THE CLAIMS DEFINING THE INVENTION ARE AS FOLLOWS:

1. An engineered penicillin G acylase having an polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO: 4, 8, 14, 300, 1036, 1194, 1262, and/or 1288.

2. The engineered penicillin G acylase of Claim 1, wherein said penicillin G acylase comprises:

(a) SEQ ID NO: 4, 8, 14, 300, 1036, 1194, 1262, and/or 12884;

(b) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to at least one sequence set forth in Table 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 8.2, 9,1, 10.1, 12.1, 12.2, 12.3, 12.4, 12.5, 12.6, and/or 12.7;

(c) a polypeptide sequence set forth in Tables 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 8.2, 9,1, 10.1, 12.1, 12.2, 12.3, 12.4, 12.5, 12.6, and/or 12.7;

(d) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:8 and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 27, 27;28;71;74;547, 27;71;74;484;547;584;697, 71;74, 129, 253, 254, 256, 348, 352, 372, 373, 374, 380, 380;457, 386;390, 386;390, 386, 387;390, 451, 457, 467, 470, 474, 616, 623, 704, 706, and 708, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:8;

(e) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:14 and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 9, 9;103;119;131;233;312;324;432;444;494, 9;103;119;131;324;432;494;646, 9;103;119;131;233;269;304;444;494;646, 9;103;119;131;304;324;432;444;494;646, 9;103;119;233;646, 9;103;119;494, 9;103;233;312;646, 9;103;233;432;646, 9;103;233;494, 9;103;269;304;324;494;646, 9;103;304;432;444;646, 9;119;131;233, 9;119;131;233;304;444;646, 9;119;131;233;494;646, 9;119;131;233;494;661, 9;119;131;312;444;646, 9;119;131;432;444;646, 9;119;233;269;273;304;312;432;444;646, 9;119;233;494;646, 9;119;304;444;494;646, 9;131;233;269;273;312;432;444;646, 9;233;273;304;494;646, 9;233;304;494;646, 9;233;312;432;646, 9;233;494;646, 9;312;444;646, 9;432;444;494;646, 9;494;646, 28;374;380, 103;119;131;233;273;304;324;432;444;494;646, 103;119;131;233;304;312;432;494;646;661, 103;119;131;269;312;494;646, 103;119;233, 103;119;233;273;432, 103;119;233;304;646, 103;119;233;312;646, 103;119;494;646;661, 103;119;646, 103;131;233;304;324;444;646, 103;131;269;273;444;646, 103;233;273;312;324;432;444;646, 103;233;273;312;432;444;646, 103;269;273;444;646, 103;273;304;324;444;494, 103;312;444;646, 103;444;494;646,

119;131;444;646;661, 119;131;494, 119;131;646, 119;131;304;432;444;646;661, 119;131;444, 119;233;304;312;324;432;444;646, 119;233;304;646, 119;233;312, 119;233;646, 119;269;273;312;324;494;646, 119;269;273;312;432;444;646, 119;273;324;444;494;646, 119;312;444;646, 119;432;444;646, 129;254;348;457;704, 129;348, 129;348;467;470;704;708, 129;348;470;623;704;706, 129;348;470;623;704;706;708, 129;380;470, 129;457;470;474, 129;470,129;623, 131;233;273;646, 131;233;304;444, 131;233;432;646, 131;273;432;444;494;646, 185, 233;269;304;312;324;432;444;646, 253, 253;256, 253;256;352;373;374;616, 253;256;352;374;380;451, 253;256;374;451, 253;256;380;451;616, 253;352;374;616, 253;352;451;616, 253;373;451, 253;374;451, 253;374;451;623, 253;451, 253;451;457, 253;254;352;374;380, 253;256, 253;256;352;374;451, 253;256;352;380;451;616, 253;256;352;451, 253;256;352;374;380;451, 253;256;352;380, 253;256;373, 253;256;374;616, 253;256;380, 253;256;380;451;546;616, 253;352;373;374;451, 253;352;373;374;451;616, 253;352;374;616, 253;352;623, 253;373;374;451;616, 253;380, 254;255;352, 254;256;352;451, 254;256;373;374;380;451, 254;256;374, 254;256;374;451, 254;256;451, 254;352;380, 254;256;380;451;616, 254;352;380;451, 254;352;451, 254;373;374;380;451, 254;373;374;451, 254;374, 254;374;380, 254;380, 254;451, 254;616, 256;352;374, 256;352;380;451;616, 256;374;380;451;616, 256;374;616, 273;312;444;646, 304;312;444;646, 312;444;646, 312;646, 348, 348;372;470;623;708, 348;704;708, 352, 352;373;374;451, 352;373;380;451, 352;373;380;451;616, 352;373;451, 352;374, 352;374;380, 352;374;380;451;616, 352;374;451, 352;374;616, 352;380, 352;380;451, 352;380;451;616, 352;380;451;623, 352;380;616, 352;451, 352;451;616, 352;616, 372;457;470;623, 373;374, 373;374;451, 373;451, 373;616, 374, 374;380, 374;380;451, 374;380;451;623, 374;451, 374;451;616, 374;616, 374;623, 380, 380;451, 380;451;616, 380;451;623, 380;616, 380;616;623, 380;623, 415, 443, 444, 444;494, 444;646, 451, 451;616, 451;623, 457, 457;470, 457;704;708, 470;708, 492;493, 517, 560, 616, 623, 723, and 748, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:14;

(f) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:300, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 9;61;444, 9;168;185;517;560;748, 9;185;415, 9;185;415;443;444;517;723;748, 9;185;415;443;444;517;560, 9;185;415;443;444;517;748, 9;185;415;444;517;723;748, 9;185;415;444;517;748, 9;185;415;444;517;560, 9;185;415;444;517;560;723;748, 9;185;415;444, 9;185;415;444;560, 9;185;415;444;723;748, 9;185;415;444;517;560;723;748, 9;185;415;517;560, 9;185;415;517;723, 9;185;415;517;748, 9;185;415;748, 9;185;443;444;517;560, 9;185;443;444;723, 9;185;443;444;560;723, 9;185;443;444;517, 9;185;444, 9;185;444;517;560, 9;185;444;560;723, 9;185;444;560;748, 9;185;444;517;560,

9;185;444;517;560;723, 9;185;444;517;560;748, 9;185;444;517;723;748, 9;185;444;560,
9;185;444;723, 9;185;444;517;560;723, 9;185;517, 9;185;517;560;723;748, 9;185;748,
9;415;443;444;517;560, 9;415;443;444;517;748, 9;415;443;444;560;723;748,
9;415;443;444;517;560, 9;415;443;444;517;560;723, 9;415;443;444;517;748, 9;415;443;560,
9;415;443;560;723;748, 9;415;444, 9;415;444;517;560;748, 9;415;444;517,
9;415;444;517;560;723;748, 9;415;444;560;723;748, 9;415;444;723;748, 9;415;444;517,
9;415;444;517;560;723;748, 9;415;444;560;723, 9;415;444;517, 9;415;444;517;560;748,
9;415;444;517, 9;415;444;560, 9;415;444;560, 9;415;444;517;560;723, 9;415;444;560,
9;415;444;560;665;723;748, 9;415;444;723;748, 9;415;517, 9;415;517;560;723;748,
9;415;517;560;723;748, 9;415;517;560;748, 9;415;560, 9;415;748, 9;443;444;517;560;723,
9;443;444;560, 9;443;444;560;723;748, 9;443;444;517, 9;443;444;560;723, 9;443;444;517,
9;443;444;517;560, 9;443;444;517;748, 9;443;517;748, 9;443;723, 9;444;517;560,
9;444;560;723, 9;444;748, 9;444;517;560;723;748, 9;444;560, 9;444;560;723, 9;444;560;748,
9;444;560;748, 9;444;748, 9;444;517;560;723;748, 9;444;517, 9;444;517;560;723,
9;444;517;723, 9;444;560;748, 9;444;723, 9;444, 9;444;517;560, 9;517, 9;517;560;723,
9;517;560;748, 9;517;560;748, 9;517;723, 9;517;748, 9;560;723;748, 9;723, 103, 103;119,
103;119;129;254;256;348;494;646, 103;119;129;444;494,
103;119;254;348,103;119;254;348;444, 103;119;254;444, 103;119;256;348;444;494;646,
103;119;256;494, 103;119;348, 103;119;348;457, 103;119;348;457;494, 103;119;457,
103;119;494, 103;119;494;646, 103;129, 103;129;254;444;457;494, 103;129;256;348,
103;129;348;646, 103;254, 103;254;256;348;444;494, 103;254;646,103;254;348,
103;254;348;494, 103;256, 103;256;444, 103;256;457, 103;256;494, 103;348, 103;348;444,
103;348;494, 103;444, 103;494, 103;494;646,119;129;254;348;494, 119;129;254;457;494,
119;129;256;348;457, 119;254;348;457, 119;256;348 119;256;348;494, 119;256;444,
119;348, 119;348;494, 185;415;443;444;517;560, 185;415;443;444;517,
185;415;444;517;560;748, 185;415;444;517;748, 185;415;444;560, 185;415;560,
185;415;560;723, 185;415;723;748, 185;443;444;560, 185;444;446;517;560,
185;444;517;560, 185;444;517;560;723;748, 185;444;517;723, 185;444;560,
185;517;560;723,185;560, 185;560;723, 185;560;748, 254;457, 256;348, 256;494, 348,
348;444, 348;444;646, 348;457, 348;494, 415, 415;443;444;517;748, 415;443;444;560,
415;443;517;560;723, 415;443;517;723, 415;444;723, 415;444;517,
415;444;517;560;723;748, 415;444;517;560;748, 415;444;560;723, 415;444;517;560;723,
415;444;517;723;748 415;517;560;723;748, 415;444;560, 415;444;560;748, 415;444,
415;517, 415;517;560, 415;517;560;748, 415;560;723, 415;723;748, 415;723;748, 415;748,
443;444;517;560;723;748, 443;444;517;748, 443;444, 443;444;560, 443;444;723, 443;517,
444, 444;517;560, 444;517;748, 444;748, 444;517;560;723;748, 444;560;723, 444;560,
444;560;723, 444;517, 444;517;560, 444;517;723;748, 444;560;748, 444;723, 444;517;560,

444;560;723, 517;560, 517;560;748, 517;723, 517;748, 517;748, 560, 723, and 723;748, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:300;

(g) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:1262, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 24, 24;27;28;701;729, 24;28;56;308;379;701, 24;28;56;701, 24;28;71;701, 24;28;321;701, 24;28;457;701, 24;31;56;386;701, 24;31, 24;31;56;697, 24;31;56;701, 24;31;56;264;701;750, 24;31;71;701, 24;56;154;270;697, 24;56;697;701, 24;56;701, 24;71;701, 24;225;701, 24;484;701, 24;28, 28;31, 31;56;701, 56;71;701, 56;119;146;701, 56;154;701, 56;322;697;701, 56;658;701, 56;697;701, 56;701,56;701;711, 697, 697;701, 71;74, 71;701, 129;511;701, 154;754, 177, 410;697;701, 423;701, 431, 697, and 701, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:1262;

(h) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:1288, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 22, 31, 31;56;264;308;379;484;547;711;750, 32, 50, 57, 69;74, 71, 71;74, 71;74;129, 71;74;145, 71;74;248, 71;74;470, 71;149, 75, 141, and 394, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:1288;

(i) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:1036, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 2, 47, 176, 253, 255, 384, 460, 467, 536, and 623, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:1036;

(j) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:1194, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 12;103;119;131;233;384;444;494;S646, 12;103;119;131;233;444;494;S646, 12;103;119;233;384;444;494;S646, 12;103;119;233;444;467;494;S646, 12;103;119;233;444;494;536;S646, 12;103;119;233;444;494;S646, 12;103;131;233;444;467;494;S646, 12;103;131;233;444;494;S646, 12;103;233;444;494;S646, 12;119;233;384;444;494;S646, 28;264;384;467;484;536;547, 103;119;131;233;384;444;494;S646, 103;119;233;444;494;S646, 103;233;444;494;S646, 264;384;467;484;536;547, 384;467;484;536;547, and 668, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:1194;

(k) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:1288, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 20;709, 27,

27;74;253;254, 27;74;253;254;255;348;369;370;381, 27;74;253;254;255;348;370;384,
27;74;253;254;255;369;370, 27;74;253;254;255;370, 27;74;253;254;255;370;381;384,
27;74;253;254;255;381, 27;74;253;254;348, 27;74;253;254;384, 27;74;253;255,
27;74;253;255;348;370;384, 27;74;253;255;348;381, 27;74;253;255;348;384,
27;74;253;348;369;370, 27;74;253;348;369;370;381, 27;74;253;348;369;370;381;384,
27;74;253;348;370, 27;74;253;381;384, 27;74;253;384, 27;74;254;255;348,
27;74;254;255;348;369;370;381, 27;74;254;255;348;370, 27;74;254;255;348;381,
27;74;254;255;381, 27;74;254;348;381;384, 27;74;254;369;370, 27;74;255;348,
27;74;255;348;369;370, 27;74;255;348;369;381;384, 27;74;255;370, 27;74;348,
27;74;369;370, 27;74;107;255;348;369;370, 27;74;253, 27;74;253;254;255,
27;74;253;254;255;348;370, 27;74;253;254;348;369;370;381, 27;74;253;254;348;369;384,
27;74;253;254;348;370, 27;74;253;254;348;370;381, 27;74;253;254;369,
27;74;253;254;370;381, 27;74;253;255;348;369;370, 27;74;253;255;370, 27;74;253;348,
27;74;253;348;370;381;384, 27;74;253;369;381;384, 27;74;254,27;74;254;255;348;369;381,
27;74;254;255;348;370;381, 27;74;254;255;369, 27;74;254;348, 27;74;254;348;369;381;384,
27;74;254;348;370, 27;74;254;348;370;381, 27;74;254;384, 27;74;255;348;370,
27;74;348;384, 27;74;253;254;255;348;369;370, 27;74;253;254;348;369,
27;74;253;254;348;369;370, 27;74;253;254;348;370;381;384, 27;74;253;254;348;381;384,
27;74;253;370, 27;74;254;255;348;369;370, 27;74;254;255;348;381;384, 27;74;370,
27;74;253;254;255;348, 27;74;253;255;348;370;381, 27;74;253;255;384,
27;74;253;348;369;370;384, 27;74;253;348;381, 27;74;254;255;348;369;384,
27;74;254;255;348;370;381;384, 27;74;254;255;370, 27;74;254;348;381, 27;74;254;369;384,
27;74;255, 27;74;255;348;369;381, 27;74;348;370, 27;74;369;370;381;384, 27;253,
27;253;254, 27;253;254;255, 27;253;254;255;260;348;381;384, 27;253;254;255;348,
27;253;254;255;348;369;370;381;384, 27;253;254;255;348;369;384,
27;253;254;255;348;370, 27;253;254;255;348;370;384, 27;253;254;255;348;381;384,
27;253;254;348, 27;253;254;348;370;381, 27;253;254;348;370;384, 27;253;254;348;381,
27;253;254;348;381;384, 27;253;254;348;384, 27;253;254;381, 27;253;254;381;384,
27;253;254;384, 27;253;255;348, 27;253;255;348;369;370, 27;253;255;348;381,
27;253;255;348;384, 27;253;255;370, 27;253;255;370;381;384, 27;253;348,
27;253;348;370;381;384, 27;253;348;370;384, 27;253;348;381;384, 27;253;369;370,
27;253;381;384, 27;254;255, 27;254;255;348, 27;254;255;348;369;370, 27;254;255;348;370,
27;254;255;348;370;381, 27;254;255;348;370;381;384, 27;254;255;348;370;384,
27;254;255;369;370;381;384, 27;254;255;370, 27;254;255;381;384, 27;254;255;384,
27;254;348;369;370;381;384, 27;254;348;370, 27;254;348;381;384, 27;254;348;384,
27;254;369;381;384, 27;254;449, 27;254;470, 27;255;348, 27;255;348;370,
27;255;348;370;381;384, 27;255;348;381;384, 27;255;370, 27;348, 27;348;369;370;381;384,

27;348;381, 27;348;384, 69, 74;253;254;369;370, 74;254;255;348;384, 84, 128, 131, 132, 133, 134, 253, 253;348;370, 254, 255, 255;348;370, 256, 317;380, 348;467, 370, 373, 377, 381, 381;672, 383, 384, 388, 453, 457, 467, 472, 615, 616, 618, 619, 620, 623, 627, 701, 705, 706, 708, and 709, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:1288; or

(l) a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:1262, and comprises at least one substitution at one or more amino acid positions or a substitution set selected from 24;31;56;701, 24;31;56;701, 24;31;71;701, 24;56;701, and 71;74, wherein said positions are numbered with reference to SEQ ID NO:1262.

3. The engineered penicillin G acylase of Claim 1 or Claim 2, wherein said penicillin G acylase capable of producing phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin.

4. The engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 3, wherein said penicillin G acylase comprises a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to at least one sequence provided in the even-numbered sequences of SEQ ID NOS:4-1902.

5. The engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 4, wherein said penicillin G acylase is encoded by a polynucleotide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NOS: 3, 7, 13, 299, 1035, 1193, 1261, and/or 1287.

6. An engineered polynucleotide sequence encoding an engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 5.

7. An engineered polynucleotide sequence encoding an engineered penicillin G acylase, wherein said engineered polynucleotide sequence is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to at least one sequence provided in the odd-numbered sequences of SEQ ID NOS:3-1901.

8. An engineered polynucleotide sequence encoding an engineered penicillin G acylase comprising a polypeptide sequence that is at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NOS: 3, 7, 13, 299, 1035, 1193, 1261, and/or 1287.

9. A vector comprising the polynucleotide sequence of any one of Claims 6 to 8.

10. A non-human host cell comprising the vector of Claim 9.

11. The non-human host cell of Claim 10, wherein said host cell is a prokaryotic or eukaryotic cell, optionally wherein the host cell is *E. coli*.

12. A composition comprising at least one engineered penicillin G acylase provided in any one of Claims 1 to 5.

13. A method for producing the engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 5, comprising culturing the host cell of Claim 11, under conditions such that said engineered penicillin G acylase is produced.

14. An *in vitro* method for producing phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, comprising: i) providing the engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 5 and/or the composition of Claim 12, and insulin comprising A1/B1/B29 tri-phenyl acetate protecting groups; and ii) exposing said engineered penicillin G acylase to said insulin comprising A1/B1/B29 tri-phenyl acetate protecting groups, under conditions such that said engineered penicillin G acylase removes the A1, B1 and/or B29 tri-phenyl acetate protecting groups from said insulin thereby producing phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, optionally wherein said penicillin G acylase:

removes the A1 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin; or
removes the B1 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin; or
removes the B29 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin; or
removes the A1, B1, and B29 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin.

15. The method of Claim 14, wherein said engineered penicillin G acylase produces more than 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, as compared to the production of phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin by the polypeptide of SEQ ID NO:2.

16. A composition comprising phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin produced according to the method of any one of Claims 14 to 15.

17. An *in vitro* method for producing phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, comprising: i) providing the engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 5 and/or the composition of Claim 12, and free insulin; and ii) exposing said engineered penicillin G

acylase to said insulin, under conditions such that said engineered penicillin G acylase acylates the A1, B1, and/or B29 position, thereby producing mono-protected or di-protected insulin; optionally wherein said penicillin G acylase acylates:

the A1 position of said insulin; or

the B1 position of said insulin; or

the B29 position of said insulin; or

the A1, B1, and B29 position of said insulin.

18. The method of Claim 17, wherein said engineered penicillin G acylase produces more than 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, as compared to the production of phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin by the polypeptide of SEQ ID NO:2.

19. A composition comprising phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin produced according to the method of any one of Claims 17 to 18.

20. An *in vitro* method for producing phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, comprising: i) providing the engineered penicillin G acylase of any one of Claims 1 to 5 and/or the composition of Claim 12, and insulin; and ii) exposing said engineered penicillin G acylase to said insulin, under conditions such that said engineered penicillin G acylase adds the A1, B1 and/or B29 tri-phenyl acetate protecting groups to said insulin thereby producing phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin; optionally wherein said penicillin G acylase adds:

the A1 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin; or

the B1 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin; or

the B29 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin; or

the A1, B1, and B29 tri-phenyl acetate protecting group of said insulin.

21. The method of Claim 20, wherein said engineered penicillin G acylase produces more than 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin, as compared to the production of phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin by the polypeptide of SEQ ID NO:2.

22. A composition comprising phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin produced according to the method of Claim 20 or Claim 21.

23. The method of any one of Claims 14 to 15, 17 to 18, and/or 20 to 21, wherein said penicillin G acylase comprises SEQ ID NO:837; 1219; 897 or 1859.

24. A composition comprising phenyl acetate mono-protected or di-protected insulin produced according to at least one method of any one of Claims 14, 15, 17, 18, 20 and/or 21.