

一种从 L-高丝氨酸直接制备 L-甲硫氨酸的方法

技术领域

- 5 本发明属于生物化工领域。具体而言，本发明涉及一种以 L-高丝氨酸为底物直接酶促制备 L-甲硫氨酸的方法。

背景技术

- 甲硫氨酸是蛋白质中的 20 种天然氨基酸之一，也是合成 S-腺苷甲硫氨酸的前体，S-腺苷甲硫氨酸在人体内作为甲基的供体，参与大量重要的代谢过程。人不能合成甲硫氨酸，必须通过(例如)食物摄入来获得。甲硫氨酸也是一种饲料添加剂，在畜、禽以及鱼类养殖中大量使用。

甲硫氨酸可以通过化学合成制备。然而，化学合成的甲硫氨酸为消旋体，是 D/L 混合型甲硫氨酸，而 D 型甲硫氨酸在生物体内是难以利用的。

- 15 也可以通过生物合成获得光学纯的 L-甲硫氨酸，实现较高的生物利用率。生物合成甲硫氨酸通常通过将参与甲硫氨酸生物合成代谢途径的酶(参见图 1) 引入宿主细胞进行(参见例如 CN 105886449 B、CN 106906176 A、CN 103781913 B 和 CN 114787369 A)。然而，生物合成需要向宿主细胞引入大量外源基因，需要复杂的遗传工程操作；并且由于甲硫氨酸的合成代谢途径受到复杂的调控网络控制，难以实现高产量。

- 20 还开发了以甲基封端的硫醚，如二甲基二硫醚作为硫和甲基的来源，通过用谷氨酸棒杆菌或者大肠杆菌的突变体发酵将 O-乙酰基高丝氨酸硫化和甲基化合成甲硫氨酸的方法(参见 CN 101223280 B)。然而，在此方法中，硫醚分解产生的甲硫醇对微生物有较强的毒害作用，影响微生物的生长，也不利于甲硫氨酸的合成。

- 25 还开发了用 O-琥珀酰巯基转移酶催化 O-琥珀酰高丝氨酸和甲硫醇钠反应合成 L-甲硫氨酸的方法(参见 CN 113215124 A)和用 O-酰基高丝氨酸硫化氢解酶催化 O-酰基高丝氨酸，如 O-乙酰基高丝氨酸或 O-琥珀酰基高丝氨酸与甲硫醇反应合成 L-甲硫氨酸的方法(参见 WO 2008/013432 A1)。然而，30 这些方法需要先生产(例如通过发酵) O-酰基高丝氨酸，从而受限于 i) O-酰基高丝氨酸的积累量；ii) O-酰基高丝氨酸(对酸、碱和加热)的不稳定性；iii)

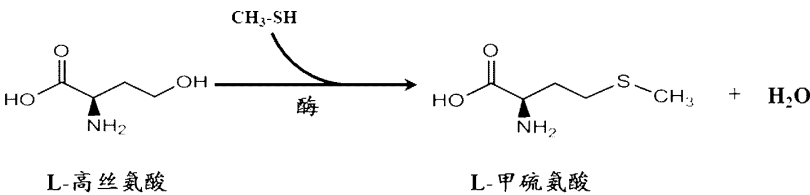
副产物有机酸对酶活性的抑制；和 iv) 如果在反应过程中调节 pH，增加生产成本、工艺复杂性和产物分离难度。

因此，需要开发新的制备 L-甲硫氨酸的方法，使用容易获得的稳定底物，降低产物对反应的抑制，简化工艺（包括生产和分离）并降低成本。

5

发明内容

出人意料地，发明人发现，L-高丝氨酸可以在酶的催化下与甲硫醇反应，生成 L-甲硫氨酸和水(如式 I 所示)。



式 I

10 L-高丝氨酸是比 O-酰基高丝氨酸更易获得的且更稳定的化合物，并且本发明的反应不产生抑制酶活性的有机酸副产物。

因此，本发明提供一种制备 L-甲硫氨酸的方法，包括以下步骤：

a) 提供反应介质，其包含 L-高丝氨酸或其盐、酯、酰胺或酸酐，甲硫醇或其盐和酶，所述酶选自转移除甲基外的烷基或芳香基的转移酶、氨裂解酶和催化碳-硫键断裂的裂解酶；

b) 温育所述反应介质以产生包含 L-甲硫氨酸或其盐、酯或酰胺的反应产物；和任选存在的

c) 从所述反应产物回收 L-甲硫氨酸或其盐、酯或酰胺。

20 在一些实施方案中，所述酶选自 EC 编号为 EC 2.5.1.-、EC 4.3.1.-和 EC 4.4.1.-的酶。

在一些实施方案中，所述反应介质还包含磷酸吡哆醛或其盐。

在一些实施方案中，所述酶选自 EC 编号为 EC 2.5.1.47、EC 2.5.1.48、EC 2.5.1.49、EC 2.5.1.51、EC 2.5.1.52、EC 2.5.1.65、EC 2.5.1.76、EC 2.5.1.113、EC 2.5.1.134、EC 2.5.1.140、EC 2.5.1.144、EC 4.3.1.15、EC 4.3.1.17、EC 4.3.1.18、EC 4.3.1.19、EC 4.4.1.1、EC 4.4.1.2、EC 4.4.1.9、EC 4.4.1.10、EC 4.4.1.11、EC 4.4.1.13、EC 4.4.1.15、EC 4.4.1.16、EC 4.4.1.25、EC 4.4.1.28 和 EC 4.4.1.35 的酶。

在一些实施方案中，所述酶来源于选自 *Thermus thermophiles*、球形赖

氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)、艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)、诺氏梭菌(*Clostridium novyi*)、嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)、海栖热胞菌(*Thermotoga maritima*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、独岛不动滑菌(*Nonlabens dokdonensis*)、银合欢
5 (*Leucaena leucocephala*)、*Aeropyrum pernix*、*Methanosarcina acetivorans*、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)、暗产色链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、*Cyanobacteria bacterium*、恶臭假单胞菌
10 (*Pseudomonas putida*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、*Ruegeria pomeroyi*、*Methanococcus maripaludis* 和亚麻荠(*Camelina sativa*)的生物体。

在一些实施方案中，所述酶选自来源于 *Thermus thermophilus* 的半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.47 - cysteine synthase)、来源于球形赖氨酸芽孢杆菌的胱硫醚 γ 合酶(EC 2.5.1.48 - cystathionine gamma-synthase)、来源于艰难梭菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶(EC 2.5.1.49 - O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase)、来源于诺氏梭菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于海栖热胞菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于绿脓假单胞菌 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于独岛不动滑菌的 β 吡唑酰丙氨酸合酶(EC 2.5.1.51 - beta-pyrazolylalanine synthase)、来源于银合欢的 L-含羞草素合酶(EC 2.5.1.52 - L-mimosine synthase)、来源于 *Aeropyrum pernix* 的 O-磷酸丝氨酸硫化氢解酶(EC 2.5.1.65 - O-phosphoserine sulfhydrylase)、来源于 *Methanosarcina acetivorans* 的半胱氨酸合酶(EC
25 2.5.1.76 - cystate synthase)、来源于结核分支杆菌的[CysO 硫载体蛋白]-硫酸酯依赖性半胱氨酸合酶 (EC 2.5.1.113 - [CysO sulfur-carrier protein]-thiocarboxylate-dependent cysteine synthase)、来源于枯草芽孢杆菌的胱硫醚 β 合酶(EC 2.5.1.134 - cystathionine beta-synthase)、来源于金黄色葡萄球菌的 N-(2-氨基-2-羧基乙基)-L-谷氨酸合酶 (EC 2.5.1.140 -
30 N-(2-amino-2-carboxyethyl)-L-glutamate synthase)、来源于荧光假单胞菌的 S-硫-L-半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.144 - S-sulfo-L-cysteine synthase)、来源于大

肠杆菌的二氨基丙酸氨裂解酶(EC 4.3.1.15 - Diaminopropionate ammonia-lyase)、来源于大肠杆菌的 L-丝氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.17 - L-serine ammonia-lyase)、来源于大肠杆菌的 D-丝氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.18 - D-serine ammonia-lyase)、来源于麦芽糖假丝酵母的苏氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.19 - threonine ammonia-lyase)、来源于暗产色链霉菌的胱硫醚 γ 裂解酶(EC 4.4.1.1 - cystathionine gamma-lyase)、来源于粗糙脉孢菌的胱硫醚 γ 裂解酶(EC 4.4.1.1 - cystathionine gamma-lyase)、来源于枯草芽孢杆菌的高半胱氨酸脱巯基酶(EC 4.4.1.2 - homocysteine desulfhydrase)、来源于菠菜的 L-3-氰基丙氨酸合酶(EC 4.4.1.9 - L-3-cyanoalanine synthase)、来源于 *Cyanobacteria* bacterium 的半胱氨酸裂解酶(EC 4.4.1.10 - cysteine lyase)、来源于恶臭假单胞菌的甲硫氨酸 γ 裂解酶(EC 4.4.1.11 - methionine gamma-lyase)、来源于乳酸乳球菌的半胱氨酸 S 缀合物 β 裂解酶(EC 4.4.1.13 - cysteine-S-conjugate beta-lyase)、来源于大肠杆菌的 D-半胱氨酸脱巯基酶(EC 4.4.1.15 - D-cysteine desulfhydrase)、来源于大肠杆菌的硒代半胱氨酸裂解酶(EC 4.4.1.16 - selenocysteine lyase)、来源于 *Ruegeria pomeroyi* 的 L-半胱氨酸硫裂解酶(EC 4.4.1.25 - L-cysteate sulfo-lyase)、来源于 *Methanococcus maripaludis* 的 L-半胱氨酸脱硫化物酶(EC 4.4.1.28 - L-cysteine desulfidase)和来源于亚麻荠的 L-半胱氨酸 β 裂解酶(EC 4.4.1.35 - L-cystine beta-lyase)。

在一些实施方案中,所述酶包含选自 SEQ ID NO: 1-31 的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中,所述方法是无细胞方法。

在一些实施方案中,步骤 a)中的所述反应介质包含表达所述酶的宿主细胞。在一些实施方案中,本发明的方法还包括培养所述宿主细胞的步骤。

在一些实施方案中,在步骤 b)中,在 30-40°C、32-39°C、34-38°C、36-38°C 或 37°C 温育所述反应介质。

25

附图说明

图 1 是甲硫氨酸生物合成途径的示意图(参见 Brewster, J. L., *et al.*, Structures and kinetics of *Thermotoga maritima* MetY reveal new insights into the predominant sulfurylation enzyme of bacterial methionine biosynthesis. The Journal of biological chemistry, 2021, 296, 100797)。

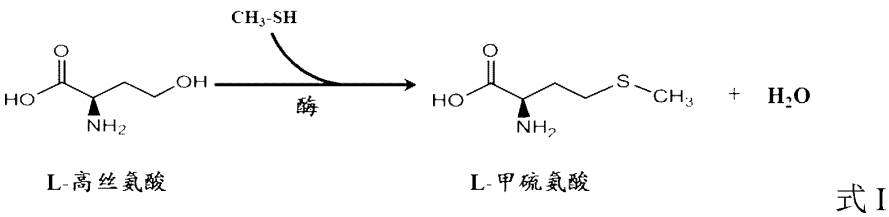
30

发明详述

本发明提供一种制备 L-甲硫氨酸的新方法。除非另有说明，本文中使用的术语具有本领域技术人员一般理解的含义。

现有技术报道，4-羟基活化的 L-高丝氨酸(如 O-酰基高丝氨酸)可以在酶的催化下与甲硫醇反应，产生 L-甲硫氨酸。

出人意料地，发明人发现，L-高丝氨酸可以在酶的催化下与甲硫醇反应，生成 L-甲硫氨酸和水(如式 I 所示)。



L-高丝氨酸是比 O-酰基高丝氨酸更易获得的且更稳定的化合物，并且式 I 的反应不产生抑制酶活性的有机酸副产物。

因此，本发明提供一种制备 L-甲硫氨酸的方法，包括以下步骤：

- a) 提供反应介质，其包含 L-高丝氨酸供体，甲硫基供体和酶，所述酶选自转移除甲基外的烷基或芳香基的转移酶、氨裂解酶和催化碳-硫键断裂的裂解酶；
- b) 温育所述反应介质以产生包含 L-甲硫氨酸或其盐、酯或酰胺的反应产物；和任选存在的
- c) 从所述反应产物回收 L-甲硫氨酸或其盐、酯或酰胺。

一、底物和产物

如本文所用，“L-高丝氨酸”是指 L-2-氨基-4-羟基-1-酸，分子式为 C₄H₉NO₃。在本文中，L-高丝氨酸供体包括但不限于 L-高丝氨酸或其盐、酯或酰胺，以及 L-高丝氨酸与 L-高丝氨酸或其他酸形成的酸酐。L-高丝氨酸供体也包括其氨基上的一或两个氢被取代的衍生物。L-高丝氨酸的酯是指 L-高丝氨酸的羧基与醇或酚反应产生的化合物。L-高丝氨酸酰胺是指 L-高丝氨酸的羧基与胺类化合物反应产生的化合物。

在本文中，L-高丝氨酸供体不包括 4-羟基的氢原子被酰基取代的衍生物，即 O-酰基高丝氨酸。

在步骤 b)中，L-高丝氨酸是酶的直接底物。本发明的方法不包括产生

O-酰基-L-高丝氨酸的步骤，且所述方法不使用 O-酰基-L-高丝氨酸。

如本文所用，“甲硫基供体”是指能够提供甲硫基(CH₃S-)的化合物，包括但不限于甲硫醇或其盐以及甲基封端的硫醚或二硫醚，例如二甲基二硫醚。在一些实施方案中，所述甲硫基供体是甲硫醇或其盐，包括但不限于甲硫醇钠和甲硫醇钾。

二、酶

如上所述，本发明的反应在酶的催化下进行，即酶促反应。

如本文所用，术语“酶”是指能够特异性催化或促进化学或生物化学反应的蛋白质或多肽。本发明的酶可以是完整的天然蛋白质或多肽或其具有催化活性的部分。本发明的酶也可以是天然蛋白质或多肽的经修饰的变体。本发明的酶可以分离自生物体、重组产生或合成产生。本领域技术人员能够通过常规方法获得酶。

如本文所用，术语“肽”表示通过肽键连接的至少两个氨基酸的链。术语“多肽”在本文中可以与术语“蛋白质”互换使用，是指含有十个或更多个氨基酸残基的链。本文中的所有肽和多肽化学式或序列均是从左至右书写的，表示从氨基末端至羧基末端的方向。

术语“氨基酸”包括蛋白质中天然存在的氨基酸和非天然氨基酸。蛋白质中天然存在的氨基酸的单字母和三字母命名采用本领域惯用名，可见于 Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。

	氨基酸	单字母	三字母
	丙氨酸	A	Ala
25	精氨酸	R	Arg
	天冬酰胺	N	Asn
	天冬氨酸	D	Asp
	半胱氨酸	C	Cys
	谷氨酰胺	Q	Gln
30	谷氨酸	E	Glu
	甘氨酸	G	Gly

	组氨酸	H	His
	异亮氨酸	I	Ile
	亮氨酸	L	Leu
	赖氨酸	K	Lys
5	甲硫氨酸	M	Met
	苯丙氨酸	F	Phe
	脯氨酸	P	Pro
	丝氨酸	S	Ser
	苏氨酸	T	Thr
10	色氨酸	W	Trp
	酪氨酸	Y	Tyr
	缬氨酸	V	Val

如本文所用，术语“修饰”是指对由本发明的多肽或其同源序列组成的多肽的任何修饰，包括但不限于，取代、删除、插入和/或添加一或多个氨基酸。

一些酶的催化作用需要辅酶参与。术语“辅酶”是一大类有机辅助因子的总称，是酶催化氧化还原反应、基团转移和异构反应的必须因子。它们在酶催化反应中承担传递电子、原子或基团的功能。

发明人发现，用于本发明的酶仅以磷酸吡哆醛作为辅酶。因此，在一些实施方案中，所述反应介质还包含磷酸吡哆醛或其盐。

在一些实施方案中，所述酶选自 EC 编号为 EC 2.5.1.-、EC 4.3.1.-和 EC 4.4.1.-的酶。

在一些实施方案中，所述酶选自 EC 编号为 EC 2.5.1.47、EC 2.5.1.48、EC 2.5.1.49、EC 2.5.1.51、EC 2.5.1.52、EC 2.5.1.65、EC 2.5.1.76、EC 2.5.1.113、EC 2.5.1.134、EC 2.5.1.140、EC 2.5.1.144、EC 4.3.1.15、EC 4.3.1.17、EC 4.3.1.18、EC 4.3.1.19、EC 4.4.1.1、EC 4.4.1.2、EC 4.4.1.9、EC 4.4.1.10、EC 4.4.1.11、EC 4.4.1.13、EC 4.4.1.15、EC 4.4.1.16、EC 4.4.1.25、EC 4.4.1.28 和 EC 4.4.1.35 的酶。

在一些实施方案中，所述酶选自半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.47 - cysteine synthase)、胱硫醚 γ 合酶(EC 2.5.1.48 - cystathionine gamma-synthase)、O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶(EC 2.5.1.49 - O-acetylhomoserine

aminocarboxypropyltransferase)、 β 吡唑酰丙氨酸合酶(EC 2.5.1.51 - beta-pyrazolylalanine synthase)、L-含羞草素合酶(EC 2.5.1.52 - L-mimosine synthase)、O-磷酸丝氨酸硫化氢解酶(EC 2.5.1.65 - O-phosphoserine sulfhydrylase)、半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.76 - cysteine synthase)、[CysO 硫载体蛋白]-硫酯依赖性半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.113 - [CysO sulfur-carrier protein]-thiocarboxylate-dependent cysteine synthase)、胱硫醚 β 合酶(EC 2.5.1.134 - cystathionine beta-synthase)、N-(2-氨基-2-羧基乙基)-L-谷氨酸合酶(EC 2.5.1.140 - N-(2-amino-2-carboxyethyl)-L-glutamate synthase)、S-硫-L-半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.144 - S-sulfo-L-cysteine synthase)、二氨基丙酸氨裂解酶(EC 4.3.1.15 - Diaminopropionate ammonia-lyase)、L-丝氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.17 - L-serine ammonia-lyase)、D-丝氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.18 - D-serine ammonia-lyase)、苏氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.19 - threonine ammonia-lyase)、胱硫醚 γ 裂解酶(EC 4.4.1.1 - cystathionine gamma-lyase)、高半胱氨酸脱巯基酶(EC 4.4.1.2 - homocysteine desulfhydrase)、L-3-氰基丙氨酸合酶(EC 4.4.1.9 - L-3-cyanoalanine synthase)、半胱氨酸裂解酶(EC 4.4.1.10 - cysteine lyase)、甲硫氨酸 γ 裂解酶(EC 4.4.1.11 - methionine gamma-lyase)、半胱氨酸 S 缀合物 β 裂解酶(EC 4.4.1.13 - cysteine-S-conjugate beta-lyase)、D-半胱氨酸脱巯基酶(EC 4.4.1.15 - D-cysteine desulfhydrase)、硒代半胱氨酸裂解酶(EC 4.4.1.16 - selenocysteine lyase)、L-半胱氨酸硫裂解酶(EC 4.4.1.25 - L-cysteate sulfo-lyase)、L-半胱氨酸脱硫化物酶(EC 4.4.1.28 - L-cysteine desulfidase)和 L-胱氨酸 β 裂解酶(EC 4.4.1.35 - L-cystine beta-lyase)。

本发明的酶可以来源于任何合适的生物体，包括原核生物和真核生物，例如但不限于古细菌、放线菌、细菌、真菌、动物、植物、藻类和酵母。

25 在一些实施方案中，所述酶来源于选自 *Thermus thermophiles*、球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)、艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)、诺氏梭菌(*Clostridium novyi*)、嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)、海栖热胞菌(*Thermotoga maritima*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、独岛不动滑菌(*Nonlabens dokdonensis*)、银合欢(*Leucaena leucocephala*)、*Aeropyrum pernix*、*Methanosarcina acetivorans*、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)、暗产色链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、*Cyanobacteria bacterium*、恶臭假单胞菌
5 (*Pseudomonas putida*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、*Ruegeria pomeroyi*、*Methanococcus maripaludis* 和亚麻荠(*Camelina sativa*)的生物体。

在一些实施方案中，所述酶选自来源于 *Thermus thermophilus* 的半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.47 - cysteine synthase)、来源于球形赖氨酸芽孢杆菌的胱硫醚 γ 合酶(EC 2.5.1.48 - cystathionine gamma-synthase)、来源于艰难梭菌的
10 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶(EC 2.5.1.49 - O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase)、来源于诺氏梭菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于海栖热胞菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于绿脓假单胞菌 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于独岛不动
15 滑菌的 β 吡唑酰丙氨酸合酶(EC 2.5.1.51 - beta-pyrazolylalanine synthase)、来源于银合欢的 L-含羞草素合酶(EC 2.5.1.52 - L-mimosine synthase)、来源于 *Aeropyrum pernix* 的 O-磷酸丝氨酸硫化氢解酶(EC 2.5.1.65 - O-phosphoserine sulfhydrylase)、来源于 *Methanosarcina acetivorans* 的半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.76 - cysteate synthase)、来源于结核分支杆菌的[CysO 硫载体蛋白]-硫酯
20 依赖性半胱氨酸合酶 (EC 2.5.1.113 - [CysO sulfur-carrier protein]-thiocarboxylate-dependent cysteine synthase)、来源于枯草芽孢杆菌的胱硫醚 β 合酶(EC 2.5.1.134 - cystathionine beta-synthase)、来源于金黄色葡萄球菌的 N-(2-氨基-2-羧基乙基)-L-谷氨酸合酶 (EC 2.5.1.140 - N-(2-amino-2-carboxyethyl)-L-glutamate synthase)、来源于荧光假单胞菌的
25 S-硫-L-半胱氨酸合酶(EC 2.5.1.144 - S-sulfo-L-cysteine synthase)、来源于大肠杆菌的二氨基丙酸氨裂解酶 (EC 4.3.1.15 - Diaminopropionate ammonia-lyase)、来源于大肠杆菌的 L-丝氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.17 - L-serine ammonia-lyase)、来源于大肠杆菌的 D-丝氨酸氨裂解酶(EC 4.3.1.18 - D-serine ammonia-lyase)、来源于麦芽糖假丝酵母的苏氨酸氨裂解酶(EC
30 4.3.1.19 - threonine ammonia-lyase)、来源于暗产色链霉菌的胱硫醚 γ 裂解酶 (EC 4.4.1.1 - cystathionine gamma-lyase)、来源于粗糙脉孢菌的胱硫醚 γ 裂解

酶(EC 4.4.1.1 - cystathionine gamma-lyase)、来源于枯草芽孢杆菌的高半胱氨酸脱巯基酶(EC 4.4.1.2 - homocysteine desulfhydrase)、来源于菠菜的 L-3-氰基丙氨酸合酶(EC 4.4.1.9 - L-3-cyanoalanine synthase)、来源于 *Cyanobacteria bacterium* 的半胱氨酸裂解酶(EC 4.4.1.10 - cysteine lyase)、来源于恶臭假单胞菌的甲硫氨酸 γ 裂解酶(EC 4.4.1.11 - methionine gamma-lyase)、来源于乳酸乳球菌的半胱氨酸 S 缀合物 β 裂解酶(EC 4.4.1.13 - cysteine-S-conjugate beta-lyase)、来源于大肠杆菌的 D-半胱氨酸脱巯基酶(EC 4.4.1.15 - D-cysteine desulfhydrase)、来源于大肠杆菌的硒代半胱氨酸裂解酶(EC 4.4.1.16 - selenocysteine lyase)、来源于 *Ruegeria pomeroyi* 的 L-半胱氨酸硫裂解酶(EC 4.4.1.25 - L-cysteate sulfo-lyase)、来源于 *Methanococcus maripaludis* 的 L-半胱氨酸脱硫化物酶(EC 4.4.1.28 - L-cysteine desulfidase)和来源于亚麻荠的 L-半胱氨酸 β 裂解酶(EC 4.4.1.35 - L-cystine beta-lyase)。在一些实施方案中, 所述酶是来自诺氏梭菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶。

在一些实施方案中, 所述酶包含选自 SEQ ID NO: 1-31 的氨基酸序列。

15 在一些实施方案中, 所述酶是经修饰的变体。

如本文所用, 术语“变体”是指与给定多肽或核酸的氨基酸或核苷酸序列相比具有一定序列相同性的多肽或核酸。

对于本发明, 为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的相同性百分比, 以最佳比较为目的比对序列(例如在第一个氨基酸或核酸序列中可导入缺口, 以与第二个氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一个序列中的位置在第二个序列中相应位置由相同氨基酸残基或核苷酸占据时, 则这些分子在这个位置是相同的。两个序列之间的相同性百分比是所述序列共有的相同位置的数量数量的函数(即相同性百分比=相同位置的数量/位置(即重叠位置)的总数量 $\times 100$)。优选地, 这两个序列是相同长度的。

本领域技术人员知晓, 可以使用不同的计算机程序确定两个序列之间的相同性。

“氨基酸相同性百分比”或者“氨基酸序列相同性百分比”是指比较两个多肽的氨基酸, 当最佳比对时, 所述两个多肽具有大约指定的相同氨基酸百分比。例如, “95%的氨基酸相同性”是指比较两个多肽的氨基酸, 当最佳比对时, 所述两个多肽有 95%的氨基酸相同。

5 在一些实施方案中,所述酶包含与选自 SEQ ID NO: 1-31 的氨基酸序列具有至少 65%或 70%,优选至少 75%或 80%,更优选至少 85%或 90%,特别优选至少 94%、95%、96%、97%、98%或 99%,最优选至少 99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%的序列相同性的氨基酸序列,所述酶具有催化式 I 的反应的活性。

10 在一些实施方案,所述酶的氨基酸序列与选自 SEQ ID NO: 1-31 的氨基酸序列的区别在于,具有一或多个氨基酸的取代、删除、插入和/或添加,所述酶具有催化式 I 的反应的活性。在一些实施方案中,所述酶的氨基酸序列与选自 SEQ ID NO: 1-31 的氨基酸序列相比,具有一或多个氨基酸的保守取代,所述酶具有催化式 I 的反应的活性。在一些实施方案中,所述酶的氨基酸序列与选自 SEQ ID NO: 1-31 的氨基酸序列相比,具有一或多个氨基酸的插入或删除,所述酶具有催化式 I 的反应的活性。

15 术语“保守取代”也称为由“同源”氨基酸残基取代,是指其中氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基置换的取代,例如,碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、非荷电极性侧链氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支的侧链氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳香侧链氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

保守氨基酸取代通常对所得蛋白质的活性的影响最小。这种取代在下文描述。保守取代是用大小、疏水性、电荷、极性、空间特征、芳香性等相似的氨基酸置换一个氨基酸。当希望精细调节蛋白质的特性时,这种取代通常是保守的。

25 如本文所用,“同源”氨基酸残基是指具有相似化学性质的氨基酸残基,所述化学性质涉及疏水性、电荷、极性、空间特征、芳香性特征等。彼此同源的氨基酸的例子包括正电荷的赖氨酸、精氨酸、组氨酸,负电荷的谷氨酸、天冬氨酸,疏水性的甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸,极性的丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺,芳香性的苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸,化学相似侧链基团的丝氨酸与苏氨酸,或者谷氨酰胺和天冬酰胺,或者亮

30

氨酸和异亮氨酸。

蛋白质中氨基酸保守取代的例子包括：Ser 取代 Ala，Lys 取代 Arg，Gln 或 His 取代 Asn，Glu 取代 Asp，Ser 取代 Cys，Asn 取代 Gln，Asp 取代 Glu，Pro 取代 Gly，Asn 或 Gln 取代 His，Leu 或 Val 取代 Ile，Ile 或 Val 取代 Leu，Arg 或 Gln 取代 Lys，Leu 或 Ile 取代 Met，Met、Leu 或 Tyr 取代 Phe，Thr 取代 Ser，Ser 取代 Thr，Tyr 取代 Trp，Trp 或 Phe 取代 Tyr，及 Ile 或 Leu 取代 Val。

三、制备条件

10 本发明的酶可以以分离的多肽的形式提供。

在一些实施方案中，所述方法是无细胞方法，即步骤 a)中的反应介质包含分离的酶。所述酶可以是重组产生的或合成的。在一些实施方案中，所述反应介质是水性介质，优选水性缓冲液，例如磷酸盐缓冲液，如 PBS。

15 在一些实施方案中，步骤 a)中的所述反应介质包含表达所述酶的宿主细胞。在一些实施方案中，本发明的方法还包括培养所述宿主细胞的步骤。在一些实施方案中，所述反应介质包含培养所述宿主细胞的培养基。在一些实施方案中，所述反应介质是水性介质，优选水性缓冲液，例如磷酸盐缓冲液，如 PBS。

20 在一些实施方案中，所述宿主细胞包含编码所述酶的表达载体。在一些实施方案中，所述宿主细胞是大肠杆菌，例如，大肠杆菌 BL21(DE3)。在一些实施方案中，所述载体是原核表达载体，如 pET-29b(+).

在一些实施方案中，在步骤 b)中，在 30-40°C、32-39°C、34-38°C、36-38°C 或 37°C 温育所述反应介质。

25 在一些实施方案中，所述反应介质的 pH 为约 5-约 8，优选约 6-约 7.8，例如 7.5。

实施例

通过以下实施例，本领域技术人员会更清楚地理解本发明。应理解，实施例只是用于说明，而非限制本发明的范围。

30

实施例 1、材料和方法

如无特别说明，本发明中使用的实验方法均为常规方法，基因克隆操作具体可参见前述 Sambrook et al., 1989。

- i) 试剂:
- 5

10

15

20
- 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自碧云天生物技术有限公司;

- L-高丝氨酸购自江苏艾康生物医药研发有限公司;

- L-甲硫氨酸购自默克 Sigma-Aldrich;

- 甲硫醇钠、磷酸吡哆醛(PLP)、色谱级磷酸氢二钠、四硼酸钠、甲醇和乙腈购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

- 磷酸二氢钠、氢氧化钠和曲拉通-X100 购自生工生物工程（上海）股份有限公司;

- OPA 试剂购自安捷伦科技（中国）有限公司。
- ii) 载体和菌株:
- 实施例中所使用的表达载体为 pET-29b(+), 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;

- 实施例中所使用的宿主细胞为大肠杆菌 BL21(DE3), 购自天根生化科技(北京)有限公司。
- iii) 基因克隆:
- 将编码表 1 中各酶的核酸序列提交至生工生物工程（上海）股份有限公司合成，获得含有编码各酶的核酸序列的 pET29b(+)表达载体。

表 1

酶	EC 编号	物种	NCBI-ProteinID	氨基酸序列
半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.47	<i>Thermus thermophilus</i>	BAD70170	SEQ ID NO: 1
胱硫醚 γ 合酶	EC 2.5.1.48	球形赖氨酸芽孢杆菌	ACA40889	SEQ ID NO: 2
O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶	EC 2.5.1.49	艰难梭菌	APU51341	SEQ ID NO: 3
O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶	EC 2.5.1.49	诺氏梭菌	WP_011721301	SEQ ID NO: 4
O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶	EC 2.5.1.49	嗜热脂肪地芽孢杆菌	ALA70660	SEQ ID NO: 5
O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶	EC 2.5.1.49	海栖热胞菌	WP_004080710	SEQ ID NO: 6
O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶	EC 2.5.1.49	绿脓假单胞菌	NP_253712	SEQ ID NO: 7
β 吡唑酰丙氨酸合酶	EC 2.5.1.51	独岛不动滑菌	BAA05965	SEQ ID NO: 8
L-含羞草素合酶	EC 2.5.1.52	银合欢	AHG97874	SEQ ID NO: 9

O-磷酸丝氨酸硫化氢解酶	EC 2.5.1.65	<i>Aeropyrum pernix</i>	BAA80586	SEQ ID NO: 10
半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.76	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	AAM06667	SEQ ID NO: 11
[CysO 硫载体蛋白]-硫酯依赖性半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.113	结核分支杆菌	NP_215852	SEQ ID NO: 12
胱硫醚 β 合酶	EC 2.5.1.134	枯草芽孢杆菌	NP_390604	SEQ ID NO: 13
N-(2-氨基-2-羧基乙基)-L-谷氨酸合酶	EC 2.5.1.140	金黄色葡萄球菌	BAF66332	SEQ ID NO: 14
S-硫-L-半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.144	荧光假单胞菌	AIG05382	SEQ ID NO: 15
二氨基丙氨酸裂解酶	EC 4.3.1.15	大肠杆菌	BAE76937	SEQ ID NO: 16
L-丝氨酸氨裂解酶	EC 4.3.1.17	大肠杆菌	BAA15621	SEQ ID NO: 17
D-丝氨酸氨裂解酶	EC 4.3.1.18	大肠杆菌	BAA16229	SEQ ID NO: 18
苏氨酸氨裂解酶	EC 4.3.1.19	麦芽糖假丝酵母	EMG50701	SEQ ID NO: 19
胱硫醚 γ 裂解酶	EC 4.4.1.1	暗产色链霉菌	WP_266761426	SEQ ID NO: 20
胱硫醚 γ 裂解酶	EC 4.4.1.1	粗糙脉孢菌	AF401238_1	SEQ ID NO: 21
高半胱氨酸脱巯基酶	EC 4.4.1.2	枯草芽孢杆菌	NP_390603	SEQ ID NO: 22
L-3-氧基丙氨酸合酶	EC 4.4.1.9	菠菜	BAA07177.1	SEQ ID NO: 23
半胱氨酸裂解酶	EC 4.4.1.10	<i>Cyanobacteria bacterium</i>	HAA27123	SEQ ID NO: 24
甲硫氨酸 γ 裂解酶	EC 4.4.1.11	恶臭假单胞菌	AAN66932	SEQ ID NO: 25
半胱氨酸 S 缀合物 β 裂解酶	EC 4.4.1.13	乳酸乳球菌	ABJ72384	SEQ ID NO: 26
D-半胱氨酸脱巯基酶	EC 4.4.1.15	大肠杆菌	BAA15739	SEQ ID NO: 27
硒代半胱氨酸裂解酶	EC 4.4.1.16	大肠杆菌	BAA15457	SEQ ID NO: 28
L-半胱氨酸硫裂解酶	EC 4.4.1.25	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	AAV97294	SEQ ID NO: 29
L-半胱氨酸脱硫化物酶	EC 4.4.1.28	<i>Methanococcus maripaludis</i>	CAF31024	SEQ ID NO: 30
L-胱氨酸 β 裂解酶	EC 4.4.1.35	亚麻荠	XP_010509309	SEQ ID NO: 31

iv) 重组宿主细胞制备

将各表达载体分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中，涂布于 LB 琼脂培养基(含有 50mg/L 的卡那霉素)，37°C 温育过夜，然后挑取单菌落至 LB 液体培养基(含有 50mg/L 的卡那霉素)中培养，测序验证合成序列的正确性。经验证的克隆于-80°C 保藏用于后续实验。

v) 蛋白质表达及全细胞催化剂的制备：

在 LB 琼脂培养基上将保藏的克隆活化。然后，将单菌落接种至 LB 液体培养基(含有 50mg/L 的卡那霉素)中，37°C 震荡温育 12h。将 400μL 培养物转接至 20mL 新鲜的 LB 液体培养基(含有 50mg/L 的卡那霉素)中，37°C 震荡温育至 OD600 达到约 0.6，加入 IPTG (终浓度为 0.4mM)在 25°C 温育 16h 以诱导蛋白质表达。

温育后，将培养物以 4,000g 在 4°C 离心 10min，弃上清，收集大肠杆菌细胞。将收集的大肠杆菌细胞重悬于预冷的 15mL pH 7.0 的 50mM PBS

中，得到含有重组酶的大肠杆菌悬浮液，作为全细胞催化剂。

vi) 酶的制备

取 v)制备的 7.5mL 的大肠杆菌悬浮液，在 4°C 超声破碎大肠杆菌细胞。细胞破碎液以 6,000g 在 4°C 离心 15min 去除沉淀，得到的上清为含重组酶

vii) 经纯化的酶催化反应

向 L-高丝氨酸的 PBS (100mM)溶液，中加入甲硫醇钠、PLP，并用磷酸调节溶液 pH 值至 7.5，溶液中 L-高丝氨酸的终浓度为 169.7mM，甲硫醇钠的终浓度为 419.74mM，而 PLP 的终浓度为 0.2mM。向上述溶液加入如

viii) 全细胞催化反应

向 L-高丝氨酸的 PBS (100mM)溶液，中加入甲硫醇钠、PLP、曲拉通 X-100，并用磷酸调节溶液 pH 值至 7.5，溶液中 L-高丝氨酸的终浓度为 169.7mM，甲硫醇钠的终浓度为 419.74mM，PLP 的终浓度为 0.2mM，而曲拉通 X-100 的终浓度为 0.2%。向上述溶液分别加入如 v)中所制备的细胞悬浮液，全细胞的终浓度为 25 OD₆₀₀。在 37°C，于振荡器上持续震荡(220rpm) 12 小时，取样并用 OPA 柱前衍生化高效液相色谱检测 L-甲硫氨酸的生成量，从而确定全细胞的催化活性。

实施例 2、制备和检测来自诺氏梭菌的 MetY (CnMetY)

活化表达 CnMetY (SEQ ID NO: 4)的克隆，根据实施例 1 的方法制备经纯化的酶，并测量经纯化的酶催化产生的 L-甲硫氨酸的量。经检测，CnMetY 纯酶催化产生了 12.13g/L 的 L-甲硫氨酸。

实施例 3、制备和检测含有硫化氢解酶(MetY)和胱硫醚 γ 裂解酶(CGL)的全细胞

活化表达 CnMetY(SEQ ID NO: 4)，CdMetY(SEQ ID NO: 3)，GsMetY(SEQ ID NO: 5)，TmMetY(SEQ ID NO: 6)，PaMetY(SEQ ID NO: 7)，NaCGL(SEQ ID NO: 21)，SpCGL(SEQ ID NO: 20)的大肠杆菌克隆，根据实

施例 1 的方法制备全细胞，并测量全细胞催化产生的 L-甲硫氨酸的量，测得的全细胞催化产生的 L-甲硫氨酸的量如表 2 所示。

表 2

全细胞	SEQ ID NO:	L-甲硫氨酸生成量 (g/L)
CdMetY	3	0.51
CnMetY	4	13.81
GsMetY	5	0.47
TmMetY	6	1.07
PaMetY	7	0.11
NaCGL	21	0.17
SpCGL	20	0.39

5

实施例 4、制备和检测含有表 1 中除硫化氢解酶(MetY)和胱硫醚 γ 裂解酶(CGL)以外酶的全细胞

活化表达表 1 中除硫化氢解酶(MetY)和胱硫醚 γ 裂解酶(CGL)以外酶的大肠杆菌克隆，根据实施例 1 的方法制备全细胞，并测量全细胞催化产生的 L-甲硫氨酸的量，根据 L-甲硫氨酸的生成量来评价酶的催化能力。酶的催化能力如表 3 所示，酶的催化能力以★表示，★越多，表示催化能力越强。

表 3

酶	EC 编号	物种	氨基酸序列	催化能力
半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.47	<i>Thermus thermophilus</i>	SEQ ID NO: 1	★
胱硫醚 γ 合酶	EC 2.5.1.48	球形赖氨酸芽孢杆菌	SEQ ID NO: 2	★★★
β 吡唑酰丙氨酸合酶	EC 2.5.1.51	独岛不动滑菌	SEQ ID NO: 8	★
L-含羞草素合酶	EC 2.5.1.52	银合欢	SEQ ID NO: 9	★★
O-磷酸丝氨酸硫化氢解酶	EC 2.5.1.65	<i>Aeropyrum pernix</i>	SEQ ID NO: 10	★
半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.76	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	SEQ ID NO: 11	★★
[CysO 硫载体蛋白]-硫酯依赖性半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.113	结核分支杆菌	SEQ ID NO: 12	★
胱硫醚 β 合酶	EC 2.5.1.134	枯草芽孢杆菌	SEQ ID NO: 13	★
N-(2-氨基-2-羧基乙基)-L-谷氨酸合酶	EC 2.5.1.140	金黄色葡萄球菌	SEQ ID NO: 14	★
S-硫-L-半胱氨酸合酶	EC 2.5.1.144	荧光假单胞菌	SEQ ID NO: 15	★
二氨基丙氨酸裂解酶	EC 4.3.1.15	大肠杆菌	SEQ ID NO: 16	★★
L-丝氨酸氨裂解酶	EC 4.3.1.17	大肠杆菌	SEQ ID NO: 17	★★
D-丝氨酸氨裂解酶	EC 4.3.1.18	大肠杆菌	SEQ ID NO: 18	★★
苏氨酸氨裂解酶	EC 4.3.1.19	麦芽糖假丝酵母	SEQ ID NO: 19	★
高半胱氨酸脱硫基酶	EC 4.4.1.2	枯草芽孢杆菌	SEQ ID NO: 22	★★★★
L-3-氨基丙氨酸合酶	EC 4.4.1.9	菠菜	SEQ ID NO: 23	★
半胱氨酸裂解酶	EC 4.4.1.10	<i>Cyanobacteria bacterium</i>	SEQ ID NO: 24	★
甲硫氨酸 γ 裂解酶	EC 4.4.1.11	恶臭假单胞菌	SEQ ID NO: 25	★★★★
半胱氨酸 S 缀合物 β 裂解酶	EC 4.4.1.13	乳酸乳球菌	SEQ ID NO: 26	★★★

D-半胱氨酸脱巯基酶	EC 4.4.1.15	大肠杆菌	SEQ ID NO: 27	★
硒代半胱氨酸裂解酶	EC 4.4.1.16	大肠杆菌	SEQ ID NO: 28	★
L-半胱氨酸硫裂解酶	EC 4.4.1.25	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	SEQ ID NO: 29	★
L-半胱氨酸脱硫化物酶	EC 4.4.1.28	<i>Methanococcus maripaludis</i>	SEQ ID NO: 30	★
L-胱氨酸β裂解酶	EC 4.4.1.35	亚麻荠	SEQ ID NO: 31	★

序列

SEQ ID NO: 1

MRVEGAIGKTPVVRLAKVVEPDMAEVWVKLEGLNPGGSIKDRPAWYMIKDAEE
5 RGILRPGSGQVIVEPTSGNTGIGLAMIAASRGYRLITMPAQMSEERKRVLKAFGA
ELVLTDPERRMLAAREEALRLKEELGAFMPDQFKNPANVRAHYETTGPELYEALE
GRIDAFVYGSSTGGTITGVGRYLKERIPHVKVIAVEPARSNVLSGGKMGQHGFGQ
MGPGFIPENLDLSLLDGVIVQVWEEDAFPLARRLAREEGLFLGMSSGGIVWAALQV
ARELGPGKRVACISPDGGWKYLSTPLYAEP

10

SEQ ID NO: 2

MTLNRSIETKLVQLGNLSDPTTGAVSPPIHLSTAYKHAGIGESTGFDYTRTKNPTRA
LLEAGFADLEGGDMGFACSSGMAAIQLVLSIFKPGDELVVPDDLYGGTYRLFNFFQ
ETYNKPVYYSKFESVEQVEALINEHTRALFIETPTNPLMQEFDLQVYAELAHKHGA
15 LLIVDNTFYTPYFQRPIDLGADIVLHSATKYIGGHNDVLAGIVVAKGTELAERIGFI
HNGSGMVLGAMDSWLLIRGLKTMHLRLKQHDANAKAIAAYLEEEALVTDVLYT
GKGGMLSFRLLQKPEWIDPFLRNKLITFAESLGGVESFITYPATQTHADMPYEERV
ERGVCDRLRLFSVGIEEAEDLIADLRQVFDILRKEA

20 SEQ ID NO: 3

MDNKETICVQGNYPKPGNGEPRVLPLYQSTTFKYSSIDQLAELFDLKVDGHIYSRIS
NPTIQAFEEKISLLEGGVSSVAVSSGQSANMLAVLNICKSGDSILCSSKVYGGTFNL
LGPSLKKFGIDLISFDLDSSEDEIVELAKENTKVVF AETLANPTLEVIDFEKIANVAK
RINVPFIVDNSLASPVLCNPLKYGANIVTHSTTKYLDGHASSVGGIIVDGGNFNWD
25 NGKFPELVEPDPTYHGISTYQKFGNAAYATKARVQLLRDYGNCSPFNAYLTNLC
VETLHLRMRHSENALKIARFLEKHENVDWINYPGLEDNKYENAKKYLSRGC
GVLSTGVRGGLLENAKKFVEKLQIASLVTHVSDVVRTCVIHPASTTHRQLTEEQIAS
GVLPSLIRLSVGIENVEDLIADLNQALNF

30 SEQ ID NO: 4

MNNWKKGTICIQGGYTPKSGEPRVLPIYQSTTYKYNDPDEVAALFDLKAEGHMY
SRISNPTVA AFEEKIAALEGGVGALAVASGQSASTLSILNVCKSGEHVVAASTLYGG
TYSLFSTTLKKFGIDVTFVDPEATEEEILKNCRENTKAVFGETIGNPGLNVLDFEKF
SNVAKKIKAPFIVDNTIATPYLCNPLKLGANVVVHSATKYIDGHATTVGGVIIDGG
35 NFDWNNGRFPDFTEPDPSYHGKYTETFGDSAYIVKARVQLLRDLGVCTSPFNAFL
FSLGLETLHLRMRHSDNAIKLGRFLEKHSKVSWSYPLLESHSTYETAKKYLK
GASGILTFGVKGGVEAGKQFIRNLKLAALVVHLGDARTSVLHPASTTHRQLTEEQ
LSAGVTPDLIRVSVGIEDIEDIEDFDQALNNIK

40 SEQ ID NO: 5

MSNEQTFRPETLAIHAGQKPD AETGARAVPIYQTSSYVFRDSEHAANLFG LKEEGF
IYTRIMNPTNDVFEKRIA ALEGGIGALALSSGQA AVFYSIINIASAGDEIVSSSIYGG
TYNLF AHTLRKFGITVKFVDPSPDENFERAITDKTKALFAETIGNPKNDVLDIEAVA
DIAHRHA IPLIVDNTVASPYLLRPIEFGADIVVHSATKFIGGHGNSIGGVIVDSGKFD
45 WKGSGKFPEFTEPDPSYHGLVYVDVGEAA YITKARIQLLRDLGAALSPFNAFLLL
QGLET LHLRMQRHSENALAVAKFLEEEEA VESVNYPGLPSHPSHELAKKYL PNGQ
GAIVT FEIKGGVEAGKKLIDSVKLF SHLANIGDSKSLIHPASTTHEQLSPDEQLSAG
VTPGLVRLSVGTEAIDDLRQAIRQSQT VGVK

50 SEQ ID NO: 6

MDWKKYGYNTRALHAGYEPPEQATGSRAVPIYQTTSYVFRDSDHAARLFALEEP
GFIYTRIGNPTVSVLEERIAALEEGVGALAVASGQA AITYAILNIA GPGDEIVSGSAL
YGGTYNLF RHTLYKKSGIIVKFVDETD PKNIEEAITEKTKAVYLETIGNPGLTVPDF
EAI AEIAHRHGVPLIVDNTVAPYIFRPFEHGADIVVYSATKFIGGHGTSIGGLIVDSG
55 KFDWTNGKFPELVEPDPSYHGVS YVETFK EAAYIAKCR TQLLRDLGSCMSPFNAF
LFILGLETLSLRMKKHCENALKIVEFLKSHPAVSWVNYPIAEGNK TRENALKYLKE
GYGAIVTFGVKGGKEAGKKFIDSLT LSHLANIGDARTLAIHPASTTHQQLTEEEQL
KTGVTPDMIRLSVGIEDVEDIADLDQALRKSQEG

60 SEQ ID NO: 7

MKLETLAVHAGYSPDPTTRAVAVPIYQTTSYAFDDTQHGADLFDLKVPGNIYTRIM
NPTNDVLEQRVAALEGGVGALAVASGMAAITYAIQTVAEAGDNIVSVAKLYGGTY
NLLAHTLPRIGIQARFAAHDDVAALEALIDERTKAVFCETIGNPAGNIIDLQALADA
AHRHGVPLIVDNTVATPVLCPFEHGADIVVHSLTKYMGHGTSGIGIVVDSGKFD
5 WAANKSRFPLLNTDPDSYHGVTYTEAFGPAAFIGRCRVVPLRNMGAALSPFNAFLI
LQGLETALRMRHCDNALAVARYLQQHPQVAWVKYAGLADNPEHALARRYLG
GRPAAILSFGIQGSAAGARFIDALKLVVRLVNIIGDAKSLACHPASTTHRQLNAEE
LARAGVSDDMVRLSIGIEHIDDILADLDQALAAAAR

10 SEQ ID NO: 8
MSNNIKAYNNVLELIGETPLIKLSQTVASFPGNYYAKAEAFNPGHSSKDRIALHIE
QAEKKGILKPGDTIETTSGNTGFSIAMVSRIGYDCILAVSSKSSADKIDMLKSMG
AKVYVCPANVSADDPSSYYQVAKRLHDEIKNSIYNQYFNDLNTAEHYLTGTPEI
WNQTAGEITHLVACSGTGGTISGTARFLKEQNPNIKILGVDAYGSVLKKYHETQEF
15 DKDEIYPYRIEGLGKNLIPTATDFDVIDSFTKVKDEDAAHMARKISQTEGLFVGYT
SGAAMQAVKQLVVEGEFDKNSNVVVFDPDHGSRYSKIYNDQWMQEQGFVDSK
STANEQHIEYIK

SEQ ID NO: 9
20 MAVEWGTIANDVTELVGKTPLVYLNKVVDGCVGRIVAKLEFMEPLSSVKDRIGYS
MIADAEKGLITPGKSVLIEPTSGNTGIGLAFTAAAKGYRLIIVMPASMTLERRMVL
KALGAELVLTDPKEGIRGAFQKVEEIYAKTPNSYVLQQFENPSNPKMHYDTTGPEI
WKATGGKIDALVAGIGTGGTITGSGKFLKEQNPNIKVCAVEPAESPVLVGGQPGSH
GIYGIGAGFIPKVVDVSLLEVVHVTTSEAIETAKLLAVKEGLFVGVSSGAAAAAA
25 IKVAKRPEMAGKLIVTIFPSCGERYLSSALFESIREENSENMTFEP

SEQ ID NO: 10
MVFPSPLDFFER GKPTPLVRSRLQLPNGVRVWLKLEWYNPFSLSVKDRPAVEIISRL
SRRVEKGSVLADATSSNFGVALSAVARLYGYRARVYLPGAAEEFGKLLPRLGAQV
30 IVDPEAPSTVHLLPRVMKDSKNEGFVHVNQFYNDANFEAHMRGTAREIFVQSRRG
GLALRGVAGSLGTSGHMSAAAFYLQSVDPISRAVLVQPAQGDSIPGIRRVETGML
WINMLDISYTLAEVTLEEAMEAVVEVARSDGLVIGPSGGAAVKALAKKAAEGDLE
PGDYVVVVV PDTGFKYLSLVQNALEGAGDSV

35 SEQ ID NO: 11
MGRFILKCLKCGREYSQEYRLTCENDDSFLRAEYLEKKLELRKQPGIGRFHWSLP
VQEELTTEAGPITYKSEALARELGLSNLYIGFSGYWPEKGAFIKTCSFKELEAHPTM
QLLKESGGKAIVLASAGNTGRAFAHVSALTGTDVYIVVPDSGIPKLWLPEEPTDSI
HLISMTPGNDYTDAINLAGRIAKLPGMVPEGGARNVARREGMGTVMLDAAVTIG
40 KMPDHYFQAVGSGTGGISAWESLRLREDGRFGSKLPKLQTLQNLFPVPMYNAW
QEGRRDIPEIDMKDAKKRIEETATVLTNRAPPYSVTGGLYDALVDTDGIMYAVS
KEEALDAKALFESLEGIDILPPSAVAAAALLKAVEAGNVGKDDTILLNIAGGGFKRL
KEDFTLFQIEPEITVSNPDVPLEELKL

45 SEQ ID NO: 12
MTRYDSLLQALGNTPLVGLQRLSPRWDDGRDGPVRLWAKLEDNRNPTGSIKDRPA
VRMIEQAEADGLLRPGATILEPTSGNTGISLAMAARLKGYRLICVMPENTSVERRQ
LLELYGAQIIFSAAEAGGSNTAVATAKELAATNPSWVMYLYQYGNPANTDSHYCGTGP
ELLADLPEITHFVAGLGTGTLMGTGRFLREHVANVKIVAAEPYEGGVYALRNM
50 DEGFVPELYDPEILTARYSVGAVDAVRRTRELVTGIFAGISTGAVLHAALGVGAG
ALAAGERADIALVADAGWKYLSSTGAYAGSLDDAETALEGQLWA

SEQ ID NO: 13
MTVITDITELIGNTPLLRLKNFDVPEGVAVYAKLEMMNPGGSIKDRLGDMILIRDAL
55 DSGKVKPGGVIIATAGNTGIGLALSARKYGLKAIFCVPEHFSREKQQIMQALGASI
IHTPRQDGMQGAIQKAIQLETEIENSYCVLQFKNRVNPSTYYKTLGPEMWEALDG
NIHTFVAGAGSGGTAGTASFLKEKNPAVKTVIVEPVGSILNGGEPHAHKTEGIGM
EFIPDYMDKSHFDEIYTVTDENAFRLVKEAAEKEGLLIGSSSGAALYAALEEAKKA
SAGTNIVTVFPDSSDRYISKQIYEGGI

60

SEQ ID NO: 14

MVQLHQLFPKHEVFACLEYMNPGGSMKDRPAKYIIIEHGIKHGLITENTHLESTSG
NLGIALAMIAKIKGLKLTCCVDPKISPTNLKIIKSYGANVEMVEEPDAHGGYLMTR
IAKVQELLATIDDAYWINQYANELNWQSHYHGAGTEIVETIKQPIDYFVAPVSTTG
5 SIMGMSRKIKEVHPNAQIVAVDAKGSVIFGDKPINRELPGIGASRVPEILNRSEINQV
IHVDDYQSALGCRKLIDYEGIFAGGSTGSIIAAIEQLITSIEEGATIVTILPDRGDRL
DLVYSDTWLEKMKSRQGVKSE

SEQ ID NO: 15

10 MTLQYPTIADCVGNTPLVRLQRMAGNTSNTLLLKLEGNPNAGSVKDRPALSMITR
AELRGQIKPGDTLIEATSGNTGIALAMAAAIKGYKMILIMPDNGSAERKAAMTAY
GAELLVTPPEEGMEGARDLAERMAAEGRGVLDQFANGDNPEAHYTSTGPEIWR
QTQGTITHFVSSMGTGTIMGNSRYLKEQNPAIQIVGLQPMEGAAIPGIRRPQY
LPKIYNAAARVDRIIDMAQREAEOTTRRLAREEGIFCGVSSGGAVAGMLRLSAELEN
15 AVIVAIICDRGDRLSTGIFDAPN

SEQ ID NO: 16

MSVFSKIDIDANKFFNGETSPLFSQSQAQKLARQFHQKIAGYRPTPLCALDDLNL
FGVKKILVKDESKRFLNAFKMLGGAYIAQLLCEKYHLDIETLSFEHLKNAIGEK
20 MTFATTTDGNHGRGVAWAAQQLGQNAVIMPKGSAQERVDAILNLGAECIVTDM
NYDDTVRLTMQHAQQHGWVVDQTAWEQYTKIPTWIMQGYATLADEAVEQMR
MGVTPTHVLLQAGVGAMAGGVLGYLVDVYSPQNLHSIIVEPDKADCIYRSGVK
DIVNVGGDMATIMAGLACGEPNPLGWEILRNCAQFISQDSVAALGMRVLGNPY
GNDPRIISGESGAVGLGVLAHVHYHPQRQSLMEKLALNKDAVVLVISTEGDTPVK
25 HYREVWVWEGKHAVAP

SEQ ID NO: 17

MISAFDIFKIGIPSSSHTVGPMNAGKSFIDRLESSGLLTATSHIVVDLYGSLSLTGK
GHATDVAIIMGLAGNSPQDVVIDEIPAFIELVTRSGRLPVASGAHIVDFPVAKNIIFHP
30 EMLPRHENGMRTAWKGQEELLSKTYYSVGGGFIVEEEHFGLSHDVETSVPYDFH
SAGELLMCDYNGLSISGLMMHNLALRSKAEIDAGFARIWQVMHDGIERGMNT
EGVLPGLNVPRAVALRRQLVSSDNISNDPMNVIDWINMYALAVSEENAAGGRV
VTAPTNGACGIIPAVLAYYDKFRFPVNERSIARYFLAAGAIGALYKMNASISGAEV
GCQGEIGVACSMAAAGLTELGLGGSPAQVCNAAEIAMENLGLTCDPVAGQVQIPC
35 IERNAINAVKAVNAARMAMRRTSAPRVSLDKVIETMYETGKDMNDKYRETSRGG
LAIKVVCG

SEQ ID NO: 18

MENAKMNSLIAQYPLVKDLVALKETTFWNPGTSLAEGLPYVGLTEQDVQDAHA
RLSRFAPYLAKAFPETAATGGHIESELVAIPAMQKRLEKEYQQPISGQLLLKKDHL
40 ISGSIKARGGIYEVLAHAEKLALEAGLLTDDDDYSKLLSPEFKQFFSQYSIAVGSTG
NLGLSIGIMSARIGFKVTVHMSADARAWKKAKLRSHGVTVVEYEQDYGVAVEEG
RKAQAQSDPNCFFIDDENSRFLGLGYSVAGQRLKAQFAQQGRIVDADNPLFVYLPC
GVGGGPGGVAFLKLAFGDHVHCFFAEPHSPCMLLGVHTGLHDQISVQDIGIDN
45 LTAADGLAVGRASGFVGRAMERLLDGFYTLSDQTMVDMLGWLAQEEGIRLEPSA
LAGMAGPQRCASVSQQMHGFSAEQLRNTTHLVWATGGGMVPEEEMNQYLA
KGR

SEQ ID NO: 19

MSIVRLYTARQLPRYRPLRFVRFNSTQVLSPKQRWTELKDTDFIKDSNGEEQPDYV
KLILTSRVYDVDDAGSPLTYAINLSHRCGTNVYLKREDLLPVFSFKLRGAYNMIA
HLHSNSPTVPVGVIAACSAGNHAQGVAFSANKLNIPATIVMPTPTPSIKYTNVSRG
QVVLYGDDFDSAKQECARLSAEQNLIDIPPFNHPYVIAGQGTVALEITRQLRLDKL
DAIFVPVGGGGLIAGIAYLKKIAPHVKIIGVETYDADAMYQSLKNHKSTVLDKV
55 GLFADGTAVKVLGDETWRLLAKDLVDEVVLVTTDELCAAIKIDIFEDTRSITESGAL
SVAGLKRYIEDHSEIDHKGKTYVPVLSGANMNFDRLRVSEAVLGEGREVSLAV
TIPEQPGEFAKLQKLINPRAITEFSYRTSGEPTANIFVSFNVIDKKKEKALVINAMTE
AGYKVVDISENELAKSHGRYLVGGKSSIMVMILVKSCVDSISQKDSKKNSNS

60 SEQ ID NO: 20

MTDSVTGAGDGTRAVRAGLPEPVKHEPTLPGPVFAAHFHLPGDPTGPYTYGRDE
NPTWTHLERAIGELEAPGRDDVETLVFASGMAAISAVLFSQLSAGDTVVLPDDGY
QVLPLVRAQLEAYGVEVRTAPTGGDAQLDVLDGAKLLWIETPSNPGLDVCDVRR
VEAAHARGCLVAVDNTLATPLGQRPLELGADFSVASGTKQLTGHGDILLGYVTGG
5 DAAAMASVRRWRKIVGAIPGPMEAWLAHRSIATLQLRVDRQNANALVIAEALRD
RHEDLGVRYPGPLPGDPSHKIASQQMRRFGCVVSFTLPTRARADRFDAALRLVDDA
TSFGGVRSTAERRGRWGGDAVPEGFIRFSAGAEDPQDLVADVLRALNESSQPTPSE

SEQ ID NO: 21

10 MTASSDHPITTPPRAPSPVHGFGLAVHAGSPHDPATGAVIEAISLSTTFAQTAVGKP
VGEFEYSRSSNPNNRANFEKMVAALEHAKYALAYSSGSATTANILQSLAAGSHVISV
SDVYGGTHRYFTQVAKAHGVKVTFTPEIEVDIRDHITDATKLVWIETPSNPTLRLV
DIRAVATAAHERGILVVVDNTFLSPYVQNPLDHGADIVVHSVTKYINGHSDVVMG
VAAFNSDELYARLSFLQNAIGAVPSAFDSWLAHRGAKTLHLRAREATTNATAIAHA
15 LEASPLVISVNYPGLESHPHRAIALKQHRNGMGGGMLSFRIHGGHAAAEKFCQYT
KIFTLAESLGGVESLCEIPSSMTHAGIPKAQREAVGIFDDLVRISCGVEDAEDLKAD
VLQALERAVADAANGVSNGVNGTH

SEQ ID NO: 22

20 MKKKTLMIHGGITGDEKTGAVSVPIYQVSTYKQPKAGQHTGYEYSRTANPTRTAL
EALVTELESSEAGYAFSSGMAAITAVMMLFNSGDHVVLTDDVYGGTYRVMTKVL
NRLGIESTFVDTSSREEVEKAIRPNTKAIYIETPTNPLLKITDLTMLADIKKAGVLL
IVDNTFNTPYFQOPLTLGADIVLHSATKYLGGHSDVVGGLVVTASKELGEELHFVQ
NSTGGVLGPQDSWLLMRGIKTGLRMEIDQNARKIASFLENHPAVQTLYYPGSS
25 NHPGHELAKTQGAGFGGMISFDIGSEERVDAFLGNLKLFTIAESLGAVESLISV
MTHASIPRERRLELGITDGLIRISVGIEDAEDLLEDIGQALENI

SEQ ID NO: 23

30 MATVSSCLLRRSRTASRIFKTSLRCFSTTSSSAQTVSGSSPFPFTGTNIKTNVSQLIGR
TPLVYLSKISEGSGAYIAVKQEMMQPTASVKDRPALAMIEDAEKKGLISPCKTVLIE
PTSGNMGISMAFMAAMKGYKMVLTPSYTSMERRVVMRAFGADLITDPDKGM
GGTVKKANQLLDSTPDGFMLQQFNNPANTQVHFETTGPFIWEDTQGKVDFVMG
IGSGGTVSGVGRYLSQNPVNIYGVPAESNINLGGKPGPHLITGNGVGFKPEIL
DMDVMDAVLEVKSDDAVKMARQLALQEGLLVGISSGANTIAALDLAKRPENKG
35 KLIVTIHPSFGERYLSSALFKELREEAENMQPVPVE

SEQ ID NO: 24

MSGIYPAPVRLESHRQQFPALANKAYFNYGGQGTLPQASLEAIQQAYEYIQRHGPF
SAGVNAWIIIEANKTREAIASELGAPPEAIAITEDVTVCNIAWGINWQAGDHL
40 LLTDCEHPSVIATAQEIARRFDVEVSTCPILSTLNQGDPTAVIAQHLRTQTRLVLSH
ILWNTGQVLVPKEIVEVCRNYSSTQIRVLVDAAQSVGCLPLNLTELGAIFYAFT
GHKWWCPEGIGGLYVRPDAWESLNPTFIGWRGIVSNQAGKPTGWKPNAQRFEV
ATSAYPLYAGVRSIAATHQQWGTTPQERYQQICQISEYLWQRLSQLDFVKCLRTSPP
QAGLVSFVLTNEHSHQQLVKSLEQQNLMLRTILDPNCVRACVHYFTQHAEDKLIE
45 AMKKIKSKG

SEQ ID NO: 25

MRDSSHNTGFSTRAIHHGYDPLSHGGALVPPVYQTATYAFPTVEYGAACFAGEEP
GHFYSRISNPTLALLEQRMASLEGGEAGLALASGMGAITSTLWTLLRPGDELIVGR
50 TLYGCTFAFLHHGIGEGFVKVRHVDLNDKALKAAISSKTRMIYFETPANPNMQL
VDIAAVVEAVRGHDVHVVDNTYCTPYLQRPLELGADLVVHSATKYLSGHGDIT
AGLVVGRKVLVDRIIRLEGLKDMTGAVLSPHDAALLMRGIKTALRMDRHCANA
QQVAEFLVRQPQVELIHYPGLPSFAQYALAQRMRLPGGMIAFELKGGIEAGRFR
MNALQLFARAVSLGDAESLAQHPASMTSSYTPQERAHHGISEGLVRLSVGLEDV
55 EDLLADVEQALQACC

SEQ ID NO: 26

MTSLKTKVIHGGISTDRTTGAVSVPIYQTSTYKQNLGKPKKEYEYSRSGNPTRHAL
EELIADLEGGVQGFASFSSGLAGIHAVLSLFSAGDHIIILADDVYGGTFRMLMDKVLTK
60 TGIIYDLVDLSNLEDLKAAAFKAETKAVYFETPSNPLLKVLDIKEISSIAKAHNALTLV

DNTFATPYLQQPIALGADIVLHSATKYLGGHSDVVAGLVTTSNELASEIGFLQNSI
GAVLGPQDSWLVRGIKTLALRMEAHSANAQKIAEFLEASQAVSKVYYPGLNVH
EGHEIAKKQMTAFGGMISFELTDENAVKNFVENLRYFTLAESLGGVESLIEVPAVM
THASIPKELREEIGIKDGLIRLSVGVEALEDLLTDLKEALEKE

5

SEQ ID NO: 27

MPLHNLTRFRLEFIGAPTPLEYLPRFSDYLGREIFIKRDDVTPMAMGGNKLRLKLE
FLAADALREGADTLITAGAIQSNHVRQTAAVAAKLGLHCVALLENPIGTTAENYLT
NGNRLLLDLFNTQIEMCDALDPNAQLEELATRVEAQGFRPYVIPVGGSNALGAL
GYVESALEIAQQCEGAVNISSVVVASGSAGTHAGLAVGLEHLMPESELIGVTVSRS
VADQLPKVVNLQQAIKAELELTASAEILLWDDYFAPGYGVPNDEGMEAVKLLARL
EGILLDPVYTGKAMAGLIDGISQKRFKDEGPILFIHTGGAPALFAYHPHV

10

SEQ ID NO: 28

MIFSVDKVRADFPVLSREVNGLPLAYLDSAASAQKPSQVIDAEAEFYRHGYAAVH
RGIHTLSAQATEKMENVRKRASLFINARSAEELVFVRGTTEGINLVANSWGN SNVR
AGDNIIISQMEHHANIVPWQMLCARVGAELRVIPLNPDGTLQLETLPFLFDEKTRL
LAITHVSNVLGTENPLAEMITLAHQHGAKVLVDGAQAVMHHHPVDVQALDCDFY
VFSGHKLYGPTGIGILYVKEALLQEMPPWEGGGSMIATVSLSEGTTWTAPWRFE
AGTPNTGGIIGLGALEYVSALGLNNAIEYEQNLMHYALSQLESVPDLTLYGPQNR
LGVIAFNLGKHHAYDVGSFLDNYGIAVRTGHHCAMPLMAYYNVPAMCRASLAM
YNTHEEVDRLVTGLQRIHRLG

20

SEQ ID NO: 29

MHLARYPRRFAIHLPTPLERLDRLTAELGGPEIWIKRDDCTGLSTGGNKTRKLEFL
MAEAEALQGADMVMTQGATQSNHARQTAFAAKLGMDCHILLEDRTGSNNANY
NNNGNVLLDHLHGATTEKRPGSGLDMNAEMEKVAEKFRADGRKVYTIPTGGGSGNP
TGALGYVNCAFEMLNQFNERGLKVDHIVHATGSAGTQAGLITGLQAMNAQIPLL
GIGVRAPKPKQEENVYNLACATAEKLGCPCGVVAREDVVANTDYVGEYGIPTESG
LEAIRMFAELEAILLDPVYSAKGAAGFIDLIRKGFHKKGERVVFLHTGGAVALFGY
DNAFDYSGRWVA

30

SEQ ID NO: 30

MDDYKRILITKILKNEVTEALGCTEVGLIGYAVSLCNISDPFSIEKIELTLNNGSFKN
AYAVGVPNTKKYGILPAVVGGLGDHKNKLLVFNGIKYSQKLEDFIKERLKRIVINS
PLYCGVKIKDNSGNTFESLIKDNHLNVVIPKINNKLISEINGSEKEEYKNLELLDFLE
YIDEIPEEIIQLVEKTIYTNNNLIKGDFLNFNDCLSNMVNKTTSACNTRMIGENMP
AMSVAKSGNMGIMATLPIIAYDYSNEQNQEKLKILLSVLVTIYATYKSSYLSSMC
GCVSKGGMGAVIGLCYYKNGKNIKKLDSAARTFTANLPGIICDGGKVGCAKLKAS
GCFAAYSSLFVDISYENGIVGKNFKECVENISEISKIMGDLSDDIVKIMSKKEI

40

SEQ ID NO: 31

MANDRSVDWKFSGSEAAKEASAASLGTYSSKLFALCDPLGKPILPPRSKSAETSHT
AEKAVVEAVLCGTGNAYAPSLGLPVARSAVAEYLNRLPKKLTADDVFMVVGK
QAIELTVDILAKPKANVLLPKPGFPWDVVRTIYKNLEVRKYDFIPEQNYEIDFDSV
RALVDENTFAIFIINPHNPNGNTYSEVHLKKLAELARELRIMVVSDEVFRWTVFGS
NPFVPMGKFSSIVPVVTLGSISKGWIVPGWRTGWVALHDLDGVFKCTKVLTAAKQ
FLVINSKPPTVIQAALPTILENTPEEFFHQRQKFLKEKADFAYSKLKEIPTLTCLYKLP
EACTFLWTELNLSRFADIKDDEEFCEKLATEENLVLLPGIAFGLKNWARHSIDMEIS
TLEDALGRLKSFCERHSIIIEVPLKDVNGVK

50

55

权 利 要 求 书

1、一种制备 L-甲硫氨酸的方法，包括以下步骤：

a) 提供反应介质，其包含 L-高丝氨酸或其盐、酯或酰胺，甲硫基供体和酶，所述酶选自转移除甲基外的烷基或芳香基的转移酶、氨裂解酶和催化碳-硫键断裂的裂解酶；

b) 温育所述反应介质以产生包含 L-甲硫氨酸或其盐、酯或酰胺的反应产物；和任选存在的

c) 从所述反应产物回收 L-甲硫氨酸或其盐、酯或酰胺。

2、权利要求 1 的方法，其中所述酶选自 EC 编号为 EC 2.5.1.-、EC 4.3.1.-和 EC 4.4.1.-的酶。

3、权利要求 1 或 2 的方法，其中所述反应介质还包含磷酸吡哆醛或其盐。

4、权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述酶选自 EC 编号为 EC 2.5.1.47、EC 2.5.1.48、EC 2.5.1.49、EC 2.5.1.51、EC 2.5.1.52、EC 2.5.1.65、EC 2.5.1.76、EC 2.5.1.113、EC 2.5.1.134、EC 2.5.1.140、EC 2.5.1.144、EC 4.3.1.15、EC 4.3.1.17、EC 4.3.1.18、EC 4.3.1.19、EC 4.4.1.1、EC 4.4.1.2、EC 4.4.1.9、EC 4.4.1.10、EC 4.4.1.11、EC 4.4.1.13、EC 4.4.1.15、EC 4.4.1.16、EC 4.4.1.25、EC 4.4.1.28 和 EC 4.4.1.35 的酶。

5、权利要求 1-4 任一项的方法，其中所述酶来源于选自 *Thermus thermophilus*、球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)、艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)、诺氏梭菌(*Clostridium novyi*)、嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)、海栖热胞菌(*Thermotoga maritima*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、独岛不动滑菌(*Nonlabens dokdonensis*)、银合欢(*Leucaena leucocephala*)、*Aeropyrum pernix*、*Methanosarcina acetivorans*、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、荧光假单胞菌

(*Pseudomonas fluorescens*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)、暗产色链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、*Cyanobacteria bacterium*、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、*Ruegeria pomeroyi*、*Methanococcus maripaludis* 和亚麻荠(*Camelina sativa*)的生物体。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述酶选自来源于 *Thermus thermophilus* 的半胱氨酸合酶、来源于球形赖氨酸芽孢杆菌的胱硫醚 γ 合酶、来源于艰难梭菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于诺氏梭菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于海栖热胞菌的 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于绿脓假单胞菌 O-乙酰高丝氨酸氨基羧基丙基转移酶、来源于独岛不动滑菌的 β 吡唑酰丙氨酸合酶、来源于银合欢的 L-含羞草素合酶、来源于 *Aeropyrum pernix* 的 O-磷酸丝氨酸硫化氢解酶、来源于 *Methanosarcina acetivorans* 的半胱氨酸合酶、来源于结核分支杆菌的 [CysO 硫载体蛋白]-硫酯依赖性半胱氨酸合酶、来源于枯草芽孢杆菌的胱硫醚 β 合酶、来源于金黄色葡萄球菌的 N-(2-氨基-2-羧基乙基)-L-谷氨酸合酶、来源于荧光假单胞菌的 S-硫-L-半胱氨酸合酶、来源于大肠杆菌的二氨基丙氨酸裂解酶、来源于大肠杆菌的 L-丝氨酸氨裂解酶、来源于大肠杆菌的 D-丝氨酸氨裂解酶、来源于麦芽糖假丝酵母的苏氨酸氨裂解酶、来源于暗产色链霉菌的胱硫醚 γ 裂解酶、来源于粗糙脉孢菌的胱硫醚 γ 裂解酶、来源于枯草芽孢杆菌的高半胱氨酸脱巯基酶、来源于菠菜的 L-3-氰基丙氨酸合酶、来源于 *Cyanobacteria bacterium* 的半胱氨酸裂解酶、来源于恶臭假单胞菌的甲硫氨酸 γ 裂解酶、来源于乳酸乳球菌的半胱氨酸 S 缀合物 β 裂解酶、来源于大肠杆菌的 D-半胱氨酸脱巯基酶、来源于大肠杆菌的硒代半胱氨酸裂解酶、来源于 *Ruegeria pomeroyi* 的 L-半胱氨酸硫裂解酶、来源于 *Methanococcus maripaludis* 的 L-半胱氨酸脱硫化物酶和来源于亚麻荠的 L-胱氨酸 β 裂解酶。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法，其中所述酶包含选自 SEQ ID NO: 1-31

的氨基酸序列。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中所述方法是无细胞方法。

9. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中步骤 a)中的所述反应介质包含表达所述酶的宿主细胞。

10. 权利要求 9 的方法，其还包括培养所述宿主细胞的步骤。

11. 权利要求 1-10 任一项的方法，其中在步骤 b)中，在 30-40°C、32-39°C、34-38°C、36-38°C 或 37°C 温育所述反应介质。