997)等。点突变的组合可以通过一些方法，包括易错PCR、基因改组、分子育种等而生成。

[0116] 相对于SEQ ID NO:1中所列的野生型氨基酸序列,Tgase变体的氨基酸序列以及相对于野生型酶(SEQ ID NO:1)的酶活性改善在表3中公开。

[0117] 本发明的一个Tgase变体,命名为M2,相对于野生型茂原链霉菌Tgase(SEQ ID NO:1)的序列,具有双突变(S199G和S299V)。变体M2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:2。

[0118] 本发明的一个Tgase变体,命名为M3,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(H289V和S299A)。变体M3的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:3。

[0119] 本发明的一个Tgase变体,命名为M4,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有三突变(N282M、H289T和S299V)。变体M4的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:4。

[0120] 本发明的一个Tgase变体,命名为M5,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有三突变(N282E、H289V和S299K)。变体M5的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:5。

[0121] 本发明的一个Tgase变体,命名为M6,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有三突变(S284D、H289L和S299K)。变体M6的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:6。

[0122] 本发明的一个Tgase变体,命名为M7,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有三突变(N282E、H289I和S299K)。变体M7的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:7。

[0123] 本发明的一个Tgase变体,命名为M8,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有四突变(N282K、G283A和S299V)。变体M8的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:8。

[0124] 本发明的一个Tgase变体,命名为M9,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有四突变(N282Q、S284P、H289E和S299V)。变体M9的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:9。

[0125] 本发明的一个Tgase变体,命名为M10,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有四突变(N282K、G283A、S284P和S299V)。变体M10的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:10。

[0126] 本发明的一个Tgase变体,命名为M11,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有五突变(N282R、G283A、S284E、H289Q和S299V)。变体M11的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:11。

[0127] 本发明的一个Tgase变体,命名为M12,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(S199A和S299A)。变体M12的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:12。

[0128] 本发明的一个Tgase变体,命名为M13,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(S199A和S299E)。变体M13的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:13。

[0129] 本发明的一个Tgase变体,命名为M14,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(S199A和S299K)。变体M14的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:14。

[0130] 本发明的一个Tgase变体,命名为M15,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(S199A和S299V)。变体M15的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:15。

[0131] 本发明的一个Tgase变体,命名为M16,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(S199G和S299A)。变体M16的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:16。

[0132] 本发明的一个Tgase变体,命名为M17,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有双突变(S199G和S299K)。变体M17的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:17。

[0133] 本发明的一个Tgase变体,命名为M18,相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列,具有三突变(S2P、S199A和S299A)。变体M18的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:18。

[0134] 本发明的一个Tgase变体，命名为M19，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199A和S299E)。变体M19的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:19。

[0135] 本发明的一个Tgase变体，命名为M20，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199A和S299K)。变体M20的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:20。

[0136] 本发明的一个Tgase变体，命名为M21，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199A和S299V)。变体M21的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:21。

[0137] 本发明的一个Tgase变体，命名为M22，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199G和S299A)。变体M22的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:22。

[0138] 本发明的一个Tgase变体，命名为M23，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199G和S299E)。变体M23的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:23。

[0139] 本发明的一个Tgase变体，命名为M24，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199G和S299K)。变体M24的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:24。

[0140] 本发明的一个Tgase变体，命名为M25，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有三突变(S2P、S199G和S299V)。变体M25的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:25。

[0141] 本发明的一个Tgase变体，命名为M26，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有四突变(N282D、G283A、S284A和S299V)。变体M26的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:26。

[0142] 本发明的一个Tgase变体，命名为M27，相对于野生型茂原链霉菌Tgase的序列，具有双突变(S199G和S299E)。变体M27的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:27。

[0143] 变体M2-M27可以对其进行保守性取代，条件是分别保留它们各自的独特取代：(i)S199G/S299V，(ii)H289V/S299A，(iii)N292M/H289T/S299V，(iv)N282E/H289V/S299K，(v)S284D/H289L/S299K，(vi)N282E/H289I/S299K，(vii)N282K/G283A/S299V，(viii)N282Q/S284P/H289E/S299V，(ix)N282K/G283A/S284P/S299V，(x)N282R/G283A/S284E/H289Q/S299V，(xi)S199A/S299A，(xii)S199A/S299E，(xiii)S199A/S299K，(xiv)S199A/S299V，(xv)S199G/S299A，(xvi)S199G/S299K，(xvii)S2P/S199A/S299A，(xviii)S2P/S199A/S299E，(xix)S2P/S199A/S299K，(xx)S2P/S199A/S299V，(xxi)S2P/S199G/S299A，(xxii)S2P/S199G/S299E，(xxiii)S2P/S199G/S299K，(xxiv)S2P/S199G/S299V，(xxv)N292D/G283A/S284A/S299V，或(xxvi)S199G/S299E。此类变体M2-M27的保守修饰型式包括在本发明的范围内。可以存在复数的保守取代/修饰。变体M2-M27的保守修饰型式可以与它们各自的未修饰序列至少约90％、95％或98％相同，并可以相比野生型转谷氨酰胺酶(SEQ ID NO:1)具有大至少2倍的转谷氨酰胺酶酶活性。

[0144] 本文公开的Tgase变体(例如M2-M27)可以进一步在其C端包含多组氨酸肽延伸，如SEQ ID NO:29的氨基酸残基334-339所例举。多组氨酸肽是用于纯化目的的有用标签并且不影响酶的活性。通常，多组氨酸肽的长度为6-8个残基。

[0145] 本文公开的Tgase变体(例如M2-M27)可以进一步在其N端包含甲硫氨酸残基。成熟的野生型茂原链霉菌Tgase酶缺乏编码该酶的基因序列所编码的N端甲硫氨酸残基。在一些实施方案中，Tgase变体表达为没有N端甲硫氨酸残基的成熟茂原链霉菌Tgase的变体。在其他实施方案中，Tgase表达为具有另外的N端甲硫氨酸残基的成熟Tgase，这可以由表达Tgase的表达载体提供。

[0146] 本文的Tgase变体可以进一步包括原序列。在一些实施方案中，变体与原序列一起

表达,或者作为变体多肽序列的一部分(例如,作为表3中描绘的氨基酸序列的延伸的另外氨基酸序列),或者作为单独的多肽。在一些实施方案中,成熟的变体多肽在多肽Tgase原序列的存在下表达。在一个实施方案中,编码原序列的DNA序列和编码成熟Tgase变体的DNA序列表达为来自同一DNA模板的不连续多肽序列。在另一个实施方案中,编码成熟多肽的DNA序列由第一DNA模板表达,而编码原序列的DNA序列由单独的第二DNA模板表达。在另一个实施方案中,化学合成原序列,并且在成熟多肽的表达之前、期间或之后将其添加表达系统中。在一个实例中,Tgase变体可以在无细胞表达系统中表达,如PCT申请号US20/49226中所公开的,其通过引用其整体并入本文。

[0147] 在一些实施方案中,与同源性原序列,即Tgase酶的天然原序列,即来自同一生物体的野生型Tgase酶的原序列表达,例如重组表达Tgase变体。在其他实施方案中,与异源性原序列,即来自不同生物体的相同酶的原序列或来自相同或不同生物体的不同酶的原序列表达,例如重组表达Tgase变体。

[0148] 在一些实施方案中,Tgase变体可以是本文所述的Tgase变体(例如,表3中所述的变体)的环形置换物。在一些实施方案中,Tgase变体可以是表3中描绘的Tgase变体的环形置换物,任选地进一步包含N端甲硫氨酸残基。与亲本酶,即野生型酶或例如,如表3中描绘的所公开的变体相比,环形置换物可以提供新的底物特异性、产物谱和反应动力学。环形置换物保留亲本酶的相同基本折叠方式,但具有在不同位置的N端,原始N端和C端任选地通过连接序列相连。在Tgase野生型或变体环形置换物中,野生型或变体酶的N端残基被定位在蛋白质中除天然N端外的位点。

[0149] III.抗微生物组合物

[0150] 所公开的是组合物,例如杀生物、防腐、抗微生物、抗细菌、抗病毒(杀病毒)组合物,其包括一种或多种如本文所述的Tgase变体酶,诸如表3中公开的任何变体,任选地具有N端甲硫氨酸残基,包括其环形置换物,并且任选地具有如本文所述的原序列。此类组合物可以包含在待保存的产品中或与之相关(例如,在产品内或与产品相关),例如,用于微生物控制。Tgase变体酶可以催化蛋白质上的氨基酸残基的反应,从而实现例如蛋白质交联或将感兴趣的分子与蛋白质结合。在一些实施方案中,组合物包括一种或多种Tgase变体酶,例如,包含本文所公开的一种或多种Tgase变体或由其组成,其量有效地抑制待保存产品中的微生物(例如,细菌)生长,例如,抑制80%至100%,或至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%中的任一项的微生物生长。

[0151] 防腐剂是添加到产品配方中的抗微生物成分,通过抑制微生物污染物的生长和减少其量来维持产品配制剂的微生物安全。美国药典已经公布化妆品和个人护理产品中防腐剂的可接受微生物存活方案。这些测试包括USP 51(抗微生物有效性测试)和USP 61(微生物限度测试)(https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/Pharmaceutical-Microbiology-Manual.pdf)。

[0152] 本文公开的防腐剂系统的有效性基于对多种微生物的MIC(最低抑制浓度)来确定,包括但不限于革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母和/或霉菌(例如大肠杆菌DH10β、大肠杆菌ATCC 8739、枯草杆菌BGSC 1A976、白色念珠菌ATCC 10231和/或巴西曲霉ATCC 16404)。最小抑制浓度(MIC)被定义为将抑制微生物生长的抗微生物剂的最低浓度。微生物的生长可以通过例如分光光度法(600nm处的光密度)或用细胞存活力测定法(BacTiter

Glo,Promega)来确定。

[0153] 在一些实施方案中,组合物包括一种或多种另外的杀生物酶,如交联酶、氧化酶、核酸酶、水解酶、蛋白酶和/或溶解酶。在一些实施方案中,该组合物进一步包括一种或多种杀生物化学品,诸如,但不限于,壳聚糖、聚赖氨酸和/或季铵化合物。PCT/US20/21211中公开了杀生物酶、组合物和配制剂及其使用方法的示例性但非限制性的实例,其通过引用其整体并入本文。

[0154] 在不希望受理论束缚的情况下,使用杀生物酶通过提供另外的抗微生物作用机制来增强杀生物化学品的抗微生物特性。例如,壳聚糖使细胞膜破裂,导致细胞内容物溢出。交联Tgase酶可以在细胞表面和细胞内交联对细胞功能至关重要的蛋白质。这两种材料一起的组合,减少了所需材料的量,并为酶提供了另外的稳定性,允许其随着时间的推移具有更大的活性(更少的壳聚糖和更少的酶),并减少使用杀生物壳聚糖可能带来的不良效果。

[0155] A.杀生物蛋白和肽

[0156] 在一些实施方案中,该组合物包括一种或多种抗微生物肽。抗微生物肽的实例包括,但不限于,乳链菌肽和片球菌素。

[0157] 在一些实施方案中,该组合物包括一种或多种抗微生物蛋白。抗微生物蛋白的实例包括,但不限于,酪蛋白。

[0158] 可以与本文公开的Tgase变体酶组合使用的已知杀生物酶和抗微生物肽的非限制性实例显示于表1。在一些实施方案中,本文所述的Tgase变体酶可以与表1中描述的一种或多种抗微生物酶、肽或蛋白质组合用于杀生物、防腐、抗细菌或抗病毒(杀病毒)组合物中。

[0159] 表1.具有已知的抗微生物特性的酶、肽和蛋白质

[0160]

机制	酶	描述	引文
溶解性	溶菌酶	由动物产生,作为先天免疫系统的一部分。水解细菌细胞壁中的肽聚糖亚基。	Ibrahim et al. (2001) *FEBS Letters* 506(1):27-32; Małaczewska et al. (2019) *BMC Vet. Res.* 15:318
	几丁质酶	由土壤细菌(包括苏云金芽孢杆菌)分泌,以对抗昆虫和真菌	Martínez-Zavala et al (2020) *Front. Microbiol.* 10:3032
	脂肪酶	水解细胞外脂质和聚合物。	Prabhawathi et al. (2014) *PLoS One* 9(5)
	溶素	被噬菌体利用来水解细菌细胞壁的聚糖组分	Hoops et al. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5, 1388-1394
	溶葡萄球菌酶	金属内肽酶,切割细胞壁肽聚糖中发现的五甘氨酸桥。	Kokai-Kun et al. (2003) *Antimicrob Agents Chermother* **47**(5):1589-1597

[0161]

	葡聚糖酶	由包括芽孢杆菌属种的土壤细菌分泌，以降解真菌细胞壁。还被用作杀藻剂和用于生物膜控制。	Shafi et al. (2017) *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31:3 446-459
核酸酶	DNase	水解细胞外核酸和病毒基因组 DNA。	Kaplan et al. (2012) *J. Antibiot. (Tokyo)* 65(2):73-77
	RNase	水解病毒 RNA。	Wirth (1992) WO1994000016A1
	乳铁蛋白	隔绝必需的铁离子以防止微生物生长。还具有核酸酶活性并且水解生物膜聚合物。	Niaz et al. (2019) *International Journal of Food Properties* 22:1 1626-1641
氧化还原酶	葡萄糖氧化酶	将葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸-δ-内酯和过氧化氢。	Wong et al. (2008) *Appl Microbiol Biotechnol.* 78(6):927-938
	过氧化物酶	氧化惰性底物以形成杀生物活性物质。	Ihalin et al. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.* 445, 261-268
	乳过氧化物酶	氧化惰性底物以形成杀生物活性物质。	White et al. (1983) *Antimicrob Agents Chemother* **32**(2): 267-272
群体猝灭	内酯酶	水解法定群体感应内酯，防止生物膜和致病机制途径的激活。	Schwab et al. (2019) *Front Microbiol.* 10:611
	酰化酶	水解群体感应内酯，防止生物膜和致病机制途径的激活。	Vogel et al. (2020) *Front. Chem.* 8:54
水解酶	分散素 B	水解生物膜聚合物	Izano et al. (2007) *J Dent Res* 86(7):618-622
	α-淀粉酶	水解细胞外多糖。	Craigen et al. (2011) *Open Microbiol J.* 5: 21-31
	纤维素酶	水解生物膜和藻类细胞壁的纤维素成分。	Loiselle et al. (2003) *Biofouling* 19(2):77-85
抗微生物肽	乳链菌肽	增加微生物细胞膜的通透性。	Li et al. (2018) *Appl Environ Microbiol* 18(12)
	细菌素	作用模式包括抑制细胞壁合	Meade et al. (2020) *Antibiotics* 9(1):32

[0162]

		成和增加细胞膜通透性。	
	铁载体	与铁离子结合并隔绝铁离子	Raaska et al. (1999) *J Indust Microbiol Biotechnol* 22, 27-32
	多粘菌素	增加微生物细胞膜的通透性。	Poirel et al. (2017) *Clin Microbiol Rev* 30:577-596
	防御素	增加微生物细胞膜的通透性。	Gans (2003) *Nat Rev Immunol* **3**, 710-720

[0163] B.杀生物化学品

[0164] 在一些实施方案中，本文所述的Tgase变体可以与一种或多种杀生物化学品一起配制，包括但不限于壳聚糖、聚赖氨酸或季铵化合物，例如用作杀生物、防腐、抗细菌或抗病毒(杀病毒)组合物。杀生物化学品的非限制性实例显示于表2。

[0165] 表2.用于抗微生物应用的杀生物化学品的实例

[0166]

分类	化学品
聚合物	壳聚糖
	N,N,N-三甲基壳聚糖
	ε-聚-赖氨酸
	聚乙烯苄基-二甲基丁基氯化铵
	聚乙烯苄基三甲基氯化铵
	季铵聚乙烯亚胺
	季胺化合物(QAC)
	季磷盐改性环氧化天然橡胶
	富含精氨酸-色氨酸的多肽
	胍基化聚甲基丙烯酸酯
	甲基丙烯酸乙酯铵盐均聚物

[0167]

	金属-三吡啶羧甲基纤维素
	聚(正乙烯基咪唑)改性硅橡胶
季铵盐	椰油酰胺丙基甜菜碱
	肉豆蔻酰胺丙基-pg-二甲基氯化铵磷酸酯
	苯扎氯铵
	季铵盐-6
	椰油基甜菜碱
洗涤剂	十二烷基硫酸钠
	十二烷基苯磺酸
离液剂	聚酰胺丙基双胍
	氯化胍
有机酸	乳酸
	柠檬酸
	水杨酸
	山梨酸
	乙酸
	脱氢乙酸
	过氧乙酸
	苯甲酸
酚类和醇类	乙醇
	异丙醇
	二氯苄醇
	甘油
	辛甘醇
	乙基己基甘油
	苄醇
	2-苯氧基乙醇

[0168]

醛类和醛类释放剂	戊二醛
	甲醛
	羟甲基甘油酸钠
	DMDM 乙内酰脲
碱	氢氧化钠
氧化剂	过氧化氢
对羟基苯甲酸酯类	对羟基苯甲酸甲酯
	对羟基苯甲酸乙酯
	对羟基苯甲酸丙酯
杂项	纳他霉素
	苯并异噻唑啉酮
	溴硝丙二醇
	脱水山梨糖醇辛酸酯
	月桂酰精氨酸乙酯
	甲基异噻唑啉酮
	氯化十六烷基吡啶
	氯苯甘醚
	Omamide 锌
	Omamide 钠
	N-(3-氨基丙基)-N-十二烷基丙烷-1,3-二胺
	甲基氯异噻唑啉酮
	2,2-二溴-3-次氮基丙酰胺
	1-十八烷胺, N,N-二甲基-N-[3-(三甲氧基硅基)丙基]-, 氯化物
	皂素
	苯甲酸钠

[0169] 1.季铵化合物

[0170] 含有生物聚合物的季铵化合物,如壳聚糖及其更乙酰化形式甲壳素,因其抗微生

物活性而闻名(Kong,et al.(2010)Int.J.of Food Microbiol.144:51-63)。甲壳素、壳聚糖及其衍生物对不同微生物组,如细菌、酵母和真菌的抗微生物活性是已知的。

[0171] 由于与其他化妆品成分的特定不相容性,季铵化合物(非限制性实例包括氯化十六烷基吡啶、苄索氯铵、氯苄氯铵、聚氨丙基双胍)在个人护理行业的使用有限。

[0172] Lonza的Geogard系列防腐剂混合物在其新产品(Geogard 233S、Geogard 233S、Geogard 233S、Geogard 361)中避免使用对羟基苯甲酸酯,但是,这些抗微生物组合物是基于阳离子苄索氯铵,其可被形成局部个人护理配制剂的重要部分的许多阴离子成分灭活。

[0173] 2.醛类和释放醛类的化合物

[0174] 甲醛被列为第3类CMR(致癌、诱变和生殖毒性)。然而,值得注意的是,少数缓慢释放甲醛的抗微生物剂仍在使用并被商业化生产。由于有效和广泛接受的抗微生物剂的缺乏,该行业被迫继续使用甲醛供体,如DMDM乙内酰脲(CAS 6440-58-0)、咪唑烷基脲和重氮烷基脲(CAS 39236-46-9)。这些物质释放的甲醛能够经由其极反应性的醛羰基功能与若干化妆品成分发生反应。例如,唯一可用且全球批准的紫外线吸收剂阿伏苯宗与甲醛衍生物释放的甲醛发生反应。这对遮光剂配制剂来说是重大缺点。防腐剂混合物,Clariant的Niapaguard PDU和Cognis的Elestab 305,ISP的Germaben II、Germaben H-E,利用对羟基苯甲酸酯与重氮烷基脲的组合。ISP的Germall Plus和Lonza的Glydant Plus利用重氮烷基脲和碘代丙炔基丁基氨基甲酸酯(IPBC)。McIntyre的Paragon系列具有DMDM乙内酰脲和其他抗微生物剂,如对羟基苯甲酸酯、苯氧基乙醇和IPBC。Symrise的Neo-Dragocide和Thor的Microcare IMP利用对羟基苯甲酸酯和咪唑啉基尿素之间的协同作用。

[0175] 3.对羟基苯甲酸酯类

[0176] 对羟基苯甲酸酯是对羟基苯甲酸的酯。对羟基苯甲酸酯化合物尤其包括对羟基苯甲酸甲酯(CAS 99-76-3)、对羟基苯甲酸乙酯(CAS 120-47-8)、对羟基苯甲酸丙酯(CAS 94-13-3)、对羟基苯甲酸丁酯(CAS 94-26-8)、对羟基苯甲酸异丙酯(CAS 4191-73-5)和对羟基苯甲酸苄酯(CAS 94-18-8)。Clariant的“Phenonip”是六种抗微生物剂的混合物,其中五种是对羟基苯甲酸酯。同一公司仅提供对羟基苯甲酸酯的混合物作为“Nipastat”和“Nipasept”,Cognis的Elestab FL 15、Elestab 48、Elestab 50J、Elestab 305、Elestab 388、Elestab 3344、Elestab 4112、Elestab 4121、Elestab 4150Lipo均是在其中具有至少一种对羟基苯甲酸酯的抗微生物剂的混合物。Induchem的Uniphen P23、ISP的Germaben和LiquaPar系列混合物含有若干对羟基苯甲酸酯。Galaxy Surfactants提供的Galguard NK1和Galguard NK2混合物分别基于四种和五种对羟基苯甲酸酯与苯氧基乙醇的混合物。McIntyre/Rhodia来自它们的“Paragon”系列中的五种混合物具有若干对羟基苯甲酸酯。Rohm and Haas的Neolone MXP有对羟基苯甲酸酯与甲基异噻唑啉酮。Symrise公司的Neo-Dragocide系列混合剂含有对羟基苯甲酸酯。Schulke和Mayr的Euxyl K 300具有五种对羟基苯甲酸酯。Thor的Microcare PM4和Microcare PM5分别具有四种和五种对羟基苯甲酸酯。对羟基苯甲酸酯是苯酚衍生物;所有酚类抗微生物剂均具有酚类“羟基”基团,这是极反应性的有机官能团,具有极酸性的氢,pKa为10。

[0177] 4.卤代化合物

[0178] Nalco的Merguard系列(四种混合物)依赖于卤化分子、甲基二溴戊二腈和2-溴-2-硝基-1,3-二醇。来自Schulke和Mayr的Euxyl系列的若干混合物是基于氯代噻唑啉酮、甲基

二溴戊二腈、2-溴-2-硝基-1,3-二醇和重氮烷基脲。来自Thor的Microcare系列采用对羟基苯甲酸酯、2-溴-2-硝基-1,3-二醇、碘代丙炔基丁基氨基甲酸酯(IPBC)、咪唑烷基脲和重氮烷基脲。

[0179] 卤化抗微生物剂的其他实例是氯苯甘醚,以及氯己定。众所周知,与酚类化合物一样,卤代有机分子表现出显著水平的毒性作用。例如,IPBC因其碘含量而具有甲状腺激素紊乱的风险。日本不允许使用这种物质,而欧盟仅允许在免洗产品中使用至多0.02%。类似地,欧盟仅允许在冲洗产品中使用至多0.1%的甲基二溴戊二腈。溴硝丙二醇,2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇,涉及在与一些含氮化妆品成分相互作用时生成致癌性亚硝胺。甲基氯异噻唑啉酮的抗微生物功效非常强大,因此在冲洗产品中仅允许15ppm的浓度。氯甲基异噻唑啉酮确实具有非常广谱的抗微生物活性,但此类强大的抗微生物剂的毒性非常高,因此化妆品配方师不愿意在长期停留在人体皮肤上的化妆品中使用这种强大的抗微生物剂。可以合理地预期,任何低浓度(ppm级)的强效杀菌剂均可能对活生物体的任何其他细胞(包括人细胞)具有相等的杀伤力。这就是为什么在日本,如果产品要与粘膜接触,氯甲基异噻唑啉酮不被允许用于保存的确切原因。

[0180] 卤代化合物包括2,4-二氯苄醇、氯二甲苯酚(也称为4-氯-3,5-二甲基苯酚)、溴硝丙二醇(也称为2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇)、碘丙炔基丁基氨基甲酸酯。

[0181] C.载体递送

[0182] 本文所述的组合物可以包含载体(例如,噬菌体),用于递送编码本文所述的一种或多种杀生物酶(例如,Tgase变体)的遗传物质。

[0183] 如本文所用,“细菌噬菌体”和“噬菌体”可互换使用,指细菌噬菌体分离物,其中的成员具有基本相同的遗传构成,例如共享基因组中至少90%、95%、99%、99.9%中的任一项或更多的序列同一性。“细菌噬菌体”或“噬菌体”是指亲代细菌噬菌体以及其后代或衍生物(如基因工程化型式)。细菌噬菌体可以是天然存在的噬菌体分离物,或工程化噬菌体,包括载体,或编码至少所有必需基因的核酸,或噬菌体的全部基因组,以在宿主细菌内进行噬菌体的生命周期。

[0184] IV.用于将功能分子与蛋白质交联的组合物

[0185] 所公开的是酶组合物,其可以包含在用于长效应用功能性成分的产品中,包括阻隔紫外线的遮光剂,和/或着色剂,如色素或染料。所公开的组合物包括一种或多种交联酶,如Tgase酶(例如本文所公开的Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶,用于使皮肤蛋白或其他含蛋白、肽或氨基酸的材料上的氨基酸残基与感兴趣的分子,如遮光剂,或产色分子,如色素或染料反应的目的。在一些实施方案中,该组合物包括SEQ ID NO:1-29中公开的任何Tgase酶,和/或赖氨酰氧化酶。在一些实施方案中,Tgase和/或赖氨酰氧化酶充当催化剂,将活性或功能性成分(例如遮光剂分子或着色剂)与蛋白质或肽,如哺乳动物(例如人)皮肤、毛发或指甲的蛋白质或肽交联。在一些实施方案中,转谷氨酰胺酶(例如Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶充当催化剂,将活性或功能性成分或接头的氨基(例如烷基氨基、烷基肼、烷基酰肼或烷氧基胺部分)的氨基与皮肤、毛发或指甲蛋白或肽中的氨基酸(例如谷氨酰胺或赖氨酸残基的侧链)交联。

[0186] 皮肤、毛发或指甲蛋白的实例包括但不限于胶原、角蛋白、弹性蛋白和/或角化细胞包膜蛋白,包括伞形蛋白(involucrin)、兜甲蛋白(loricrin)、小的富含脯氨酸的蛋白、

旁血小板溶蛋白(periplakin)、envoplakin和丝聚蛋白(filaggrin)。肽的实例包括但不限于水解胶原、水解角蛋白和/或水解弹性蛋白。在一些实施方案中,该组合物包括紫外线阻隔分子,如遮光剂。在一些实施方案中,该组合物包括着色剂(产色分子),如染料或色素分子。在一些实施方案中,将酶固定化在聚合物支持物上或包囊在聚合物支持物中。在一些实施方案中,该酶是转谷氨酰胺酶。

[0187] 在一些实施方案中,本文所述的组合物包括药学上或美容上可接受的媒介物或载剂,例如,在组合物中充当活性或功能性成分和Tgase和/或赖氨酰氧化酶,或与蛋白质或肽交联的活性或功能性成分的稀释剂或分散剂,例如,当组合物应用于受试者的皮肤、毛发或指甲时,促进或推动活性或功能性成分和交联酶,或与蛋白质或肽交联的活性或功能性成分的分布。药学上或美容上可接受的媒介物或载剂可以包含水或由水组成,并可以包含液体或固体润肤剂、溶剂、湿润剂、增稠剂和/或粉末,并且在一些实施方案中,可以形成按组合物的重量计约10%至约99.9%,或约50%至约99%。在一些实施方案中,该组合物是乳剂的形式,其可以含有油或油性材料,其量按组合物的体积计算高达约90%,或约10%至约80%。在一些实施方案中,该组合物包含一种或多种乳化剂和/或一种或多种表面活性剂。

[0188] 在一些实施方案中,活性或功能性成分包含至少一个烷基-氨基(-RNH_2)、肼、酰肼或羟胺部分,或是直接在活性或功能性成分上,或是间接在附接(例如共价结合)至其的接头上。例如,烷基(R)基团可以是包含1至8个碳原子的脂肪族碳氢链。

[0189] 在某些实施方案中,提供了应用于哺乳动物(例如人)皮肤、毛发或指甲的组合物,其包含(a)有效量的至少一种活性或功能性成分(例如,遮光剂分子或着色剂);和(b)一种或多种转谷氨酰胺酶(例如,如本文所述的Tgase变体或SEQ ID NO:1-29中公开的任何Tgase酶,和/或赖氨酰氧化酶),其量有效催化活性或功能性成分与哺乳动物(例如人)皮肤、毛发或指甲的蛋白质或肽交联。在一些实施方案中,该组合物被配制成局部应用于哺乳动物(例如人)个体的皮肤、毛发或指甲,并且在某些实施方案中可以含有:(c)药学上或可接受的载剂,其量有效地将Tgase和/或赖氨酰氧化酶和活性或功能性成分递送到该个体的皮肤、毛发或指甲。例如,活性或功能性成分可以包括至少一个烷基氨基(-RNH_2)、肼、酰肼或羟胺分子,或是直接在活性或功能性成分上,或是间接在附接(例如共价结合)至其的接头上。

[0190] A.颜色分子

[0191] 本文所述的组合物可以含有一种或多种产色分子,如染料或色素分子,用于应用和结合到表面,如结合到皮肤表面的一种或多种蛋白质,如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白,或结合到食品的可食用外壳,如香肠肠衣。产色分子的非限制性实例在“Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods,Drugs,Cosmetics,and Medical Devices”中描述,美国食品和药物管理局,https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/summary-color-additives-use-united-states-foods-drugs-cosmetics-and-medical-devices。

[0192] B.遮光剂分子和接头

[0193] 本文所述的组合物可以含有一种或多种紫外线阻隔分子,如遮光剂分子,用于应用并结合到产品配制剂内或皮肤表面的蛋白质或肽,如胶原、角蛋白、弹性蛋白、水解胶原、水解角蛋白和/或水解弹性蛋白。

[0194] 遮光剂和/或遮光剂类似物分子的非限制性实例包括但不限于:对氨基苯甲酸、三乙醇胺水杨酸盐、西诺沙酯、二羟苯宗、恩索利唑、胡莫柳酯、美拉地酯、辛诺沙酯、水杨酸辛酯、奥克立林、Padimate O、舒利苯酮、羟苯甲酮和阿伏苯宗。

[0195] 在一些实施方案中,遮光剂用接头分子功能化,以提供一个底物柄,用于与蛋白质或肽的酶促结合。这种功能化的一个非限制性实例可以通过在遮光剂分子和接头之间形成希夫碱来完成。这种功能化的非限制性实例可以通过在遮光剂分子和接头之间形成氨基甲酸酯键联来完成。该接头可以包括用于酶识别的伯胺、肼、酰肼或烷氧基胺部分形式的可用胺。该接头还可以包括用于酶识别的谷氨酰胺残基。接头可以由两个功能性化学末端基团组成,其通过不同长度的脂肪族碳链连接,以原位形成遮光剂分子。接头的非限制性实例包括尸胺、腐胺、肼、己二酸二酰肼、癸二酸二酰肼和六亚甲基二胺。

[0196] 在一些实施方案中,遮光剂-接头加合物与感兴趣的蛋白质或肽结合,并且遮光剂可以随后通过水解释放。在一个实施方案中,遮光剂分子是可水解的或以其他方式从接头中释放出来。在一些实施方案中,遮光剂-接头加合物仍然与蛋白质或肽结合,例如,存在于皮肤上的蛋白质或肽,以提供紫外线阻隔保护。

[0197] C.蛋白质和肽

[0198] 本文所述的组合物可以含有一种或多种用于遮光剂、皮肤护理和/或化妆品产品或应用的感兴趣的蛋白质或肽。用于皮肤护理产品和化妆品的蛋白质和肽的非限制性实例是:胶原、水解胶原、角蛋白、水解角蛋白、弹性蛋白、水解弹性蛋白、丝、水解丝、丝纤维蛋白肽、乙酰六肽-3、乙酰六肽-8、乙酰四肽-5、乙酰四肽-9、乙酰精氨酸色氨酸二苯甘氨酸(acetylarginyltryptophyl diphenylglycine)、铜三肽-1、CT-2、二肽-2、七肽-7、己酰基二肽-3-去甲亮氨酸醋酸酯、六肽-9、六肽-11、锰三肽-1、肉豆蔻六肽-16、肉豆蔻六肽-16、肉豆蔻五肽-17、九肽-1、棕榈酰二肽-5二氨基丁酰羟基苏氨酸、棕榈酰二肽-5-二氨基羟基丁酸酯、棕榈酰六肽-12、棕榈酰六肽-14、棕榈酰六肽-6、棕榈酰五肽-4、棕榈酰四肽-7、棕榈酰三肽-1、棕榈酰三肽-3、棕榈酰三肽-38、五肽-3、五肽-18、sh-寡肽-1、sh-寡肽-2、sh-多肽-1、sh-多肽-11、sh-多肽-9、大豆肽、四肽PKEK、四肽-21、三肽-1、三肽-10瓜氨酸,以及血红蛋白、大米、大豆、小麦蛋白、玉米、纤连蛋白、网硬蛋白、血清蛋白、小麦面筋的改性水解物。

[0199] 本文所述的组合物可以含有一种或多种感兴趣的模型肽。感兴趣的模型肽的非限制性实例包括Cbz-Gln-Gly。

[0200] V.聚合物支持物

[0201] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包括聚合物支持物。将一种或多种本文所述的Tgase酶(例如Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶固定化在支持物上,有或没有接头,或包囊在聚合物支持物内,诸如可逆可溶性聚合物,包括但不限于壳聚糖、羧甲基壳聚糖或聚赖氨酸。聚合物支持物的非限制性实例包括:甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、氧化纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶和羧基纤维素。PCT/US20/21211中描述了聚合物支持物和其中交联酶的固定化或包囊的实例,其通过引用其整体并入本文。

[0202] 在一些实施方案中,将Tgase(例如本文所公开的Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶固定化在颗粒上,例如壳聚糖颗粒,诸如珠,例如壳聚糖珠(例如微珠),或纳米颗粒。例如,珠(例如微珠)可以是可生物降解的。在一些实施方案中,酶可以通过例如利用接头用游

离单体(例如,壳聚糖或羧甲基壳聚糖单体)的包囊来固定化。

[0203] 壳聚糖是葡糖胺和N-乙酰葡糖胺单元的线性氨基多糖,通过对从甲壳类动物(如虾和蟹)的外骨骼以及一些真菌的细胞壁中提取的甲壳素进行碱性去乙酰化而获得。甲壳素是(1→4)连接的2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖(GlcNAc;A-单元)的线性聚合物,不溶于水溶剂。它还与纤维素具有许多结构上的相似性,如单体的构象和二赤糖苷键联。壳聚糖可以被认为是(1→4)连接的A单元和2-氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖(GlcN;D单元)的线性二元共聚物家族。羧甲基壳聚糖(例如,真菌来源),例如,N,O-羧甲基壳聚糖,>80%被羧基取代。

[0204] 含有季铵盐的生物聚合物,如壳聚糖及其更多的乙酰化形式甲壳素,因其抗微生物活性而闻名(Kong,et al.(2010)Int.J.of Food Microbiol.144:51-63)。甲壳素、壳聚糖及其衍生物对不同微生物组,如细菌、酵母和真菌的抗微生物活性是已知的。

[0205] 甲壳素、壳聚糖和其他相关聚合物是固定化酶的优越支架(Muzzarelli(1980)Enzyme Microb.Technol.2:177-184)。已将酪氨酸酶固定化在壳聚糖上,用于工业废物的脱酚(Dinçer,et al.(2012)Int.J.Biol.Macromol.50:815-820)和用于苯酚化合物的光学检测(Abdullah,et al.(2006)Sensors and Actuators B:Chemical 114:604-609)。在这些实例中,酪氨酸酶或者直接连接到壳聚糖支持物上而没有接头,或者使用戊二醛作为接头以将酶固定化在壳聚糖上。此外,酪氨酸酶-壳聚糖生物催化剂已被探索用于生产L-DOPA(Carvalho,et al.,Appl.Biochem.Biotechnol.(2000)84-86:791-800)。已使用戊二醛作为接头将微生物转谷氨酰胺酶固定化在壳聚糖上,用于食品蛋白质的脱酰胺化(Nonaka,et al.(1996)Biosci,Biotechnol,and Biochem.60:532-533),使用Chitopearl 3007,一种壳聚糖的微珠形式,作为聚合物支持物,用戊二醛作为接头。聚合物支持物的实例在,例如,Nonaka,et al.(1996)Biosci,Biotechnol,and Biochem.60:532-533和Hayashi,T et al.(1991)J Appl Polymer Sci 42:85-92中提供,其通过引用其整体并入本文。

[0206] A.用于将酶固定化在聚合物支持物上的接头

[0207] 在一些实施方案中,一种或多种Tgase酶(例如本文所公开的Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶经由化学接头固定化在聚合物上,该接头将酶与聚合物共价连接。在一些实施方案中,接头是亚烷基(例如亚甲基)、二亚胺(1,5-二亚胺)、二胺(1,5-二胺)、二羰基(例如1,4-二羰基)、酰胺键、多肽、烷基接头,或含有苯基、融合杂环或芳香族基团。

[0208] 可以用于提供接头的试剂的实例包括但不限于:甲醛、戊二醛、琥珀酸酐、酚类化合物、genipin、碳二亚胺试剂、蛋白质或肽(例如,玉米醇溶蛋白、明胶、胶原)。

[0209] 在一些实施方案中,连接试剂是genepin、环氧氯丙烷、甲醛或戊二醛。

[0210] 在一些实施方案中,Tgase(例如Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶与载剂(聚合物支持物)共价连接而不使用接头。

[0211] VI.产品

[0212] 在一些实施方案中,本文公开的产品包括个人护理产品、家用产品、工业食品、药品、化妆品、保健品、海洋、油漆、涂料、粘合剂、能源、塑料、包装或农业产品,任选地固定化在聚合物支持物上或包囊在聚合物支持物中,其中包括有效量,例如,约0.0001%w/v至约5%w/v的一种或多种本文所述的Tgase变体酶,或本文所述的其组合物,以在产品中充当抗微生物剂,例如,防腐剂。

[0213] 在一些实施方案中，本文公开的产品包括化妆品和个人护理产品，其包含本文所述的组合物，组合物包含一种或多种Tgase酶(例如，本文所述的Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶，任选地固定化在聚合物支持物上或包囊在聚合物支持物中，以及一种或多种活性或功能性成分，其可以包括遮光剂和/或产色分子，其量有效地将遮光剂分子或颜色结合到表面，诸如共价结合到皮肤表面或产品配制剂内的一种或多种皮肤衍生的蛋白质或肽，例如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。在一些实施方案中，产品组合物包括SEQ ID NO:1-29中公开的Tgase酶中的任一种，和/或赖氨酰氧化酶。在一些实施方案中，Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶的有效量在约0.0001％至约5％w/v的范围内，诸如约0.001％至约1％或约0.01％至0.1％，按组合物的重量计。在一些实施方案中，活性或功能性成分(例如遮光剂分子或着色剂)以有效，例如对毛发、皮肤或指甲蛋白或肽或对组合物局部应用的个体的毛发、皮肤或指甲提供益处，例如紫外线保护益处或美容或审美益处的量存在于组合物中。在一些实施方案中，活性或功能性成分(例如，遮光剂分子或着色剂)的有效量在约0.1％至约70％的范围内，诸如约1％至约35％，按组合物的重量计。

[0214] 在一些实施方案中，本文所述的一种或多种Tgase变体包含在个人护理产品中，例如但不限于条皂、液体肥皂(例如，洗手皂)、手部消毒剂(包括冲洗和留置酒精基和水性基手部消毒剂)、术前皮肤消毒剂、清洁湿巾、消毒湿巾、沐浴液、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌护肤霜、洗发水、护发素、化妆品(包括但不限于液体或粉状粉底、液体或固体眼线、睫毛膏、眼影膏、有色粉末、可干用或湿用的“薄饼”型粉末、卸妆产品等)、除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、外用乳膏、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏、防晒霜和婴儿产品，诸如但不限于清洁湿巾、婴儿洗发水、婴儿皂和尿布霜。在一些实施方案中，一种或多种Tgase变体包含在伤口护理用品中，诸如但不限于伤口愈合软膏、霜和乳液、伤口覆盖物、烧伤伤口霜、绷带、胶带和无菌条，以及医疗用品，如医用袍、帽子、面罩和鞋套、手术滴剂等。在一些实施方案中，一种或多种Tgase变体包含在口腔护理产品中，如漱口水、牙膏或牙线涂层、兽用或宠物护理产品、防腐剂组合物或表面消毒剂，如消毒剂溶液、喷雾或擦拭剂。

[0215] 在一些实施方案中，将本文所述的一种或多种Tgase变体掺入家用或工业产品中，例如，作为防腐物质。例如，Tgase变体可以包含在家用清洁剂中，如浓缩液体清洁剂或喷雾清洁剂、清洁湿巾、洗碗液、洗碗机洗涤剂、喷雾拖把液、家具抛光剂、室内油漆、室外油漆、除尘喷雾、衣物洗涤剂、织物软化剂、地毯/织物清洁剂、窗户和玻璃清洁剂、马桶清洁剂、液体/乳膏清洁剂等。在一些实施方案中，一种或多种Tgase变体可以包含在食品清洁产品中，例如，设计用于在食用、包装和食品涂层之前清洁水果和蔬菜。

[0216] 可以掺入本文所述的Tgase变体的其他产品包括但不限于食品、药品、化妆品、保健品、海洋、油漆、涂料、能源(例如压裂液)、塑料、包装和农业产品。在一些实施方案中，可以将Tgase变体掺入HVAC系统、冷却池、水净化系统中，或可以用于工业应用，诸如但不限于，纸浆和纸张加工。

[0217] 本文公开的产品包括化妆品和个人护理产品，其包含Tgase酶(例如本文所述的Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶，或本文所述的其组合物，以及一种或多种产色分子，其量有效地将颜色结合到表面，例如共价结合到皮肤的一种或多种蛋白质，例如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白，或食品的蛋白质，如加工食品的可食用外壳，如香肠肠衣。在一些实施方案中，产品组合物包括SEQ ID NO:1-29中公开的Tgase酶中的任一种，和/或赖氨酰氧化酶。在

一些实施方案中，Tgase酶(例如Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶的有效量高达约1％w/v。

[0218] 本文公开的产品可以包含一种或多种Tgase变体酶，任选地固定化在聚合物支持物上或包囊在聚合物支持物中，以及一种或多种功能性成分，包括遮光剂和/或产色分子，其量有效地将遮光剂和/或产色分子结合到表面。在一些实施方案中，该产品将遮光剂分子共价结合到产品配制剂中的皮肤衍生的蛋白质，如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。在一些实施方案中，该产品将遮光剂分子共价结合到皮肤蛋白，如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。在一些实施方案中，该产品将颜色共价结合到皮肤蛋白，如胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。在一些实施方案中，产品含有具有接头的功能性成分，其足以与皮肤表面的天然酶反应以与皮肤的蛋白质交联。在一些实施方案中，该产品将颜色价结合到食品的蛋白质，如加工食品的可食用外壳，如香肠肠衣。在一些实施方案中，交联酶(例如转谷氨酰胺酶)的有效量在约0.001至约20％w/v的范围内，如约0.01％至约5％，按组合物的重量计。

[0219] 在一些实施方案中，包括本文所述Tgase变体的产品或组合物，进一步包含一种或多种另外的酶，其选自酰基转移酶、α-淀粉酶、β-淀粉酶、α-半乳糖苷酶。阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、β-半乳糖苷酶、卡拉胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内-β-1,4-葡聚糖酶、内-β-甘露聚糖酶、酯酶、外-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖糖化酶、半纤维素酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂氧合酶、甘露聚糖酶、氧化酶、果胶裂解酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊糖酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、β-葡聚糖酶、鞣酸酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶(xyloglucanase)、木糖苷酶、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶，或其组合。

[0220] 在一些实施方案中，Tgase变体酶，如表3中公开的任何变体，任选地具有N端甲硫氨酸残基，包括其环形置换物，并且任选地具有本文所述的原序列，或本文所述的其组合物，作为抗微生物剂包含在本文公开的任何产品中，其浓度为至少约0.0001％w/v、0.0005％w/v、0.001％w/v、0.005％w/v、0.01％w/v、0.05％w/v、0.1％w/v、0.5％w/v、1％w/v、1.5％w/v、2％w/v、2.5％w/v、3.5％w/v、4％w/v、4.5％w/v或5％w/v中的任一项。在一些实施方案中，以约0.0001％w/v至约0.0005％w/v、约0.001％w/v至约0.005％w/v、约0.005％w/v至约0.01％w/v、约0.01％w/v至约0.05％w/v、约0.05％w/v至约0.1％w/v、约0.1％w/v至约0.5％w/v、约0.5％w/v至约1％w/v、约1％w/v至约1.5％w/v、约1.5％w/v至约2％w/v、约2％w/v至约2.5％w/v、约2.5％w/v至约3％w/v、约3％w/v至约3.5％w/v、约3.5％w/v至约4％w/v、约4％w/v至约4.5％w/v、约4.5％w/v至约5％w/v、约0.0001％w/v至约0.001％w/v、约0.001％w/v至约0.01％w/v、约0.01％w/v至约0.1％w/v、约0.1％w/v至约1％w/v、约1％w/v至约2.5％w/v、约2.5％w/v至约5％w/v，或约1％w/v至约5％w/v的浓度包含Tgase变体酶或其组合物。

[0221] 在一些实施方案中，本文所述的Tgase变体酶或其组合物作为抗微生物剂的产品不包括石油化学衍生的防腐物质，诸如但不限于对羟基苯甲酸酯、甲醛和甲醛释放剂、异噻唑啉酮、苯氧基乙醇和/或有机酸(如苯甲酸钠)。在一些实施方案中，单独或与杀生物化学品(例如壳聚糖)组合的本文所述的Tgase变体酶，是产品中唯一的抗微生物剂，例如抗细菌剂或防腐剂。在一些实施方案中，包含与一种或多种另外的抗微生物剂，诸如但不限于一种或多种石油化学衍生的防腐物质组合作为抗微生物剂的本文所述的Tgase变体酶。在一些实施方案中，包含与一种或多种另外的抗微生物剂，诸如但不限于一种或多种石油化学衍

生的防腐物质组合作为抗微生物剂的本文所述的Tgase变体酶。

[0222] 在一些实施方案中,防腐剂混合物与产品相容,对氧化剂或还原剂稳定,并且对各种产品的正常pH范围(4.5至8.0)稳定。

[0223] 其中可以掺入本文所述的Tgase变体的产品的非限制性实例描述于PCT申请号PCT/US20/21211和美国临时申请号63/075,763中,其通过引用其整体并入本文。

[0224] A.个人护理产品

[0225] 可以将本文所述的Tgase变体酶或其组合物,例如,防腐剂组合物,掺入任何个人护理产品中。其中可以掺入所公开的Tgase变体酶组合物的个人护理产品包括但不限于,条皂、液体肥皂(例如,洗手皂)、手部消毒剂(包括冲洗和留置酒精基和水性基手部消毒剂)、术前皮肤消毒剂、清洁湿巾、消毒湿巾、沐浴液、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌护肤霜、洗发水、护发素、化妆品(包括但不限于液体或粉状粉底、液体或固体眼线、睫毛膏、眼影膏、有色粉末、可干用或湿用的“薄饼”型粉末、卸妆产品等)、除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、外用乳膏、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏、防晒霜和婴儿用品,诸如但不限于清洁湿巾、婴儿洗发水、婴儿皂和尿布霜。本主题还可以应用于伤口护理用品,诸如但不限于伤口愈合软膏、霜和乳液、伤口覆盖物、烧伤伤口霜、绷带、胶带和无菌条,以及医疗用品,如医用袍、帽子、面罩和鞋套、手术滴剂等。其他个人护理产品包括但不限于口腔产品,如漱口水、牙膏、牙线涂层、兽用和宠物护理产品、防腐剂组合物,以及表面消毒剂,包括溶液、喷雾或湿巾。

[0226] 一般来说,可以将本文所公开的Tgase变体酶掺入任何合适的个人护理产品中,用于改变皮肤的外观,如化妆品(如唇膏、粉底、腮红或眼妆)。可以掺入所公开的组合物的化妆品包括但不限于液体或粉状粉底、液体或固体眼线、腮红、眼影、有色粉末、可干用或湿用的“薄饼”型粉末、唇色或定妆喷雾剂等。还可以将所公开的组合物掺入到古铜色或人工晒黑产品中。此外,还可以将所公开的组合物掺入到防晒产品如化学遮光剂中,例如,以将防晒发色团(诸如但不限于羟苯甲酮、阿伏苯宗、水杨酸辛酯、奥克立林、胡莫柳酯或辛诺沙酯,或其衍生物)结合到皮肤蛋白。

[0227] 在一些实施方案中,由所公开的酶和组合物保护免受微生物污染的个人护理产品可以是任何类型的,如乳剂、凝胶、血清、溶液、爽肤水、乳液、霜、喷雾、凝胶、粉末、粘性物和清洁剂。

[0228] 个人护理产品配制剂通常包括基础配制剂,其添加有本公开的酶组合物。根据最终用途的不同,基础配制剂可能包含许多不同的成分。例如,个人护理产品配制剂可以含有溶剂、表面活性剂、乳化剂、稠化剂、护理剂、润肤剂、皮肤护理成分、保湿剂、增稠剂、润滑剂、填充剂、抗氧化剂、其他防腐剂、活性成分,特别是皮肤学活性成分、香精等,以及其混合物。本文提及的活性成分包括,例如,抗炎药,以及任选地抗细菌剂、抗真菌剂和类似药剂。在一些实施方案中,包括适合局部应用的活性成分。

[0229] 在一些实施方案中,个人护理产品不包含任何另外的防腐剂,如石油化学衍生的防腐物质。在一些实施方案中,个人护理产品除了本文所述的酶或酶/聚合物组合物外,包含一种或多种另外的防腐物质,如石油化学衍生的防腐剂。

[0230] 在一些实施方案中,个人护理产品不包含通常包含在个人护理产品中的常规抗细菌和/或抗真菌“活性剂”。用于洗手皂的常规抗细菌剂包括:卤卡班(Cloflucarban)、氟沙

仑(Fluorosalan)、六氯酚(Hexachlorophene)、己雷琐辛(Hexylresorcinol)、碘络合物(硫酸铵醚和聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯)、碘络合物(烷基芳氧基聚乙二醇的磷酸酯)、壬基酚聚氧乙烯醚(Nonylphenoxypoly(ethyleneoxy)ethanoliodine)、泊洛沙姆-碘络合物、聚维酮(Povidone)、恩地氯铵碘(Undecoylium chloride iodine)络合物、甲苄索氯铵、苯酚、苯酚16、仲烷基甲基苯酚(Secondary amyltricresols)、氧氯苯磺酸钠(Sodium oxychlorosene)、三溴沙仑(Tribromsalan)、三氯卡班(Triclocarban)、三氯生(Triclosan)和三重染料。消费品配制剂中用作防腐剂的常规抗微生物剂包括:对羟基苯甲酸酯、甲醛和甲醛释放剂、异噻唑啉酮、苯氧乙醇和有机酸(如苯甲酸钠)。

[0231] 在一些实施方案中,单独或与(例如,混合)一种杀生物化学品,包括但不限于壳聚糖组合的本文所述的Tgase变体酶,是产品中仅有的抗细菌剂、抗真菌剂、抗微生物剂或防腐剂。在一些实施方案中,单独或与一种杀生物化学品,如但不限于壳聚糖组合(如混合)的Tgase变体酶,与一种或多种另外的防腐物质,如一种或多种石油化学衍生的防腐物质组合。在一些实施方案中,一种或多种生物基防腐剂(即本文所公开的Tgase变体酶或其组合物)与一种或多种合成防腐剂(例如石油化学衍生物质)组合,并且生物基防腐剂和合成防腐剂之间实现的防腐(如抗微生物)效果是相加或协同的。在一些实施方案中,一种或多种生物基防腐剂(即本文所公开的Tgase变体酶或其组合物)与一种或多种另外的防腐物质,例如,选自聚赖氨酸、壳聚糖、苯甲酸盐、乳链菌肽、溶菌酶和壳聚糖或其任何组合的杀生物物质组合,并且生物基防腐剂和另外的防腐物质之间达到的防腐(如抗微生物)效果是相加的或协同的。

[0232] 在一些实施方案中,个人护理产品可以包含润肤剂。润肤剂包括但不限于杏仁油、蓖麻油、长角豆属提取物、十六十八醇、十六烷醇、十六醇酯蜡、胆固醇、棉籽油、环甲硅油、乙二醇棕榈硬脂酸酯、甘油、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、羊毛脂、卵磷脂、轻质矿物油、中链甘油三酯、矿物油和羊毛脂醇、凡士林、凡士林和羊毛脂醇、大豆油、淀粉、硬脂醇、葵花籽油、木糖醇及其组合。在一个实施方案中,润肤剂是硬脂酸乙基己酯和棕榈酸乙基己酯。

[0233] 常见的乳化剂是:金属皂、某些动物和植物油,以及各种极性化合物。合适的乳化剂包括:阿拉伯树胶、阴离子乳化蜡、硬脂酸钙、卡波姆、十六十八醇、十六烷醇、胆固醇、二乙醇胺、乙二醇棕榈硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、羊毛脂、水合物、羊毛脂醇、卵磷脂、中链甘油三酯、甲基纤维素、矿物油和羊毛脂醇、磷酸二氢钠、单乙醇胺、非离子乳化蜡、油酸、泊洛沙姆、泊洛沙姆类、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、藻酸丙二醇酯、自乳化甘油单硬脂酸酯、柠檬酸钠脱水物、十二烷基硫酸钠、山梨糖醇酯、硬脂酸、葵花油、西黄蓍胶、三乙醇胺,黄原胶及其组合。在一个实施方案中,乳化剂是甘油硬脂酸酯。

[0234] 合适的非离子表面活性剂包括乳化蜡、单油酸甘油酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚山梨醇酯、山梨糖醇酯、苯甲酸苄酯、环糊精、单硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆、聚维酮及其组合。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是硬脂醇。

[0235] 合适的抗氧化剂包括,例如,亚硫酸盐(例如,亚硫酸钠)、生育酚或其衍生物、抗坏血酸或其衍生物、柠檬酸、没食子酸丙酯、壳聚糖乙醇酸盐、半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸加硫酸锌、硫代硫酸盐(例如硫代硫酸钠)、多酚谷胱甘肽、二硫苏糖醇(DTT)、超氧化物歧化酶、

过氧化氢酶等。

[0236] 还可以包括螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0237] 合适的增稠剂包括,例如,丙烯酸酯/硬脂醇聚醚-20甲基丙烯酸酯共聚物、卡波姆、羧甲基淀粉、白蜡、二甲基硅氧烷/乙烯基二甲基硅氧烷交联聚合物、藻酸丙二醇酯、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、二氧化硅、二甲基甲硅烷基化硅石(silica dimethyl silylate)、黄原胶,以及氢化丁烯/乙烯/苯乙烯共聚物。

[0238] 合适的保湿剂包括,例如,丁二醇、十六烷醇、聚二甲基硅氧烷、酒石酸双肉豆蔻、葡萄糖甘油-26、甘油、甘油硬脂酸酯、水解乳蛋白、乳酸、乳糖和其他糖类、月桂醇-8、卵磷脂、辛氧基甘油、PEG-12、PEG 135、PEG-150、PEG-20、PEG-8、戊二醇、己二醇、植烷三醇、聚季铵盐-39PPG-20甲基葡萄糖醚、丙二醇、透明质酸钠、乳酸钠、PCA钠、山梨醇、琥珀酰聚糖、合成蜂蜡、三C14-15烷基柠檬酸盐和淀粉。

[0239] 一般来说,可以将本文公开的酶组合物(例如,组合物,其包含一种或多种Tgase变异酶,任选地固定化在聚合物支持物上或包囊在聚合物支持物中,以及遮光剂或产色分子),掺入到预期用于保护皮肤免受紫外线暴露或改变皮肤的外观的任何合适个人护理产品中,诸如化妆品(例如,唇膏、粉底、腮红或眼妆)。可以掺入所公开的组合物的化妆品包括但不限于液体或粉状粉底、液体或固体眼线、腮红、眼影、有色粉末、可干用或湿用的“薄饼”型粉末、唇色或定妆喷雾等。还可以将所公开的组合物掺入到古铜色或人工晒黑产品中。此外,还可以将所公开的组合物掺入到防晒产品如化学遮光剂中,例如,以将防晒发色团(如但不限于羟苯甲酮、阿伏苯宗、水杨酸辛酯、奥克立林、胡莫柳酯或辛诺沙酯,或其衍生物)结合到皮肤蛋白。

[0240] B.家用/工业产品

[0241] 可以掺入单独或与一种或多种另外的防腐物质(如一种或多种石油化学衍生的防腐物质)组合的如本文公开的Tgase变体酶或其组合物作为防腐物质的家用/工业产品的在非限制性的实施方案包括,但不限于家用清洁剂,如浓缩液体清洁剂和喷雾清洁剂、清洁湿巾、洗碗液、洗碗机洗涤剂、喷雾拖把液、家具抛光剂、室内油漆、室外油漆、除尘喷雾、衣物洗涤剂、织物软化剂、地毯/织物清洁剂、窗户和玻璃清洁剂、马桶清洁剂、液体/乳膏清洁剂等。在特定的实施方案中,本文所述的组合物可以用于食品清洁产品,例如,设计用于在食用前清洁水果和蔬菜。在一些实施方案中,一种或多种生物基防腐剂(即本文所公开的Tgase变体酶或其组合物)与一种或多种合成防腐剂(如石油化学衍生物质)组合,并且生物基防腐剂和合成防腐剂之间实现的防腐(如抗微生物)效果是相加或协同的。

[0242] C.皮革

[0243] 一般来说,可以将Tgase酶(例如本文所述的Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶掺入到任何含有天然胶原的产品中,或在皮革加工过程中用于修饰皮革,使颜色与皮革中的一种或多种蛋白质,如动物或非动物衍生的胶原、角蛋白、丝和/或弹性蛋白共价结合。

[0244] D.食品

[0245] 一般来说,可以将Tgase酶(例如本文所述的Tgase变体酶)和/或赖氨酰氧化酶掺入到任何食品蛋白质中或在食品加工过程中使用,以改变食品蛋白质的颜色。可以掺入Tgase和/或赖氨酰氧化酶的食品包括但不限于含有胶原或明胶(水解胶原)的动物衍生产品。这些产品包括但不限于明胶产品、肉制品或肉类类似物产品,如香肠肠衣、猪皮,或任何

肉类或海洋产品，包括动物皮层和/或胶原。此外，可以将该酶组合物掺入到非动物衍生的含胶原产品或任何含胶原产品中。

[0246] E.其他产品

[0247] 可以掺入本文所公开的Tgase变体酶或其组合物的其他产品包括但不限于食品、药品、化妆品、保健品、海洋、油漆、涂料、粘合剂、能源(例如压裂液)、塑料、包装和农业产品。在一些实施方案中，可以将本文公开的酶或酶聚合物组合物掺入HVAC系统、冷却池、水净化系统，或可以用于工业应用，诸如但不限于纸浆和纸张加工。

[0248] 在一些实施方案中，杀生物酶，即本文所公开的Tgase变体酶，与一种或多种另外的防腐物质，如一种或多种石油化学衍生的防腐物质组合。在一些实施方案中，一种或多种生物基防腐剂(即本文所公开的Tgase变体酶或其组合物)与一种或多种合成防腐剂(例如，石油化学衍生的物质)组合，并且生物基和合成防腐剂之间实现的防腐(例如，抗微生物)效果是相加或协同的。

[0249] VII.使用方法

[0250] 提供的方法用于本文公开的Tgase变体(包括表3中公开的任何变体)的使用方法，任选地具有N端甲硫氨酸残基，包括其环形置换物，以及任选地具有本文所述的原序列)在期望或有利于蛋白质或肽的交联的各种应用中的用途。

[0251] 本文所述的Tgase变体可以用于应用，诸如但不限于防腐剂、抗微生物剂、气味控制、药品、化妆品、外用药、工业、能源、保健或海洋应用。

[0252] 所公开的变体可以，在需要防腐剂的各种应用中，例如个人护理、家用、工业、食品、药品、化妆品、保健、海洋、油漆、涂料、能源、塑料、包装和农业产品中，或本文公开的任何产品或系统中，用作常规防腐剂，诸如但不限于对羟基苯甲酸酯、甲醛和戊二醛以及常规杀生物剂，包括银(用于伤口护理产品)的替代物或附加。所公开的变体可以用作抑制潜在有害细菌、真菌和/或其他微生物生长的抗微生物(例如防腐)成分，并相应地以有效量添加到待保存的产品中，以抑制这些产品中细菌、真菌和/或微生物的生长。此类应用的非限制性实例描述于例如，PCT/US20/21211中，其通过引用其整体并入本文。Tgase变体可以用作抗微生物剂，应用于保健品、个人护理或化妆品配制剂、包装(食品、化妆品和药品)、纺织品和皮革生产、油漆和涂料以及海洋应用，包括水处理和净化。

[0253] Tgase变体可以用于与功能性成分、染料或蛋白质对感兴趣的蛋白质，诸如但不限于角蛋白和胶原进行永久修饰。可以将Tgase酶(诸如任何所公开的变体)和/或赖氨酰氧化酶掺入到产品中，以促进颜色、染料或色素分子与蛋白质或肽的共价结合。这些方法包括使感兴趣的蛋白质或材料与一种或多种Tgase酶(例如，如本文所述的Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶以及一种或多种产色分子，例如染料或色素分子接触。Tgase和/或赖氨酰氧化酶以足以(即有效)将颜色分子与感兴趣的蛋白质或材料共价结合的量存在。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白质是存在于皮肤中的一种或多种蛋白质，并且Tgase和/或赖氨酰氧化酶和/或颜色分子可以是化妆品或个人护理产品的形式。存在于皮肤中的蛋白质可以是胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白质或材料是皮革、食品或农业产品，或其中感兴趣的蛋白质，并且Tgase酶(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶)和颜色分子以组合物的形式存在，该组合物适用于对皮革、食品或农业产品，或其中感兴趣的蛋白质进行修饰或添加颜色。

[0254] A.防腐方法

[0255] 本文所述的Tgase变体(即表3中公开的任何变体,任选地具有N端甲硫氨酸残基,包括其环形置换物,并且任选地具有本文所述的原序列)可以,在需要防腐剂的各种应用中,例如个人护理、家用、工业、食品、药品、化妆品、保健、海洋、油漆、涂料、粘合剂、能源、塑料、包装和农业产品,用作常规防腐剂,诸如但不限于对羟基苯甲酸酯、甲醛和戊二醛以及常规杀生物剂,包括银(用于伤口护理产品)的替代物或附加。Tgase变体可以用作抑制潜在有害细菌、真菌和/或其他微生物生长的抗微生物(如防腐剂)成分,并相应地以有效量添加到待保存的产品中,以抑制此类产品中细菌、真菌和/或微生物的生长。此类应用的非限制性实例描述于例如,PCT/US20/21211中,其通过引用其整体并入本文。在一些实施方案中,达到USP<51>的合格标准,即对于第二类产品:细菌:在14天时相比最初计算的计数减少不低于2.0log,在28天时相比14天的计数没有增加;对于酵母和霉菌:在14天和28天时相比最初计算的计数没有增加。在一些实施方案中,酶和酶-生物聚合物共配制剂的抗微生物行为的特征在于对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌以及真菌的MIC(最小抑制浓度),其导致微生物生长减少约80-100%,或减少至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%中任一项的微生物生长。

[0256] 当与本文所述的产品,例如个人护理、家用、工业、食品、药品、化妆品、保健、海洋、油漆、涂料、粘合剂、能源、塑料、包装或农业产品组合,或在本文公开的任何产品或系统中,例如在配制剂中或作为防腐剂掺入产品或系统时,该组合物可以在广泛的pH范围内具有有效的广谱防腐活性。

[0257] 在一些实施方案中,该方法包括将本文所述的防腐剂组合物(例如,本文所述的Tgase变体或其组合物)添加到产品或系统中,例如个人护理、家用、工业、食品、药品、化妆品、保健、海洋、油漆、涂料、粘合剂、能源、塑料、包装或农业产品,或本文公开的任何产品或系统中,例如,配制剂中或掺入产品或系统中,其中与不含防腐剂组合物的相同产品相比,该产品的微生物生长减少和/或保质期增加。在一些实施方案中,产品组合物中不包括其他防腐剂,例如,但不限于甲醛和/或戊二醛。

[0258] 在一些实施方案中,提供了用于增加产品组合物,诸如个人护理、家用或工业产品的保质期、完整性或无微生物(例如无细菌和/或真菌)状态的方法,其中该方法包括将有效量的本文所述的防腐剂组合物掺入产品(例如个人护理、家用或工业产品)中。在一些实施方案中,有效量可以是称为MIC(最小抑制浓度)的量,其导致微生物生长减少约80-100%,或减少至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%中任一项的微生物生长。

[0259] 在本文所述方法或组合物的一些实施方案中,可以以约.0001%w/v至约1%w/v,.0001%w/v至约.01%w/v、约.0001%w/v至约2.5%w/v、约.0001%w/v至约5%w/v、约.0001%w/v至约.001%w/v、约.001%w/v至约.01%w/v、约.01%w/v至约.1%w/v,0.01%w/v至约5%w/v,或至少约0.01%w/v,0.05%w/v,0.1%w/v,0.5%w/v,1%w/v,1.5%w/v,2%w/v,2.5%w/v,3%w/v,3.5%w/v,4%w/v,4.5%w/v,or 5%w/v中任一项,或约0.01%w/v至约0.05%w/v、约0.1%w/v至约0.5%w/v、约1%w/v至约1.5%w/v、约1.5%w/v至约2%w/v、约2%w/v至约2.5%w/v、约2.5%w/v至约3%w/v、约3%w/v至约3.5%w/v、约3.5%w/v至约4%w/v、约4%w/v至约4.5%w/v、约4.5%w/v至约5%w/v、约0.01%w/v至约0.1%w/v、约0.1%w/v至约1%w/v、约1%至约5%w/v、约0.05%w/v至约0.5%w/v、约0.5%w/v至

约5%w/v、约1%w/v至约2.5%w/v,或约2.5%w/v至约5%w/v中任一项的浓度包含Tgase变体酶。

[0260] 利用所公开的Tgase变体及其组合物,可以应用防腐方法的个人护理产品的非限制性实例包括条皂、液体肥皂(例如,洗手皂)、手部消毒剂(包括冲洗和留置酒精基和水性基手部消毒剂)、术前皮肤消毒剂、清洁湿巾、消毒湿巾、沐浴液、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌护肤霜、洗发水、护发素、化妆品(包括但不限于液体或粉状粉底、液体或固体眼线、睫毛膏、眼影膏、有色粉末、可干用或湿用的"薄饼"型粉末、卸妆产品等)、除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、外用乳膏、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏、防晒霜和婴儿用品,诸如但不限于清洁湿巾、婴儿洗发水、婴儿皂和尿布霜。本主题还可以应用于伤口护理用品,诸如但不限于伤口愈合软膏、霜和乳液、伤口覆盖物、烧伤伤口霜、绷带、胶带和无菌条,以及医疗用品,如医用袍、帽子、面罩和鞋套、手术滴剂等。其他产品包括但不限于口腔产品,如漱口水、牙膏和牙线涂层,兽用和宠物护理产品、防腐剂组合物,以及表面消毒剂,包括溶液、喷雾或湿巾。

[0261] 利用所公开的Tgase变体及其组合物,可以应用本发明防腐方法的家用/工业产品的非限制性实例包括家用清洁剂,如浓缩液体清洁剂和喷雾清洁剂、清洁湿巾、洗碗液、洗碗机洗涤剂、喷雾拖把液、家具抛光剂、室内油漆、室外油漆、除尘喷雾、衣物洗涤剂、织物软化剂、地毯/织物清洁剂、窗户和玻璃清洁剂、马桶清洁剂、液体/乳膏清洁剂等。在特定的实施方案中,本主题的防腐方法可以用于食品清洗产品,设计用于在食用、包装和食品涂层之前清洁水果和蔬菜。

[0262] B.蛋白质修饰方法

[0263] 在一些实施方案中,一种或多种Tgase酶,(例如本文所公开的Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶可以包括在产品中,以用于长效应用功能性成分,包含阻隔紫外线的遮光剂,和/或着色剂,诸如色素或染料。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-29中公开的Tgase酶中的任一种,和/或赖氨酰氧化酶包含在产品组合物中。例如,Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶可以在组合物中使用,用于向哺乳动物(例如人)的皮肤、毛发或指甲递送活性或功能性成分,诸如但不限于毛发纤维表面的永久性(共价)颜色修饰。在一些实施方案中,可以将Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶掺入待局部应用并与个体皮肤结合的产品中,如紫外线阻隔(遮光)产品,或化妆品产品。在一些实施方案中,Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶可以用于向动物皮肤(如在皮革加工中)提供颜色的永久性应用。在一些实施方案中,Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶可以用于在食品加工中提供颜色的永久性应用。

[0264] 本文提供了对感兴趣的蛋白质或材料进行修饰或添加颜色的方法。这些方法包括使感兴趣的蛋白质、多肽或材料与一种或多种Tgase(如本文所述的Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶以及一种或多种功能性成分(包括遮光剂和/或产色分子,如染料或色素分子)接触。Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶以足以(即有效)将遮光剂和/或色素分子与感兴趣的蛋白质、肽或材料共价结合的量存在。

[0265] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质是存在于皮肤中的一种或多种蛋白质,并且Tgase(例如Tgase变体)和/或溶酶氧化酶和遮光剂和/或色素分子可以是化妆品或个人护理产品的形式。存在于皮肤中的蛋白质可以是胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。

[0266] 在一些实施方案中，感兴趣的材料是一种或多种衍生自皮肤的蛋白质或肽，并且Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶和/或遮光剂和/或色素分子可以是化妆品或个人护理产品的形式。存在于产品配制剂中的蛋白质可以是胶原、角蛋白和/或弹性蛋白。存在于产品配制剂中的肽可以是水解胶原、水解角蛋白和/或水解弹性蛋白。

[0267] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白质或材料是皮革、食品或农业产品，或其中感兴趣的蛋白质，并且Tgase(例如Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶和/或颜色分子以组合物的形式存在，该组合物适合于对皮革、食品或农业产品，或其中感兴趣的蛋白质进行修饰或添加颜色。

[0268] 在一些实施方案中，提供的方法用于将活性或功能性成分(如遮光剂分子或着色剂)递送到哺乳动物(例如人)皮肤、毛发或指甲的蛋白质或肽的方法。例如，该方法可以包括将本文所述的组合物应用于哺乳动物(如人)皮肤、毛发或指甲的蛋白质或肽，或将组合物局部应用于哺乳动物(如人)个体的皮肤、毛发或指甲。

[0269] 在一些实施方案中，该方法包括使哺乳动物(例如人)皮肤、毛发或指甲的蛋白质和/或肽与包含以下的组合物接触：(a)有效量的至少一种活性或功能性成分(例如，遮光剂分子或着色剂)；和(b)一种或多种Tgase(例如，Tgase变体)和/或赖氨酰氧化酶，其量有效催化活性或功能性成分与哺乳动物(例如，人)皮肤、毛发或指甲的蛋白质或肽交联。在一些实施方案中，该方法包括将组合物局部应用于哺乳动物(例如人)个体的皮肤、毛发或指甲，并且在某些实施方案中，组合物可以含有：(c)药学上或可接受的载剂，其量有效地将Tgase变体酶和活性或功能性成分递送到该个体的皮肤、毛发或指甲。

[0270] 例如，活性或功能性成分可以包括至少一个烷基氨基(-RNH_2)、肼、酰肼或羟胺分子，或是直接在活性或功能性成分上，或是间接在附接(如共价结合)至其的接头上，并且该方法包括通过谷氨酰胺转氨酶催化活性或功能性成分的氨基与皮肤、毛发或指甲的蛋白质或肽中的氨基(例如谷氨酰胺和/或赖氨酸氨基酸残基侧链上的氨基)之间的交联(例如，形成共价键)。

[0271] 下面的实施例意图是说明，但不是限制本发明。

实施例

[0272] 实施例1.Tgase载体构建和诱变

[0273] 无细胞蛋白质合成(CFPS)载体

[0274] 编码原序列和成熟Tgase的基因基于已发表的氨基酸序列针对在大肠杆菌中表达来进行密码子优化(Kanaji,et al.(1993)J.Biol.Chem.268(16):11565-11572)，合成，并如PCT/US20/49226中所述克隆到pUC19衍生的表达载体上。

[0275] 大肠杆菌载体

[0276] 编码原序列和成熟Tgase的基因基于已发表的氨基酸序列针对在大肠杆菌中表达来进行密码子优化(Kanaji,et al.(1993)J.Biol.Chem.268(16):11565-11572)，并如PCT/US20/49226中所述进行合成。该DNA在T7启动子的控制下克隆到pET9a载体上，用于大肠杆菌中表达。

[0277] 创建Tgase变体

[0278] 使用本领域已知的定点诱变方法将突变引入成熟Tgase基因。

[0279] 实施例2.使用无细胞蛋白质合成的Tgase变体的表达

[0280] 如PCT/US20/49226中所述按照制造商的说明，在市售的无细胞蛋白合成试剂盒中同时表达原序列和成熟Tgase变体。

[0281] 实施例3.大肠杆菌中Tgase变体的表达

[0282] 挑取携带Tgase表达质粒的大肠杆菌BL21(DE3)的单个菌落，并使用其接种96深孔板中的1mL LB。起子培养物在37℃、400rpm下生长过夜。第二天早上，使用100μL起子培养物接种1mL培养基并在30℃，400rpm下温育。6-8小时后，添加IPTG至终浓度为0.1mM并将温度降低至20℃。继续生长过夜并且裂解培养物并贮存在-80℃。

[0283] 实施例4.Tgase比活性的测量

[0284] 在本文实施例中，使用比色异羟肟酸活性测定法测量Tgase比活性(Folk and Cole(1965)J Biol Chemistry 240(7):2951-2960)。简而言之，异羟肟酸测定法使用N-苄氧羰基-L-谷氨酰胺甘氨酸(Z-Gln-Gly或CBZ-Gln-Gly)作为胺接受体底物，并使用羟胺作为胺供体。在存在转谷氨酰胺酶的情况下，将羟胺掺入以形成Z-谷氨酰异羟肟酸酯-甘氨酸，与铁(III)显影有色复合物，在37℃下温育5-60分钟后可在525nm处检测。使用L-谷氨酸γ-单羟肟酸(Millipore Sigma)作为标准品进行校准。一个单位的Tgase被定义为按照制造商的方案使用市售的ELISA试剂盒(Zedira E021)测定的、每分钟催化形成1μmol的γ-谷氨酰羟胺的肽衍生物的酶的量。

[0285] 实施例5.蛋白质功能化测定法

[0286] 通过两种方法中的一种来确定通过Tgase变体进行的蛋白质功能化：(1)使用单丹磺酰尸胺对酪蛋白进行荧光标记；以及(2)将荧光底物共价锁定在胶原板上。使用ELISA将所有的结果均归一化至Tgase浓度。

[0287] 荧光酪蛋白标记测定法

[0288] 通过测量与Tgase催化的用丹磺酰尸胺标记的酪蛋白相关的荧光随时间的增加确定蛋白质底物的活性突变体的初始速率(例如，市售的试剂盒，荧光活性测定试剂盒，Zedira T036)。

[0289] 荧光胶原标记测定法

[0290] 胺类供体染料。在渐增量的Tgase(SEQ ID NO:28)的存在下，将TAMRA-尸胺(1.7g/L)共价结合到胶原板(Corning BioCoat Collagen I Multiwell Plates)。Tgase变体(0-0.33％w/v)在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中，总体积为60μL。平行运行不存在Tgase的含有牛血清白蛋白(BSA，0.33％w/v)的阴性对照。平板在37℃下温育16小时。

[0291] 反应的示意图例示于图7。结果显示在图9中。显示的孔是脱色前(顶行)和用PBS清洗后(底行)的孔。

[0292] 谷氨酰胺供体染料。在pH 7.4的PBS中存在具有SEQ ID NO:28中描绘的氨基酸序列的Tgase(0.05-0.3％w/v)的情况下，将Cbz-Gln-Gly-TAMRA(2.5g/L)结合到胶原板(Corning BioCoat Collagen I Multiwell Plates)。平行运行含有BSA(0.33％w/v)的阴性对照和没有BSA或Tgase的阴性对照。板在37℃下温育16小时。温育后，用PBS清洗平板以去除任何残留的、未结合的染料。

[0293] 反应的示意图例示于图8。结果显示在图10中。显示的孔是脱色前和用PBS清洗后的孔。

[0294] 实施例6.抗微生物活性测定

[0295] 最小抑制浓度(MIC)测定

[0296] 酵母或细菌起子培养物在30℃-37℃下过夜生长。第二天,使用OD_{600}计算饱和培养物的细胞密度,并将培养物稀释至10^5-10^8个细胞/mL。在96孔板中用稀释的起子制作培养物(100μL)。将突变体或野生型Tgase以0.0001-1的重量百分比添加每个培养物中。培养物在30℃-37℃下生长过夜,并通过BioTek Synergy Plate Reader测量生长曲线。第二天,使用细胞存活力测定法,如BacTiter Glo(Promega,按照制造商的方案)来评估用Tgase攻击后的细胞存活率。发光率的下降表明细胞存活力的下降。结果显示于表3。

[0297] 细胞生长(OD测量)

[0298] 在存在野生型Tgase或Tgase变体的情况下以范围为1mg/L-250mg/L的浓度培养大肠杆菌。相对于野生型Tgase,较低的光密度(OD)测量与抗细菌功效的改善相关。

[0299] 表3.Tgase变体的活性测定结果

[0300]

变体名称	SEQ. ID. NO.	突变(相对于 SEQ. ID. NO. 1)	比活性	蛋白质功能化活性	抗微生物活性
M2	2	S199G S299V	++	++	N/A
M3	3	H289V S299A	++	++	N/A
M4	4	N282M H289T S299V	++	N/A	N/A
M5	5	N282E H289V S299K	++	++	+
M6	6	S284D H289L S299K	++	N/A	N/A
M7	7	N282E H289I S299K	++	+++	+++
M8	8	N282K G283A S299V	+	+	+
M9	9	N282Q S284P H289E S299V	++	N/A	N/A
M10	10	N282K G283A S284P S299V	++	-	+++
M11	11	N282R G283A S284E H289Q S299V	+++	++	+
M12	12	S199A S299A	++	-	+++
M13	13	S199A S299E	++	++	N/A

[0301]

M14	14	S199A S299K	++	++	+
M15	15	S199A S299V	+++	+++	+++
M16	16	S199G S299A	++	++	N/A
M17	17	S199G S299K	++	N/A	N/A
M18	18	S2P S199A S299A	+	N/A	N/A
M19	19	S2P S199A S299E	++	++	N/A
M20	20	S2P S199A S299K	++	++	+
M21	21	S2P S199A S299V	++	++	+
M22	22	S2P S199G S299A	++	+	+
M23	23	S2P S199G S299E	+	N/A	N/A
M24	24	S2P S199G S299K	++	++	+
M25	25	S2P S199G S299V	+++	+++	++
M26	26	N282D G283A S284A S299V	++	++	N/A
M27	27	S199G S299E	+++	++	+
M28	28	S2P	+	++	+

[0302] 茂原链霉菌Tgase的变体以及相对于野生型茂原链霉菌Tgase的活性改善。氨基酸位置的编号是参考SEQ ID NO:1中描绘的成熟茂原链霉菌Tgase氨基酸序列。“-”指示活性的降低。“+”指示1.2-2倍之间的改善。“++”指示2-5倍之间的改善。“++”指示大于5倍的改善。

[0303] 实施例7.遮光剂-接头的形成

[0304] 羟苯甲酮(0.25mol)、甲苯(100mL)和冰醋酸(1滴)进料入250mL的三颈烧瓶中,该烧瓶装有机械搅拌器、热电偶和dean stark分离器。向烧瓶中添加熔融的1,6-己二胺(0.25mol),并将反应物回流过夜以除去水。通过HPLC监测反应。在减压下通过旋转蒸发分离所得的羟苯甲酮亚胺,并在真空下进一步干燥,得到亚胺产物2-(((6-氨基己基)亚胺基)(苯基)甲基)-5-甲氧基苯酚,为黄色固体,以接近定量的产率(m/z 327.3)。示意图显示于图5。

[0305] 实施例8.遮光剂-接头与蛋白质的共价加成

[0306] 将实施例7中的亚胺产物(1.6g/L)和Cbz-Gln-Gly二肽(1.65g/L)溶解在0.1M Tris-HCl pH 8.0中。为了帮助亚胺的溶解,采用在二甲亚砜中的10%1:1的二氯甲烷。向悬浮物中添加Tgase(0.01wt%),并将反应物在37℃下温育过夜,持续搅动。通过LCMS(m/z 647.25)证实Tgase催化的,二肽与亚胺的共价加成。在没有Tgase的情况下,没有观察到共价加成。示意图显示于图5,并且结果显示于图6。Tgase变体(SEQ ID NO:28)展示了相对于野生型Tgase的11倍的活性改善。在没有Tgase(阴性对照)的情况下没有观察到产物。

[0307] 氨基酸序列

[0308] SEQ ID NO:1来自茂原链霉菌的野生型Tgase

[0309] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0310] SEQ ID NO:2S199G S299V

[0311] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0312] SEQ ID NO:3H289V S299A

[0313] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMVVYESKFRNWAE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0314] SEQ ID NO:4N282M H289T S299V

[0315] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPMGSLGAMTVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0316] SEQ ID NO:5N282E H289V S299K

[0317] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPEGSLGAMVVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0318] SEQ ID NO:6S284D H289L S299K

[0319] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGDLGAMLVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0320] SEQ ID NO:7N282E H289I S299K

[0321] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPEGSLGAMIVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0322] SEQ ID NO:8N282K G283A S299V

[0323] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPKASLGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0324] SEQ ID NO:9N282Q S284P H289E S299V

[0325] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPQGPLGAMEVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0326] SEQ ID NO:10N282K G283A S284P S299V

[0327] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPKAPLGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0328] SEQ ID NO:11 N282R G283A S284E H289Q S299V

[0329] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY

LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPRAELGAMQVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0330] SEQ ID NO:12 S199A S299A

[0331] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWAE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0332] SEQ ID NO:13 S199A S299E

[0333] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWEE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0334] SEQ ID NO:14 S199A S299K

[0335] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0336] SEQ ID NO:15 S199A S299V

[0337] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0338] SEQ ID NO:16 S199G S299A

[0339] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWAE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0340] SEQ ID NO:17 S199G S299K

[0341] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0342] SEQ ID NO:18 S2P S199A S299A

[0343] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWAE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0344] SEQ ID NO:19 S2P S199A S299E

[0345] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWEE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0346] SEQ ID NO:20:S2P S199A S299K

[0347] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0348] SEQ ID NO:21S2P S199A S299V

[0349] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYAKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0350] SEQ ID NO:22S2P S199G S299A

[0351] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWAE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0352] SEQ ID NO:23S2P S199G S299E

[0353] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWEE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0354] SEQ ID NO:24S2P S199G S299K

[0355] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY

LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWKE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0356] SEQ ID NO:25S2P S199G S299V

[0357] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0358] SEQ ID NO:26N282D G283A S284A S299V

[0359] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPDAALGAMHVYESKFRNWVE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0360] SEQ ID NO:27S199G S299E

[0361] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYGKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWEE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0362] SEQ ID NO:28S2P

[0363] DPDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0364] SEQ ID NO:29具有多组氨酸标签的野生型Tgase。

[0365] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDPDAF
RPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSE
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWPLEHHHHHH

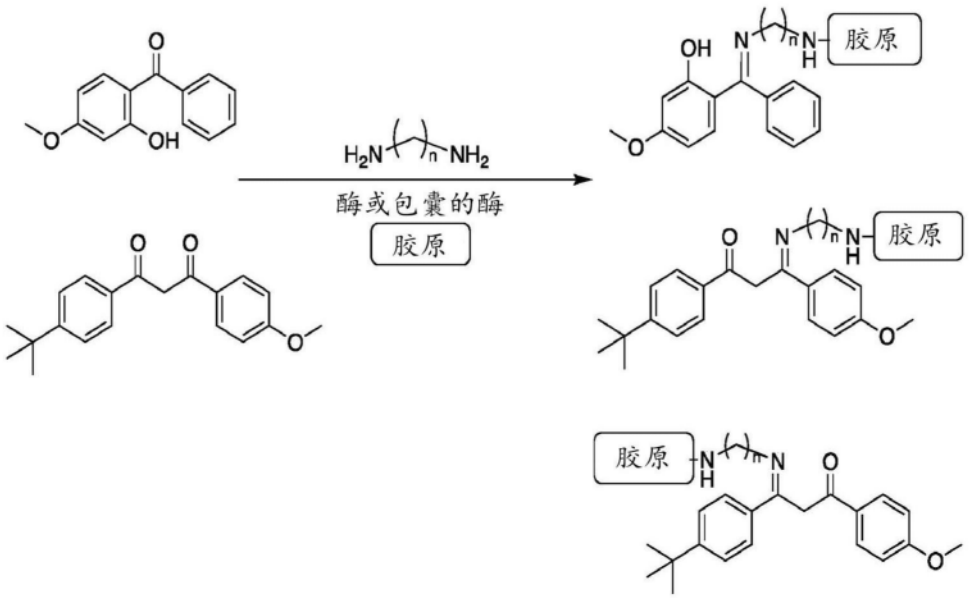

OH
O
O
H_2N NH_2
n
酶或包囊的酶
胶原
胶原
胶原
胶原
N
H

图1

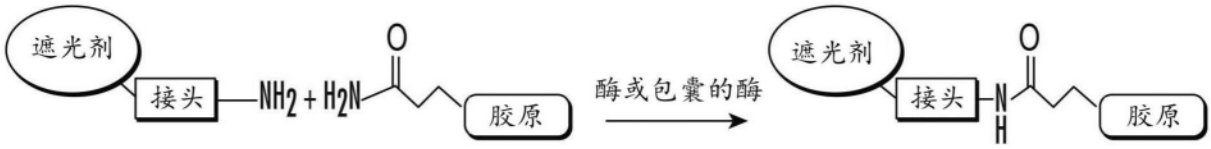

遮光剂
接头
NH_2 + H_2N
胶原
酶或包囊的酶
遮光剂
接头
胶原

图2

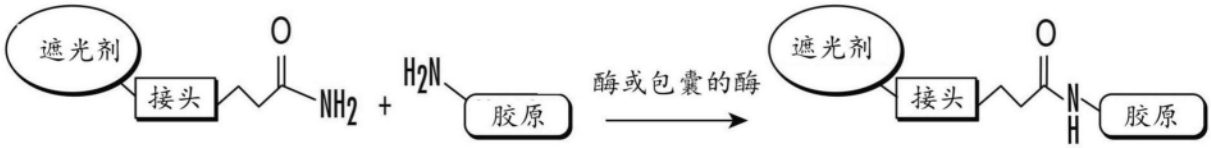

遮光剂
接头
NH_2
+
H_2N
胶原
酶或包囊的酶
遮光剂
接头
胶原

图3

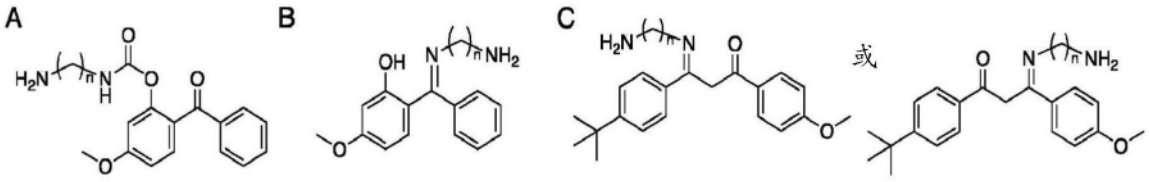

A
B
C
或

图4

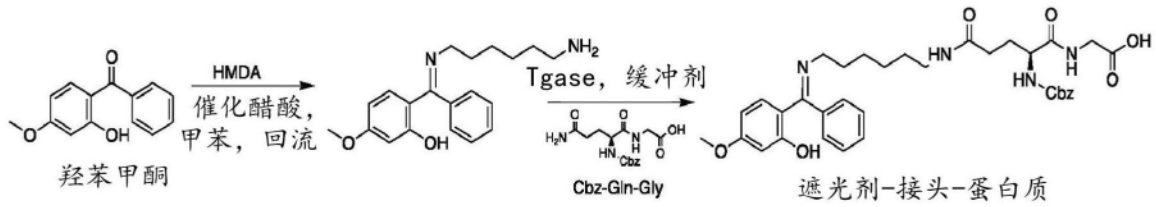

HMDA
催化醋酸，
甲苯，回流
羟苯甲酮
Tgase，缓冲剂
Cbz-Gln-Gly
遮光剂-接头-蛋白质

图5

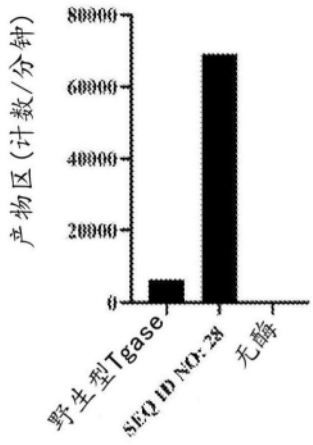

产物区(计数/分钟)
80000
60000
40000
20000
0
野生型Tgase
SEQ ID NO: 28
无酶

图6

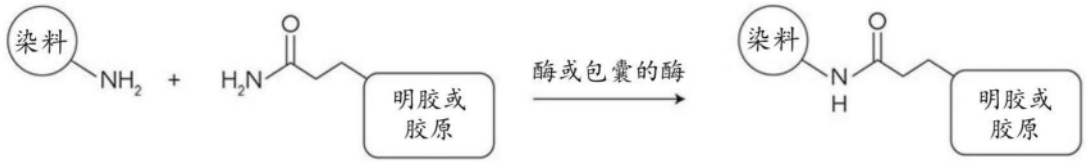

染料
明胶或
胶原
酶或包囊的酶
染料
明胶或
胶原

图7

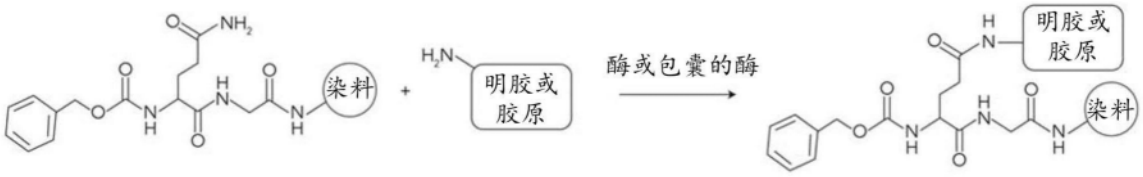

染料
明胶或
胶原
酶或包囊的酶
明胶或
胶原
染料

图8

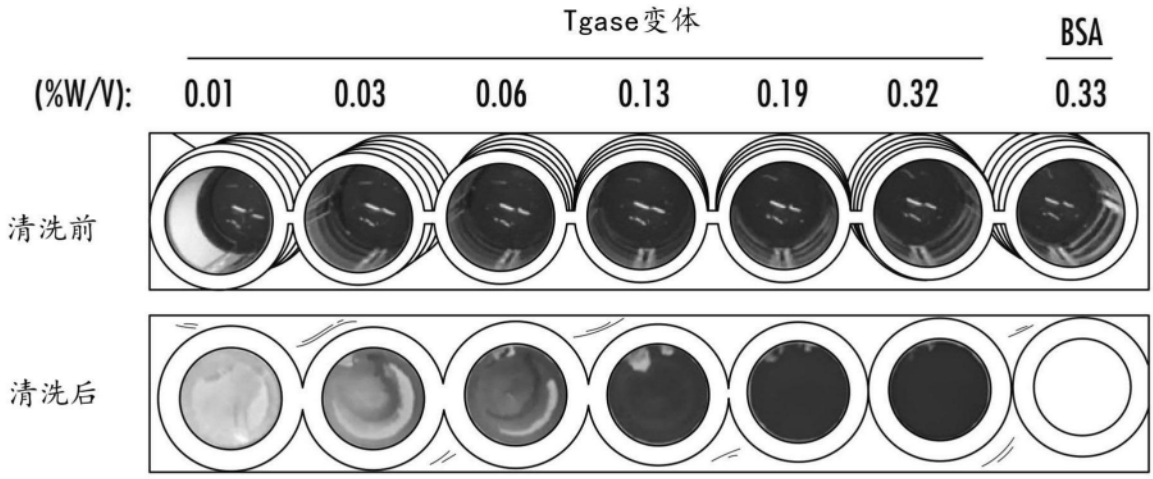


图9

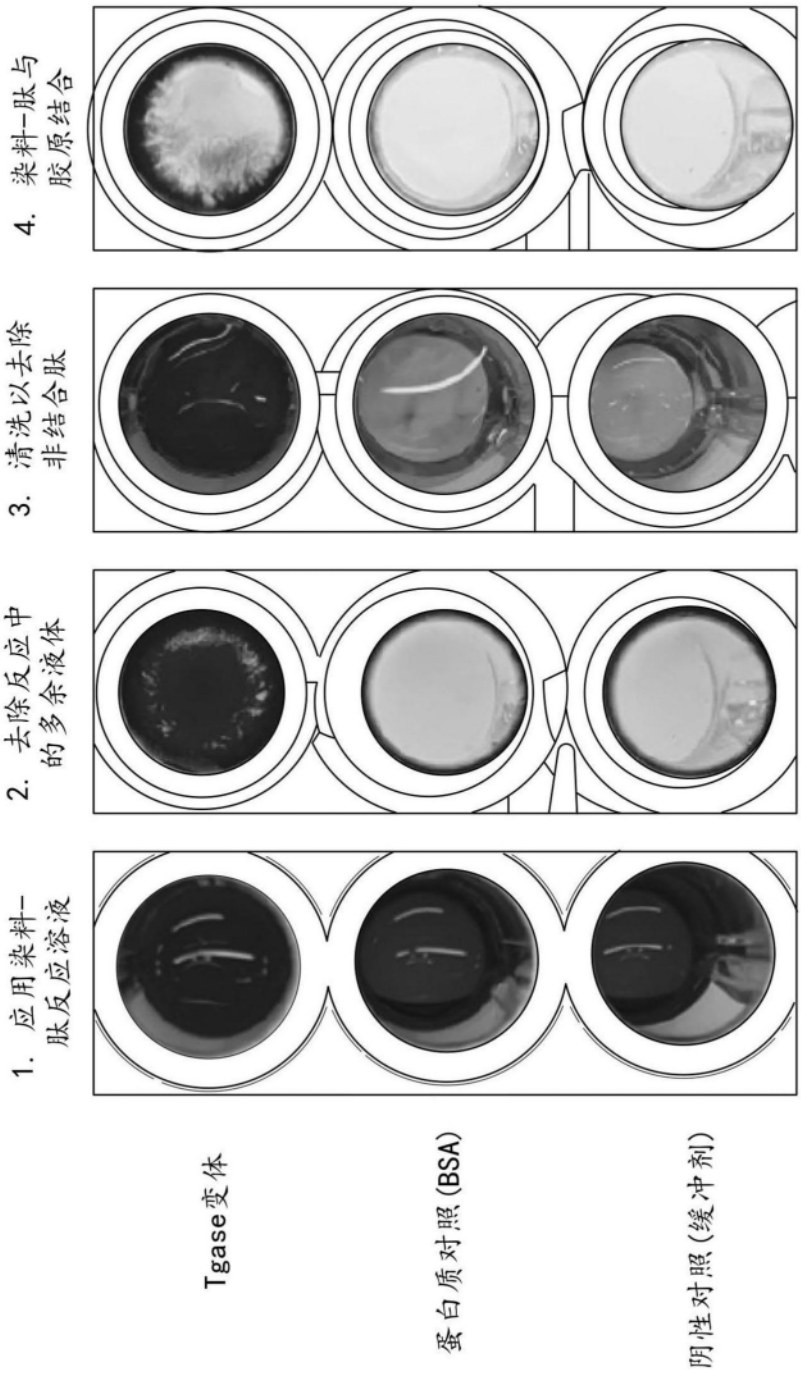

1. 应用染料-肽反应溶液
2. 去除反应中的多余液体
3. 清洗以去除非结合肽
4. 染料-肽与胶原结合
Tgase变体
蛋白质对照(BSA)
阴性对照(缓冲剂)

图10