

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年2月15日 (15.02.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/032012 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/88 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/087182

(22) 国际申请日: 2023年4月8日 (08.04.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210955082.X 2022年8月10日 (10.08.2022) CN
202211738582.4 2022年12月31日 (31.12.2022) CN
202310055051.3 2023年2月3日 (03.02.2023) CN

(71) 申请人: 百葵锐 (深圳) 生物科技有限公司
(**BIOCREATECH (SHENZHEN) BIOTECHNOLOGY CO., LTD**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市光明区凤凰街道恒泰裕大厦1栋2102, Guangdong 518132 (CN)。

(72) 发明人: 柴成程 (**CHAI, Chengcheng**); 中国广东省深圳市光明区凤凰街道恒泰裕大厦1栋2102,

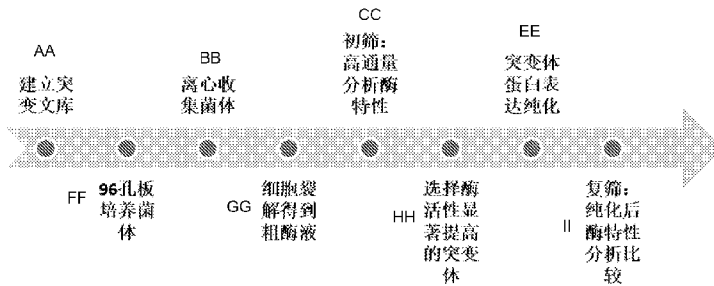
Guangdong 518132 (CN)。王晶 (**WANG, Jing**); 中国广东省深圳市光明区凤凰街道恒泰裕大厦1栋2102, Guangdong 518132 (CN)。李华珍 (**LI, Huazhen**); 中国广东省深圳市光明区凤凰街道恒泰裕大厦1栋2102, Guangdong 518132 (CN)。章家泉 (**ZHANG, Jiaquan**); 中国广东省深圳市光明区凤凰街道恒泰裕大厦1栋2102, Guangdong 518132 (CN)。

(74) 代理人: 北京知文通达知识产权代理事务所 (普通合伙) (**BEIJING ZHIWENTONGDA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY**); 中国北京市昌平区科星西路106号院6号楼8层804, Beijing 102208 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: PHENYLALANINE AMMONIA LYASE MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 苯丙氨酸解氨酶突变体及其应用



AA Establishment of a mutation library
BB Collection of cells by centrifugation
CC Preliminary screening: high-throughput analysis of enzyme characteristics
EE Expression and purification of mutant protein
FF Cell culture on a 96-well plate
GG Cell lysis to give crude enzyme solution
HH Screening for mutants with significantly improved enzyme activity
II Secondary screening: comparative analysis of characteristics of purified enzymes

图1

(57) Abstract: Provided are a phenylalanine ammonia lyase mutant, an encoding gene thereof, a genetically engineered microorganism, and a method for preparing the phenylalanine ammonia lyase mutant. Also provided is use of the phenylalanine ammonia lyase mutant in catalyzing the degradation of L-phenylalanine and preparing an oral medicament for treating phenylketonuria.

(57) 摘要: 提供了一种苯丙氨酸解氨酶突变体、其编码基因、基因工程菌以及该苯丙氨酸解氨酶突变体的制备方法。还提供了该苯丙氨酸解氨酶突变体在催化降解L-苯丙氨酸和制备治疗苯丙酮尿症疾病的口服药物中的应用。

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

苯丙氨酸解氨酶突变体及其应用

技术领域

本发明属于蛋白质工程领域和生物技术领域，具体涉及粘红酵母来源的苯丙氨酸解氨酶突变体及其应用。

背景技术

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanineammonialyase, PAL) 属芳香族氨基酸裂解酶家族 (EC 4.3.1.23-1.25 和 4.3.1.3)。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是近年来研究发现的一种具有生物医学应用的治疗酶，它是一种非水解酶能够催化 L-苯丙氨酸通过非氧化脱氨生成反式肉桂酸和氨。PAL 是一种非哺乳动物酶，广泛存在于高等植物中，在一些藻类、蕨类和细菌等微生物中也被发现，但在动物和人体中不存在。此外，许多上述来源的苯丙氨酸解氨酶已经在大肠杆菌中获得了重组表达和性质研究 (Moffitt 等, *Biochemistry* 46: 1004-1012[2007]; Sarkissian 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2339-2344 [1999]; Williams 等, *Microbiology* 151: 2543-2550 [2005]和 Xiang 等, 277: 32505-32509 [2002])。

PAL 酶可用作治疗人体代谢紊乱病——苯丙酮尿症(PKU)的蛋白质。PKU 是一种罕见的常染色体隐性遗传性疾病，由编码苯丙氨酸羟化酶(PAH)或参与辅因子四氢生物喋呤合成或循环的酶的基因突变而导致酶的部分功能缺失或全部功能丧失而引起。PAH 酶负责调节血浆中 L-苯丙氨酸的水平。缺乏 PAH 导致苯丙氨酸含量在人体内堆积和增加，苯丙氨酸转化为苯丙酮酸和其他衍生物。根据突变类型不同，PKU 患者血液中的苯丙氨酸含量通常>360 μM 。PKU 患者如果不及早治疗，高水平的苯丙氨酸及其一些分解产物可能会导致重大的医疗问题，影响人的认知功能，导致震颤、癫痫、自闭症和慢性精神畸形等疾病。由于 PAH 具有不稳定性，在体外难以获得。因此，PAL 为 PKU 患者提供了另一种选择，PAL 将有毒的苯丙氨酸转化为无毒的、可排泄的代谢化合物，即反式肉桂酸和氨。

许多研究都集中在 PAL 在酶替代治疗 PKU 中的应用 (Ambrus 等, *Science* 201: 837-839 [1978]; Hendrikse 等, *ScientificReports*10: 1315-1337 [2020]; Kim 等, *Molecular Therapy* 10: 220-224 [2004]和 Sarkissian 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2339-2344 [1999])。目前，PAL 用于治疗 PKU 疾病的注射药剂已被批准生产，以及 PAL 口服药物正处于研发和临床应用阶段。PAL 注射制剂 (药物名: Palynziq™) 最近已批准用于治疗成人 PKU 患者，Palynziq™是 PAL 经过 PEG(聚乙二醇)化得到的，该药物利用酶的固定化技术得

以开发应用，聚乙二醇化已被证明改进酶的半衰期并降低受试者抗原反应（参见 WO 2008/153776；Sarkissian 等，PNAS 105：20894-20899 [2008]）。针对 PAL 口服药物，目前已经处于开发和应用阶段，通过研制口服 PAL 制剂来降低 PKU 受试者体内苯丙氨酸的含量（Babich 等，Pharmaceuticals 13，63 [2020]和 Hoskins 等，Lancet 1(8165)：392-394 [1980]），通过开发能够表达 PAL 酶的工程益生菌来消耗人体胃肠道内的苯丙氨酸（参见 WO 2021/188819），此外，在动物实验中，通过肠循环途径来降低血液中苯丙氨酸水平已经被证实（Isabella 等，Nature Biotechnology 39：857-867 [2018]）。但以上方式都存在缺点，在 PEG-PAL 注射药剂方面：如，价格昂贵，不良反应众多，免疫原性问题（疗效随时间下降），长时间注射使人产生痛苦感等；在 PAL 益生菌药物方面：具有剂量依赖性，不良反应众多，口服方法比较难以接受，单位益生菌产酶数消耗的苯丙氨酸的量较少，所选苯丙氨酸解氨酶的酶活性不高，底物特异性不强等。

目前，对来源于藻类植物 *Anabaena variabilis*；真菌类 *Rhodospiridium toruloides*，*Rhodotorulaglutinis* 和 *Pseudozyma antarctica*；以及细菌类 *Streptomyces maritimus*，*Photorhabdus luminescens* 和 *Rubrobacter xylophilus* 等的 PAL 研究较多。不同生物体来源的 PAL 酶的活性相差较大，其中真菌来源的 PAL 具有较高优势，比其他微生物来源的 PAL 酶活性更高（Kawatra 等，Biochimie 177：142-152 [2020]和 Zhu 等，Biotechnol Lett 5：751-756 [2013]）。其中粘红酵母（*Rhodotorulaglutinis*）来源的 RgPAL 在最适条件下的酶活力为 4.2U/mg，其酶活力高于 *R. toruloides*，*R. aurantiaca* KM-1，*P. crispum*，*S. maritimus*，*A. variabilis*，和 *N. punctiforme* 来源的 PAL 酶活力（Zhu 等，Biotechnol Lett 5：751-756 [2013]）。大多数 PAL 在碱性环境中发挥其最高的酶催化活性，最适 pH 范围为 8.5 至 9.5。体外获得的 PAL 具有一定的局限性，如比活性降低、半衰期短，以及由于在体内与苯丙氨酸接触时间较长而在 pH 7 时发生蛋白质降解而失去活性等等。因此，一些研究集中在改善 PAL 性能方面（Gamez 等，Molecular Therapy 9：124-129 [2004]；Babich 等，Heliyon 6：e03096 [2020]；Zhu 等，Biotechnology Reports 3：21-26 [2014]；WO 2014/172541 和 US 2021/0222145），即对胃酸的耐受性，对蛋白酶的抵抗力，酶的稳定性以及耐受时间，目的是能够成功的实现口服 PAL 酶类药物。

为了通过口服 PAL 途径治疗 PKU 疾病，实现 PAL 在人体胃肠道环境中的应用价值，有必要通过一些技术方法改善 PAL 的活性，以期提高工程苯丙氨酸解氨酶对蛋白酶的耐受性，在酸性条件下的催化活性，以及对高温储存的稳定性。已知微生物来源的酶的天然催化活性可以通过各种蛋白质工程方法来提高，包括诱变、定向进化、聚乙二醇化和包埋。这些工程变异体、突变体或其多肽在生化上毒性较低、作用高效，并且免疫原性刺激较低。

通过蛋白质工程技术改善酶的性质方法有很多，包括随机突变，定向进化，理性设计以及固定化等等。通过定向改造野生酶，从而获得具有优良性能的突变体以满足人们对该酶的工业化需求。

发明内容

本发明通过随机进化与定向改造的方法改善粘红酵母(*Rhodotorulaglutinis*)来源的苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 的活性性能，例如被优化以增强对蛋白酶的耐受性能，提高该酶在酸性 pH 条件下的催化活性，或提高在高温条件下的稳定性。

本发明针对现有技术公开的野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 进行突变筛选。该酶筛选自粘红酵母 (*Rhodotorulaglutinis*)，核酸编码序列如 SEQ ID NO.1 所示，氨基酸序列为 SEQ ID NO.2 所示。其最适 pH 为 8~9，对酸性 pH，蛋白水解酶及高温环境敏感。因此，通过对该野生型酶进行随机突变筛选优势突变体，以期获得在模拟肠道环境中苯丙氨酸转化率提高的苯丙氨酸解氨酶突变体。

本发明的目的是提供一种催化活性提高的苯丙氨酸解氨酶突变体及其应用。本发明通过随机突变进行大量的突变体筛选，获得催化活性更强的苯丙氨酸解氨酶突变体，并构建得到了重组表达苯丙氨酸解氨酶的基因工程菌株，为实现其应用奠定了基础。

第一方面，本发明提供一种苯丙氨酸解氨酶突变体，所述突变体具有催化苯丙氨酸的活性，且在特定环境中所述突变体的催化活性高于野生型苯丙氨酸解氨酶的催化活性。

根据本发明的实施方案，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列基础上，在 K92，Q488，Q576 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点。

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：K92E，Q488E，Q576E 中的一种或两种或三种或四种以上的组合。

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：第 92 位赖氨酸突变为谷氨酸；第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 92 位赖氨酸突变为谷氨酸，第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸。

根据本发明的实施方案，为进一步提高工程苯丙氨酸解氨酶的催化活性，本发明提供酶活性继续提高的苯丙氨酸解氨酶突变体，其在上述获得的较优的突变体 Variant#5（氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示）的基础上，进一步进行突变改造。具体来说，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.4 的基础上，在 A13，N18，T28，S29，R77，I89，I127，S145，

L151, T169, I184, K231, Q237, M239, T275, T279, T342, H376, S379, N399, N444, D513, E542, E544, A557, T560, S592, E606, A623, I624, A636, I654 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点。

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.4，存在如下位点的突变：A13T, N18D, T28I, S29G, R77G, I89V, I127T, S145N, L151Q, T169A, I184V, K231H, K231Y, Q237R, Q237E, M239T, T275P, T279S, T342I, H376R, S379G, N399S, N444S, E488A, D513E, E542G, E544G, A557V, T560S, E576A, S592G, E606V, A623G, I624V, A636V, I654M 中的一种或两种或三种或四种以上的组合。

更具体地，对应于 SEQ ID NO.4，存在如下位点的突变：第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，且第 444 位天冬酰胺突变为丝氨酸；第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸，且第 654 位异亮氨酸突变为甲硫氨酸；第 13 位丙氨酸突变为苏氨酸，第 127 位异亮氨酸突变为苏氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 18 位天冬酰胺突变为天冬氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺；第 18 位天冬酰胺突变为天冬氨酸，且第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，且第 231 位赖氨酸突变为组氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，且第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，且第 623 位丙氨酸突变为甘氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 376 位组氨酸突变为精氨酸，且第 557 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，第 376 位组氨酸突变为精氨酸，且第 557 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 18 位天冬酰胺突变为天冬氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 127 位异亮氨酸突变为苏氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，且第 654 位异亮氨酸突变为甲硫氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 279 位苏氨酸突变为丝氨酸，且第 488 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 28 位苏氨酸突变为异亮氨酸，第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 399 位天冬酰胺突变为丝氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，第 279 位苏氨酸突变为丝氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 560 位苏氨酸突变为丝氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，且第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 576

位谷氨酸突变为丙氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 542 位谷氨酸突变为甘氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 557 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 636 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 237 位谷氨酰胺突变为精氨酸，第 542 位谷氨酸突变为甘氨酸，且第 606 位谷氨酸突变为缬氨酸；第 29 位丝氨酸突变为甘氨酸，第 145 位丝氨酸突变为天冬酰胺，且第 279 位苏氨酸突变为丝氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 184 位异亮氨酸突变为缬氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 184 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 592 位丝氨酸突变为甘氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 544 位谷氨酸突变为甘氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 237 位谷氨酰胺突变为精氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸。

根据本发明的实施方案，本发明提供了在胰蛋白酶作用下催化活性进一步提高的苯丙氨酸解氨酶突变体，即在野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL（对应于 SEQ ID NO.2）的基础上，进一步进行突变改造。具体地，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 的基础上，在 K26，Y64，R177，R445，K676 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点。

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：K26A，K26P，Y64S，Y64H，R177M，R445A，K676S 中的一种或两种或三种或四种以上的组合。

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸；第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 676 位赖氨酸突变为丝氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，且第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，且第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸。

根据本发明的实施方案，本发明提供温度稳定性增强的苯丙氨酸解氨酶突变体，即在野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL（对应于 SEQ ID NO.2）的基础上进行突变改造。具体地，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 的基础上，在 R101，E124，H340，E341，V344 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点。

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：R101Q，E124A，E124Q，H340D，H340V，E341A，V344A 中的一种或两种或三种或四种以上的组合。

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：第 101 位精氨酸突变为谷氨酰胺；第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为谷氨酰胺；第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344

位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为谷氨酰胺，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为谷氨酰胺，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸。

根据本发明的实施方案，本发明通过两个或两个以上位点的组合突变逐步提高工程苯丙氨酸解氨酶的胰蛋白酶耐受性，pH6 条件下的催化活性和温度稳定性。即在野生型苯丙氨酸解氨酶的基础上进行组合突变改造。具体地，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 的基础上，在 K26, Y64, E124, T169, R177, M239, H340, H341, V344, R445, Q488, Q576 位中的至少两个位置发生氨基酸突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点。

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：K26A, K26P, Y64S, Y64H, E124A, T169A, R177M, M239T, H340D, H340V, H341A, V344A, R445A, Q488E 和 Q576E 中的一种或两种或三种或四种以上的组合。

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 341 位组氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 177

位精氨酸突变为甲硫氨酸，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，且 445 位精氨酸突变为丙氨酸。

根据本发明的实施方案，还提供了含有与 SEQ ID NO.2 和 4 至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列的工程苯丙氨酸解氨酶突变体或其功能片段。

第二方面，本发明还提供编码上述苯丙氨酸解氨酶突变体的编码基因。

第三方面，本发明还提供表达上述苯丙氨酸解氨酶突变体的基因工程菌，其包含编码所述苯丙氨酸解氨酶突变体的多核苷酸。具体地，所述基因工程菌是将所述核酸载体连接得到重组表达载体，再导入蛋白表达宿主菌中得到的重组菌株。

根据本发明的实施方案，所述宿主为大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌或者酵母菌中的任一种。优选地，所述蛋白表达宿主菌为大肠杆菌，更优选地其是 *E.coli* BL21(DE3)。

根据本发明的实施方案，所述表达载体为 pET-30a(+).

根据本发明的实施方案，所述核酸与表达载体通过 DNA 连接酶或者通过无缝克隆 PCR 重组技术连接形成重组表达载体。

第四方面，本发明还提供上述基因工程菌的构建方法，包括将所述核酸载体连接得到重组载体，再导入表达宿主菌种得到重组菌株的步骤。

第五方面，本发明提供该基因工程菌在制备苯丙氨酸解氨酶突变体中的应用。

第六方面，本发明进一步提供所述苯丙氨酸解氨酶突变体的制备方法，包括培养所述基因工程菌，使其表达编码所述苯丙氨酸解氨酶突变体基因的步骤。

根据本发明的实施方案，所述的培养条件是将所述重组菌株接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素抗性的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C、220rpm 振荡培养至 OD600=0.6-0.8 时，加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5mM，转至 16 $^{\circ}$ C、150rpm 培养 16-18h 使苯丙氨酸解氨酶突变体蛋白表达。

根据本发明的实施方案，所述 LB 培养基含有 10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母提取物和 10 g/L NaCl。

根据本发明的实施方案，所述制备方法还包括从培养的重组表达菌株中提纯得到苯丙氨酸解氨酶突变体的步骤。即进一步将所述培养后的重组菌体进行超声波破碎，收集细胞破碎后的表达上清，所述表达上清含有苯丙氨酸解氨酶突变体目的蛋白，用 Ni 柱纯化目的蛋白，通过高浓度咪唑缓冲液洗脱得到纯度较高的苯丙氨酸解氨酶突变体目的蛋白。

第七方面，本发明还提供所述的苯丙氨酸解氨酶突变体在催化降解 L-苯丙氨酸中的应用，所述突变体参与的催化反应中所生成的产物为反式肉桂酸和氨。

第八方面，本发明还提供了一种苯丙氨酸的降解方法，包括使所述苯丙氨酸解氨酶突变体与苯丙氨酸孵育，进行催化降解反应。

根据本发明筛选突变体的实施方案，所述催化反应的温度为 25-40 $^{\circ}$ C，优选 25 $^{\circ}$ C；优选地，所述催化反应体系中苯丙氨酸的浓度为 20mM。优选地，所述催化反应体系的 pH 为 6-9，优选 pH7-8.8。

第九方面，本发明还提供一种苯丙氨酸解氨酶高活性突变体的筛选方法，包括如下步骤：建立突变体文库；构建、分离和高通量培养菌株；表达苯丙氨酸解氨酶突变体蛋白的宿主菌株的高通量破碎裂解；含苯丙氨酸解氨酶突变体的裂解物的在特定条件下进行催化反应；用酶标仪测定催化反应液在 290nm 下的吸光度变化，选择催化活性高的突变体。所述吸光度上升趋势越明显，则反应生成的反式肉桂酸含量越多，表示突变体的催化活性越高。

具体地，所述特定条件是苯丙氨酸解氨酶突变体在 pH6 和/或 8.8 下的催化反应；在一个实施例中，所述特定条件是苯丙氨酸解氨酶突变体在胰蛋白酶作用后参与的催化反应；在又一实施例中，所述特定条件是苯丙氨酸解氨酶在 37 $^{\circ}$ C 或 50 $^{\circ}$ C 保存一定时间后的参与的催化反应。

第十方面，本发明进一步提供所述的苯丙氨酸解氨酶突变体在制备治疗苯丙酮尿症疾病的口服药物中的应用。在一些实施例中，该工程苯丙氨酸解氨酶是突变体酶。所述的突变酶在胃肠道环境中，与野生型酶相比具有更高的催化活性，更强的蛋白酶耐受性和温度稳定性，能够消耗更多的苯丙氨酸。

本发明根据苯丙氨酸解氨酶的催化性质，通过构建突变体的高通量筛选方法，筛选出一批苯丙氨酸解氨酶的突变体，该突变体的胰蛋白酶耐受性，在 pH6 条件下的比活，温度稳

定性较野生型苯丙氨酸解氨酶显著提升，并可以在大肠杆菌种高效表达。此外，通过对苯丙氨酸解氨酶进行理性设计，分析其氨基酸序列及蛋白质结构功能，逐步提高其催化活性。通过在含有胰蛋白酶的模拟肠液中进行酶活性分析，对苯丙氨酸解氨酶具有广泛的应用价值。因此，所述突变体更加有利于其在口服药物治疗苯丙酮尿症疾病过程的应用。

附图说明

图 1：突变体高通量筛选流程示意图。

图 2：细胞裂解后粗酶液的 SDS-PAGE 结果。表达菌株经 96 孔板高通量细胞培养后，野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 和突变体 Variant#1 细胞裂解后粗酶液的 SDS-PAGE 结果。

图 3：RgPAL 及其部分突变体蛋白纯化后的 SDS-PAGE 结果。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 和部分突变体(Variant#5, 23, 41, 60, 74 和 92)蛋白表达并后纯化的 SDS-PAGE 结果。

图 4：RgPAL 及其部分突变体在 pH8.8 条件下的相对酶活力。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及部分突变体(Variant#4, 5, 12, 15, 27, 35, 41, 44, 45 和 48)在 pH8.8 条件下进行催化反应后的相对酶活力对比结果。

图 5：RgPAL 及其部分突变体在 pH6 条件下的相对酶活力。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及部分突变体(Variant#4, 5, 12, 15, 27, 35, 41, 44, 45 和 48)在 pH6 条件下进行催化反应后的相对酶活力对比结果。

图 6：RgPAL 及其部分突变体在模拟肠液中的相对酶活力。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及部分突变体(Variant#4, 45, 48, 54, 55, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 81 和 96)在含有胰蛋白酶的模拟肠液中进行催化反应后的相对酶活力对比结果。

图 7：RgPAL 及其部分突变体在模拟肠液中生成肉桂酸的动态变化。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及部分突变体(Variant#54, 55, 59, 60, 61, 62, 63 和 64)在含有胰蛋白酶的模拟肠液中降解苯丙氨酸，在反应 15min 内产物肉桂酸的生成量随时间的变化。

图 8：RgPAL 及其部分突变体在 37°C 孵育 4h 后的相对酶活力。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及部分突变体(Variant#70, 71, 73, 74, 76, 78, 81, 82, 83, 84, 85, 86 和 96)在 37°C 孵育 4h 后的相对残余酶活力对比结果。

图 9：RgPAL 及其部分突变体在 50°C 孵育 4h 后的相对酶活力。野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及部分突变体(Variant#68, 69, 70, 71, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86 和 96)在 50°C 孵育 4h 后的相对残余酶活力对比结果。

具体实施方式

本发明中氨基酸由单字母或三字母代码表示，具有如下含义：G(Gly-甘氨酸)，A(Ala-丙氨酸)，V(Val-缬氨酸)，L(Leu-亮氨酸)，I(Ile-异亮氨酸)，P(Pro-脯氨酸)，F(Phe-苯丙氨酸)，Y(Tyr-酪氨酸)，W(Trp-色氨酸)，S(Ser-丝氨酸)，T(Thr-苏氨酸)，C(Cys-半胱氨酸)，M(Met-甲硫氨酸)，N(Asn-天冬酰胺)，Q(Gln-谷氨酰胺)，D(Asp-天冬氨酸)，E(Glu-谷氨酸)，K(Lys-赖氨酸)，R(Arg-精氨酸)，H(His-组氨酸)。

本发明中，“同源性”具有本领域常规的含义，是指两个核苷酸或者氨基酸序列之间的同一性。

在本发明中，术语“引物”是指初始的核酸片段，通常是与由目标核酸分子全部或部分的引物结合位点互补的 RNA 寡核苷酸、DNA 寡核苷酸或嵌合序列。引物链可包含天然的、合成的或修饰的核苷酸。引物长度的下限为在核酸扩增反应条件下可以形成稳定双链所需的最小长度。

在本发明中，术语“突变体”、“突变体蛋白”、“突变体酶”和“变异体”可以互换使用，这些表达是指相对于某一特定的氨基酸序列，例如野生型的序列 SEQ ID NO.2 来源于粘红酵母的苯丙氨酸解氨酶，或来源于此类酶的基础上，包含一个或更多位置氨基酸的改变，即氨基酸取代、插入和/或缺失，并仍保留苯丙氨酸解氨酶的活性。突变体可以通过本领域已知的各种技术方法获得。用于修饰编码 DNA 序列的示例性技术包括但不限于：定向诱变、随机突变和合成寡核苷酸的构建，进而得到氨基酸序列发生改变的突变体。

本文所用的术语“对应于”具有本领域普通技术人员通常理解的意义。具体地说，“对应于”表示两条序列经过比对后，一条序列与另一条序列中的指定位置相对应的位置。

具体实施方案中，所述同源性或序列相同性可以是 90%以上，优选 95%以上，更优选 98%的同源性。本文中通过突变位点的位置编号和该位点的氨基酸种类表达突变体位点。例如 K92E 表示与 SEQ ID NO.2 比对，在对应于 SEQ ID NO.2 第 92 位置的赖氨酸突变为谷氨酸。本发明中，采用“/”表示突变位点的组合，例如“Q488E/Q576E”表示第 488 位谷氨酰胺和第 576 位谷氨酸均发生突变，包含两个突变位点，即第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸和第 576 位谷氨酸突变为谷氨酸，为双突变体。依此类推，“K92E/Q488E/Q576E”表示相应的三个位点同时发生相应的突变，为三突变体。

下面将结合实施例对本发明的方法做进一步说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。在实施例中未注明具体条件的实验方法，通常可按照分子生物学领域的常规实验中的条件，或按照质粒、菌株等商品化生产厂商的说明书进行操作。突变 PCR 为本领域技术人员所熟悉的易错 PCR。除非特别说明，以下实施例中使用的试剂和仪器均为市售可得产品，或者可以通过已知方法制备所得。

实施例一：野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 基因的获得及表达载体的构建

本发明以现有技术公开的苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 为基础，其筛选自粘红酵母 *Rhodotorulaglutinis* JN-1，其催化苯丙氨酸反应的最适作用 pH 为 8-9，核酸编码序列如 SEQ ID NO.1 所示，氨基酸序列为 SEQ ID NO.2 所示，在大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)中表达制备。委托金斯瑞生物技术有限公司经过密码子优化后人工合成该基因，然后连接入 pET-30a(+)载体的 NdeI 和 XhoI 的酶切位点之间，转化入大肠杆菌克隆宿主 Top10 和表达宿主 *E.coli*BL21(DE3)中，于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上筛选，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，筛选阳性克隆转化子中包含的表达载体被命名为 pET30a-RgPAL，抽提质粒，测序验证正确。

实施例二：RgPAL 突变体高通量筛选方法

本发明建立了酶联反应高效筛选 RgPAL 突变体的策略，实现突变体的高通量筛选，该过程示意图如图 1 所示。具体方法如下：

1) RgPAL 突变体的高通量培养

以重组质粒 pET30a-RgPAL 为模板，分别设计随机突变引物，进行易错 PCR，对目的基因进行单点或多点随机突变以及两个或两个以上位点的组合突变，通过同源重组技术将突变后的目的基因片段与表达质粒连接形成重组载体。将重组质粒转化入表达宿主 *E.coli*BL21(DE3)中，在含有 10g/L 蛋白胨，5g/L 酵母提取物，10g/L NaCl，15g/L 琼脂粉和 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板上培养，筛选出阳性克隆的大肠杆菌细胞。在 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜后，将单克隆菌落接种于含有 50 μ g/mL 卡那霉素，400 μ L/孔 LB 培养基的 96 深孔板中，在孔板摇床（800rpm，37 $^{\circ}$ C）过夜培养 12-16h 作为种子液。

取 50 μ L 过夜生长的细胞种子液转接至含有 50 μ g/mL 卡那霉素，450 μ L/孔 LB 培养基的 96 深孔板中，放置孔板摇床（800rpm，37 $^{\circ}$ C）中培养 120min。然后用终浓度为 0.5mMIPTG 诱导细胞表达蛋白，在 16 $^{\circ}$ C 摇床中培养 16-18h。将含有种子液的 96 孔板放置 -80 $^{\circ}$ C 保存。蛋白表达后的 96 孔板在离心机中离心（4000rpm，20min），去除培养基上清液，留细胞沉淀进行下一步分析。

以上操作过程均在无菌超净工作台中进行，且 96 孔筛选板中设置野生型苯丙氨酸解氨酶表达宿主作为对照。

2) RgPAL 突变体蛋白的高通量裂解

大肠杆菌表达 RgPAL 为胞内酶，需要对菌体进行破碎，以破碎上清为粗酶液，加入底物进行酶催化反应。首先，在含有细胞沉淀的 96 深孔板中加入 400 μ L/孔裂解缓冲液（50mM Tris-HCl，150mM NaCl，pH8.0；2mM EDTA；0.5% Triton X-100；1mM DTT；5mg/mL 溶菌酶和 0.5mg/mL 多粘菌素 B），用孔板振荡器将菌体沉淀重悬。混合物在室温

下震荡搅拌 2-3h 后离心 (4000rpm, 20min), 收集细胞裂解后上清液即含有苯丙氨酸解氨酶的粗酶液, 用来进行下一步酶活力高通量分析。取野生型和 Variant#1 细胞裂解后的粗酶液进行 SDS-PAGE 分析表明 (如图 2 所示), 在表观相对分子质量为~75kDa 处存在一个过表达的蛋白, 这与 RgPAL 的预期相对分子质量一致, 且目的蛋白在大肠杆菌中实现高效可溶性表达。

3) RgPAL 突变体粗酶裂解液酶活的高通量分析

通过在 290nm 处的吸光度随时间的变化来评估反式肉桂酸的生成, 从而确定与比较 RgPAL 突变体的活性。在本发明中, 将 250 μ L/孔酶催化反应液 (20mM 苯丙氨酸, 100mM 硼酸钠缓冲液, pH8.8/50mM MES 缓冲液, pH6, 20 μ L 粗酶裂解液) 加入到 96 孔酶标板中 (Costar#3635, Corning) 混合反应, 并通过使用酶标仪跟踪 290nm 处吸光度随时间的变化 (15min, 1min/次读数) 来确定酶活力。

4) RgPAL 突变体粗酶液酶活在胰蛋白酶作用下的高通量分析

模拟含有胰蛋白酶的肠道环境, 测定 RgPAL 突变体在胰蛋白酶作用后的残余酶活力。首先, 在 96 孔酶标板中加入 100 μ L 混合液 (100 μ g/mL 胰蛋白酶, 0.68%的 KH_2PO_4 , pH6.8, 80 μ L 粗酶裂解液), 将孔板放置 37 $^\circ\text{C}$, 400rpm 孵育 30min 后进行分析。根据实施例二第 3) 点的高通量酶活力分析方法, 检测苯丙氨酸解氨酶突变体粗酶液在胰蛋白酶作用后的残余酶活力。

5) 高温贮藏后 RgPAL 突变体粗酶液酶活的高通量分析

各取 100 μ L 突变体的裂解液粗酶液分别放置 37 $^\circ\text{C}$ 和 50 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 4h, 孵育过程中析出的不溶物质通过离心 (4000rpm, 20min) 被去除。取 20 μ L 粗酶裂解液上清, 根据实施例二中第 3) 点的高通量酶活力分析方法, 检测苯丙氨酸解氨酶突变体粗酶液高温孵育后的残余酶活力。

实施例三: 通过组合突变和叠代突变提高 RgPAL 酶活力

通过实施例二中对突变体的高通量分析, 筛选出相对酶活力高于野生型苯丙氨酸解氨酶的突变体, 通过测序分析其氨基酸突变位点。进行两个或两个以上位点的组合突变, 并对相应的突变体表达菌株进行培养, 对表达的目的蛋白进行纯化, 进而对突变体酶学性质进行定量分析。所筛选得到的优势突变体 Variant#5, 其氨基酸序列如 SEQIDNO.4 所示, 筛选结果如表 1 所示。

在突变体 Variant#5 的基础上进行随机突变, 根据实施例二所示的筛选策略筛选高效突变体, 同时进行两个或两个以上位点的组合突变, 筛选结果如表 2 所示。

实施例四: 通过定点饱和突变及组合突变提高野生型 RgPAL 的胰蛋白酶耐受性

将粘红酵母来源的苯丙氨酸解氨酶（RgPAL）与 Genbank 数据库中已报道的苯丙氨酸解氨酶的氨基酸序列进行同源性比对分析；同时对其蛋白结构进行预测，利用 Swiss-Model 和 PyMOL 等网站和软件对野生型 RgPAL 进行同源建模，利用苯丙氨酸分子为底物进行分子对接，从而预测 RgPAL 的催化活性位点及底物结合位点，并分析这些位点附近氨基酸残基的分子间相互作用，从而设计 RgPAL 的氨基酸突变位点。

在上述蛋白质结构分析的基础上，还利用蛋白酶水解位点预测网站分析了 RgPAL 的蛋白酶水解位点。共确定选择对应于野生型苯丙氨酸解氨酶氨基酸序列（SEQIDNO.2）的 K26, Y64, F115, R177, K258, K345, R445, K676 为突变位点进行饱和突变，建立单位点饱和突变文库。然后利用实施例二中的高通量筛选策略对突变体文库中的转化子进行酶活力筛选，经过进一步组合突变得到酶学性质显著提高的突变体，突变体筛选结果如表 3 所示。

实施例五：通过定点突变及组合突变提高野生型 RgPAL 的温度稳定性

为提高 RgPAL 的热稳定性，利用蛋白质热稳定性分析网站（HotSpot Wizard 和 FireProt: Design stable proteins）分析野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 的氨基酸序列并预测突变位点。选择对应于野生型苯丙氨酸解氨酶（SEQIDNO.2）的氨基酸序列进行定点突变，突变位点为 R101D, R101E, R101Q, T123L, T123V, E124A, E124Q, H340D, H340V, E341A, E343A, V344A, L353D, L353H 和 R354M。分别设计定点突变引物序列，构建突变体，并对相应的突变体表达菌株进行培养，对表达的目的蛋白进行纯化，进而对突变体酶学性质进行定量分析。

通过两个或两个以上位点的组合突变逐步提高突变体的酶活力，突变体筛选结果如表 4 所示。

实施例六：组合突变进一步提高苯丙氨酸解氨酶的酶活力

通过上述实施例二-实施例五过程中筛选得到的优势突变位点，进行两个或两个以上位点的组合突变，构建突变体，对相应的突变体表达菌株进行发酵表达得到突变体蛋白，进行目的蛋白纯化，并进一步分析突变体酶活力。筛选结果如表 5 所示。

实施例七：RgPAL 及其突变体蛋白的发酵表达

利用本领域公知的质粒转化感受态细胞大肠杆菌的方法，所用大肠杆菌 *E.coli*BL21(DE3) 感受态细胞购买于北京擎科生物科技有限公司，并用热激法将上述实施例中合成的野生型表达载体 pET30a-RgPAL 和突变体表达载体分别转化入感受态细胞，筛选阳性克隆 PCR 验证及测序验证正确后进行蛋白发酵表达。

接种针挑取野生型与突变体阳性单克隆菌株接种于 5mL LB 培养基中，以 37°C、220rpm 过夜培养 16-18h，然后以按 2% (V/V) 接种量接种于 250mL LB 培养基中，以 37°C、

220rpm 培养 2-3h。当细菌密度 OD600 达到 0.6-0.8 时，加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG 诱导蛋白表达，为防止包涵体的形成，表达条件为 150rpm，16°C 低温过夜诱导蛋白表达。

实施例八：RgPAL 及其突变体蛋白的纯化

离心收集实施例七中蛋白发酵表达后的菌体（8000rpm、4°C、10min），20mL Tris-HCl, 150mM NaCl 缓冲液(pH7.5)重悬细胞，冰浴超声波破碎；12000rpm，30min 离心收集上清，即为大肠杆菌胞内表达的粗酶提取液，用孔径 0.22 μ m 水系滤膜过滤。采用 AKTA 亲和层析系统，利用 Ni²⁺层析柱对上述目的蛋白进行亲和层析纯化，咪唑洗脱后经过脱盐柱脱盐，蛋白保存在 Tris-HCl/NaCl (pH7.5)缓冲液中备用，野生型蛋白命名为 RgPAL，突变型蛋白分别命名为 Variant#加编号。野生型酶和部分突变体蛋白纯化后的 SDS-PAGE 结果如图 3 所示。

实施例九：纯化的 RgPAL 及其突变体蛋白的酶学性质分析

通过上述实施例中的高通量初步筛选，蛋白结构分析，定点饱和突变，定点突变和组合突变得酶活力提高的突变体共 96 个，对这些突变体蛋白的表达菌株进行培养，加入 0.5mM IPTG 进行诱导，然后利用 Ni 柱纯化突变体蛋白，对纯化后的蛋白进行酶学性质分析。

1) 苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及其突变体的相对酶活力

酶活力定义 (Active Unit, U)：每分钟生成 1 μ m 产物肉桂酸消耗的酶量。

比酶活定义 (Specific Activity, U/mg)：每 mg 酶具有的酶活力（以下简称比活）。

酶活力检测方法：测定在 pH8.8 的 100mM 硼酸钠缓冲液和 pH6 的 50mM MES 缓冲液中，以 20mM L-苯丙氨酸为底物，加入终浓度为 50 μ g/mL 纯化后的酶液；在室温下连续反应 5min，根据在 290nm 的吸光度的变化测定反应生成的肉桂酸含量，确定突变体的酶活力和比活，并计算野生型与突变体比酶活的比值得到相对酶活力（与野生型比较）。RgPAL 野生型酶和其部分突变体在 pH8.8 和 pH6 条件下的相对酶活力结果分别如图 4 和图 5 所示。

蛋白浓度测定：蛋白质浓度的测定依照 Lowry 方法，以牛血清白蛋白作为标准。

2) 苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及突变体在含有胰蛋白酶的模拟肠液中的催化反应

测定苯丙氨酸解氨酶突变体在含有胰蛋白酶的模拟肠液中的催化活性。

模拟含有胰蛋白酶的肠液环境，取浓度为 0.5mg/mL 的 RgPAL 野生型酶或突变体酶在含有 20mM L-苯丙氨酸，100 μ g/mL 胰蛋白酶的 0.68% KH₂PO₄ 缓冲液 (pH6.8) 中进行催化反应，在 37°C 条件下连续反应 15min，根据在 290nm 的吸光度的变化测定反应生成的肉桂酸含量，确定酶的酶活力以及比活，计算比较 RgPAL 野生型及其突变体的相对酶活力，结果如图 6 所示。反应 15min 内，RgPAL 野生型及部分突变体在胰蛋白酶作用下生成肉桂酸的动力学结果如图 7 所示。

3) 苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 及其突变体的温度稳定性

取 0.5mg/mL RgPAL 野生型酶和突变体酶分别放置于 37°C 和 50°C 水浴锅中静置孵育 4h，离心(12000 rpm, 5min)去除不溶物质，取上清进行酶活力测定。

根据实施例九 1) 中相对酶活测定方法，检测苯丙氨酸解氨酶突变体分别在 37°C 和 50°C 孵育 4h 后的残余酶活力，计算比较 RgPAL 野生型及其突变体的相对酶活，结果如图 8 和图 9 所示。

筛选结果

1) 野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 随机突变高通量筛选结果：

利用实施例二中的高通量筛选策略对野生型酶突变体文库转化子进行筛选，从 1000 余个转化子中筛选获得了 3 个酶活力总体提高的突变体，对其进行测序，并进行组合突变，突变体蛋白纯化后验证不同条件下进行酶学性质分析，与野生型苯丙氨酸解氨酶的酶活力进行比较得到相对酶活力，具体结果如表 1 所示。

表 1

RgPAL (SEQIDNO.2)的突变体活性筛选					
Variant#	与 RgPAL (SEQ ID NO.2) 相比氨基酸差异	RA (%)	RA (%)	RA (%)	RA (%)
		pH6	Trypsin,15min	37°C,4h	50°C,4h
1	K92E	102	105	103	
2	Q488E	122	118	130	117
3	Q576E	108	113	115	
4	Q488E/Q576E	133	126	137	110
5	K92E/Q488E/Q576E	135	131	151	128

注：以野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL(SEQ ID NO.2)的酶活力为 100%，将突变体的酶活力与野生型进行比较得到其他突变体的相对酶活力(Relative activity, RA)。

2) 突变体 Variant #5 随机突变高通量筛选结果：

利用实施例二对突变体 Variant#5 进行高通量筛选构建大量的突变体文库，通过组合突变，蛋白表达纯化，酶学性质分析，与突变体 Variant#5 酶活力相比，具体结果如表 2 所示。

表 2

Variant#5 (SEQIDNO.4)的突变体活性筛选					
Variant#	与 Variant#5 (SEQ ID NO.4)相比氨基酸差异	RA (%)	RA (%)	RA (%)	RA (%)
		pH6	Trypsin, 15min	37°C,4h	50°C,4h
6	I89V	109	104	113	
7	I89V/N444S	104	102	101	
8	D513E	105	123	119	111
9	D513E/I654M	103	108	110	
10	A13T/I127T/D513E	102		107	
11	N18D	103		104	
12	L151Q	106	122	127	115
13	N18D/L151Q	105	120	121	110
14	L151Q/K231H	111	113	105	

15	L151Q/K231Y	125	134	129	106
16	L151Q/K231Y/A623G	120	117	112	121
17	L151Q/H376R/A557V	121	118	115	
18	L151Q/K231Y/H376R/A557V	107			
19	N18D/I89V/I127T/L151Q/D513E	127	116	124	115
20	R77G	116	111	121	105
21	R77G/I654M	104	101	107	
22	R77G/T279S/E488A	111		116	
23	T28I/R77G/Q237E/N399S	101			
24	R77G/I89V/L151Q/K231Y/T279S/D513E	122	125	119	114
25	M239T	139	129	118	123
26	M239T/T560S	118	109	113	108
27	R77G/I89V/M239T	130	126	117	113
28	R77G/I89V/M239T/E576A	115	121	105	
29	M239T/E542G	120	123	114	106
30	L151Q/M239T/A557V	111		107	102
31	Q237E/A636V	118			
32	Q237R/E542G/E606V	123	105		
33	S29G/S145N/T279S	108		108	
34	R77G/I89V/L151Q/Q237E/M239T/D513E	129	124	121	112
35	T342I	130	129	131	116
36	I184V/T342I	133	122	126	108
37	I184V/T342I/S592G	123	115	102	
38	I89V/L151Q/Q237E/T342I	121	131	127	106
39	K231Y/T342I	114	120	123	109
40	T342I/E544G	119	110	106	
41	M239T/T342I	158	133	136	150
42	I89V/M239T/T342I	131	126	130	135
43	T169A/M239T/T342I	135	118	126	103
44	T275P/M239T/T342I	122	119	130	122
45	T169A/T275P/M239T/T342I	154	150	138	115
46	R77G/T169A/M239T/T342I	129	125	119	108
47	I89V/L151Q/M239T/T342I	140	112	124	107
48	T169A/T275P/M239T/T342I/D513E	179	159	129	115
49	R77G/T169A/M239T/T342I/D513E	136	119	126	117
50	R77G/L151Q/T169A/M239T/T342I/D513E	124	119	128	111
51	R77G/I89V/L151Q/T169A/Q237R/M239T/T275P/T342I/D513E	150	129	112	105

注：以野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL(SEQ ID NO.2)的酶活力为 100%，将突变体的酶活力与野生型进行比较得到其他突变体的相对酶活力(Relative activity, RA)。

3) RgPAL 定点饱和突变及组合突变筛选结果：

为了提高野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 对胰蛋白酶的耐受性，利用实施例四对野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL (SEQ ID NO.2)的部分氨基酸位点进行定点饱和突变构建突变体文库

并进行高通量筛选，通过进一步组合突变，蛋白表达与纯化，酶学性质分析得到酶活力，并与野生型 RgPAL 的酶活力进行比较，具体结果如表 3 所示。

表 3

RgPAL (SEQIDNO.2)的突变体活性筛选					
Variant#	与 RgPAL (SEQIDNO.2)相比氨基酸差异	RA(%)	RA(%)	RA (%)	RA(%)
		pH6	Trypsin, 15min	37°C,4h	50°C,4h
52	K26A	108	122	156	140
53	K26P	111	110	143	128
54	Y64S	131	170	188	159
55	Y64H	129	208	190	166
56	R177M	109	104	115	108
57	R445A	116	119	108	100
58	K676S	97	72	101	109
59	Y64S/R445A	167	200	195	180
60	K26P/R177M	131	216	199	175
61	K26P/Y64S	122	198	183	180
62	Y64H/R177M	136	226	200	196
63	K26A/Y64S/R177M	153	265	210	206
64	K26A/Y64H/R445A	146	233	193	200
65	K26A/Y64H/R177M/R445A	114	123	118	125
66	K26P/Y64S/R177M/R445A	123	128	108	110

注：以野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL(SEQ ID NO.2)的酶活力为 100%，将突变体的酶活力与野生型进行比较得到其他突变体的相对酶活力(Relative activity, RA)。

4) RgPAL 定点突变及组合突变筛选结果：

为了提高野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL 的热稳定性，利用实施例五对 RgPAL (SEQ ID NO.2)进行单个位点的定点突变及组合突变构建突变体，通过蛋白表达与纯化，酶学性质分析得到酶活力，并与野生型 RgPAL 的酶活力进行比较，具体结果如表 4 所示。

表 4

RgPAL (SEQIDNO.2)的突变体活性筛选					
Variant#	与 RgPAL (SEQIDNO.2)相比氨基酸差异	RA(%)	RA(%)	RA (%)	RA(%)
		pH6	Trypsin, 15min	37°C,4h	50°C,4h
67	R101Q	98	105	91	86
68	E124A	104	118	91	179
69	E124Q	107	101	97	150
70	H340D	138	122	127	100
71	H340V	134	119	119	142
72	E341A	133	123	103	
73	V344A	125	116	116	
74	H340V/E341A/V344A	143	139	116	
75	E124A/H340D/E341A/V344A	98	108	101	
76	E124A/H340V/E341A/V344A	133	125	145	124
77	E124Q/H340D/E341A/V344A	105	102	104	

78	E124Q/H340V/E341A/V344A	135	121	139	
----	-------------------------	-----	-----	-----	--

注：以野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL(SEQ ID NO.2)的酶活力为 100%，将突变体的酶活力与野生型进行比较得到其他突变体的相对酶活力(Relative activity, RA)。

5) 组合突变筛选结果：

表 5

RgPAL (SEQIDNO.2)的突变体活性筛选					
Variant#	与 RgPAL (SEQIDNO.2)相比 氨基酸差异	RA(%)	RA(%)	RA (%)	RA(%)
		pH6	Trypsin, 15min	37°C, 4h	50°C, 4h
79	K26A/V344A	180	186	160	119
80	K26P/V344A	175	160	156	126
81	Y64S/H340D	237	240	256	190
82	Y64H/H340D	258	207	286	212
83	Y64S/H340V	200	200	231	177
84	Y64H/H340V	200	260	231	186
85	K26A/Y64H/H340D	192	200	210	201
86	K26A/Y64H/H340V	188	176	190	200
87	K26A/Y64H/H341A	167	180	177	156
88	K26A/Y64H/V344A	159	173	155	155
89	K26A/Y64H/R177M/H340D	185	190	163	150
90	K26A/Y64H/R177M/H340V	200	209	188	166
91	K26A/Y64H/E124A/R177M/H340V	166	157	150	142
92	K26A/Y64H/E124A/R177M/H340V/V344A	159	170	139	123
93	Y64H/H340D/Q488E/Q576E	169	183	168	149
94	Y64H/H340V/Q488E/Q576E	178	154	150	136
95	Y64H/T169A/M239T/H340D	194	200	188	158
96	K26A/Y64H/T169A/M239T/R445A	224	275	209	220
97	K26A/Y64H/T169A/R177M/M239T/H340D	129			
98	K26A/Y64H/T169A/M239T/H340D/R445A	152			

注：以野生型苯丙氨酸解氨酶 RgPAL(SEQ ID NO.2)的酶活力为 100%，将突变体的酶活力与野生型进行比较得到其他突变体的相对酶活力(Relative activity, RA)。

权利要求书

1、一种苯丙氨酸解氨酶突变体，所述突变体具有催化苯丙氨酸的活性，且在特定环境中所述突变体的催化活性高于野生型苯丙氨酸解氨酶的催化活性，具体地其降低了对蛋白酶的敏感性以增强对蛋白酶水解的耐受性，在酸性 pH 条件下具有更高的催化活性，提高了对高温储存的耐受性。

2、如权利要求 1 所述的苯丙氨酸解氨酶突变体，其特征在于，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列基础上，在 K92，Q488，Q576 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点，且与 SEQ ID NO.2 有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列的苯丙氨酸解氨酶突变体或其功能片段；

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列，存在如下位点的突变：K92E，Q488E，Q576E 中的一种或两种或三种的组合；

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列，存在如下位点的突变：第 92 位赖氨酸突变为谷氨酸；第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 92 位赖氨酸突变为谷氨酸，第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸。

3、如权利要求 1 所述的苯丙氨酸解氨酶突变体，其特征在于，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.4 的基础上，在 A13，N18，T28，S29，R77，I89，I127，S145，L151，T169，I184，K231，Q237，M239，T275，T279，T342，H376，S379，N399，N444，D513，E542，E544，A557，T560，S592，E606，A623，I624，A636，I654 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点，且与 SEQ ID NO.4 有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列的苯丙氨酸解氨酶突变体或其功能片段；

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.4 所示氨基酸序列，存在如下位点的突变：A13T，N18D，T28I，S29G，R77G，I89V，I127T，S145N，L151Q，T169A，I184V，K231H，K231Y，Q237R，Q237E，M239T，T275P，T279S，T342I，H376R，S379G，N399S，N444S，E488A，D513E，E542G，E544G，A557V，T560S，E576A，S592G，E606V，A623G，I624V，A636V，I654M 中的一种或两种或三种或四种以上的组合；

更优选地，对应于 SEQ ID NO.4，存在如下位点的突变：第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，且第 444 位天冬酰胺突变为丝氨酸；第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸，且第 654 位异亮氨酸突变为甲硫氨酸；第 13 位丙氨酸突变为苏氨酸，第 127 位异亮氨酸突变为苏氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 18 位天冬酰胺突变为天冬氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺；第 18 位天冬酰胺突变为天冬氨酸，且第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，且第 231 位赖氨酸突变为组氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，且第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，且第 623 位丙氨酸突变为甘氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 376 位组氨酸突变为精氨酸，且第 557 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，第 376 位组氨酸突变为精氨酸，且第 557 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 18 位天冬酰胺突变为天冬氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 127 位异亮氨酸突变为苏氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，且第 654 位异亮氨酸突变为甲硫氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 279 位苏氨酸突变为丝氨酸，且第 488 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 28 位苏氨酸突变为异亮氨酸，第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 399 位天冬酰胺突变为丝氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，第 279 位苏氨酸突变为丝氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 560 位苏氨酸突变为丝氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，且第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 576 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 542 位谷氨酸突变为甘氨酸；第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 557 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 636 位丙氨酸突变为缬氨酸；第 237 位谷氨酰胺突变为精氨酸，第 542 位谷氨酸突变为甘氨酸，且第 606 位谷氨酸突变为缬氨酸；第 29 位丝氨酸突变为甘氨酸，第 145 位丝氨酸突变为天冬酰胺，且第 279 位苏氨酸突变为丝氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 184 位异亮氨酸突变为缬氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 184 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 342 位苏氨酸突变为

为异亮氨酸，且第 592 位丝氨酸突变为甘氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 237 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 231 位赖氨酸突变为酪氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 544 位谷氨酸突变为甘氨酸；第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸；第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸；第 77 位精氨酸突变为甘氨酸，第 89 位异亮氨酸突变为缬氨酸，第 151 位亮氨酸突变为谷氨酰胺，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 237 位谷氨酰胺突变为精氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 275 位苏氨酸突变为脯氨酸，第 342 位苏氨酸突变为异亮氨酸，且第 513 位天冬氨酸突变为谷氨酸。

4、如权利要求 1 所述的苯丙氨酸解氨酶突变体，其特征在于，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列的基础上，在 K26, Y64, R177, R445, K676 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点，且与 SEQ ID NO.2 有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列的苯丙氨酸解氨酶突变体或其功能片段；

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列，存在如下位点的突变：K26A, K26P, Y64S, Y64H, R177M, R445A, K676S 中的一种或两种或三种或四种以上的组合；

更优选地，对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸；第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 676 位赖氨酸突变为丝氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，且第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，且第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸。

5、如权利要求 1 所述的苯丙氨酸解氨酶突变体，其特征在于，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列的基础上，在 R101，E124，H340，E341，V344 位中的至少一个位置的氨基酸发生突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点，且与 SEQ ID NO.2 有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性的氨基酸序列的苯丙氨酸解氨酶突变体或其功能片段；

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列，存在如下位点的突变：R101Q，E124A，E124Q，H340D，H340V，E341A，V344A 中的一种或两种或三种或四种以上的组合；

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列，存在如下位点的突变：第 101 位精氨酸突变为谷氨酰胺；第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为谷氨酰胺；第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸；第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为谷氨酰胺，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 124 位谷氨酸突变为谷氨酰胺，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 341 位谷氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸。

6、如权利要求 1 所述的苯丙氨酸解氨酶突变体，其特征在于，所述突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列的基础上，在 K26，Y64，E124，T169，R177，M239，H340，H341，V344，R445，Q488，Q576 位中的至少两个位置发生氨基酸突变；或者所述苯丙氨酸解氨酶突变体的氨基酸序列具有所述发生突变的氨基酸序列中的所述突变位点，且与 SEQ ID NO.2 有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列的苯丙氨酸解氨酶突变体或其功能片段；

更优选地，所述苯丙氨酸解氨酶突变体包括对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：K26A，K26P，Y64S，Y64H，E124A，T169A，R177M，M239T，H340D，H340V，H341A，V344A，R445A，Q488E 和 Q576E 中的一种或两种或三种或四种以上的组合；

更具体地，对应于 SEQ ID NO.2，存在如下位点的突变：第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为脯氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 64 位酪氨酸突变为丝氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 341 位组氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，且第 340 位组氨酸突变为缬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 124 位谷氨酸突变为丙氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，且第 344 位缬氨酸突变为丙氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 340 位组氨酸突变为缬氨酸，第 488 位谷氨酰胺突变为谷氨酸，且第 576 位谷氨酰胺突变为谷氨酸；第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组

氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 445 位精氨酸突变为丙氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 177 位精氨酸突变为甲硫氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，且第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸；第 26 位赖氨酸突变为丙氨酸，第 64 位酪氨酸突变为组氨酸，第 169 位苏氨酸突变为丙氨酸，第 239 位甲硫氨酸突变为苏氨酸，第 340 位组氨酸突变为天冬氨酸，且 445 位精氨酸突变为丙氨酸。

7、如权利要求 1 至 6 任一项所述的苯丙氨酸解氨酶突变体的编码基因。

8、表达如权利要求 1 至 6 任一项所述的苯丙氨酸解氨酶突变体的基因工程菌，其包含所述苯丙氨酸解氨酶突变体的编码基因；具体地，所述基因工程菌是将所述编码基因载体连接得到重组表达载体，再导入蛋白表达宿主菌中得到的重组菌株；优选地，所述蛋白表达宿主菌为大肠杆菌，更优选地其是 *E.coli* BL21(DE3)；所述表达载体为 pET-30a(+)

9、如权利要求 1 至 6 任一项所述苯丙氨酸解氨酶突变体的制备方法，包括培养如权利要求 8 所述的基因工程菌，使其表达编码所述苯丙氨酸解氨酶突变体基因的步骤；

任选地，所述制备方法还包括从培养的重组表达菌株中提纯得到苯丙氨酸解氨酶突变体的步骤；具体地，将所述培养后的重组菌体进行超声波破碎，收集细胞破碎后的表达上清，所述表达上清含有苯丙氨酸解氨酶突变体目的蛋白，用 Ni 柱纯化目的蛋白，通过高浓度咪唑缓冲液洗脱得到纯度较高的苯丙氨酸解氨酶突变体目的蛋白。

10、如权利要求 1 至 6 任一项所述的苯丙氨酸解氨酶突变体在催化降解 L-苯丙氨酸中的应用，具体地，其参与的催化反应中所生成的产物为反式肉桂酸和氨。

11、一种苯丙氨酸的降解方法，包括使如权利要求 1 至 6 任一项所述苯丙氨酸解氨酶突变体与苯丙氨酸孵育，进行催化降解反应；具体地，所述催化反应的温度为 25-40°C，优选 25°C；优选地，所述催化反应体系中苯丙氨酸的浓度为 20mM。优选地，所述催化反应体系的 pH 为 6-9，优选为 pH7-8.8；更优选地，所述催化体系在人体肠道 pH 环境下具有催化活性。

12、如权利要求 1 至 6 任一项所述的苯丙氨酸解氨酶突变体在制备治疗苯丙酮尿症疾病的口服药物中的应用。

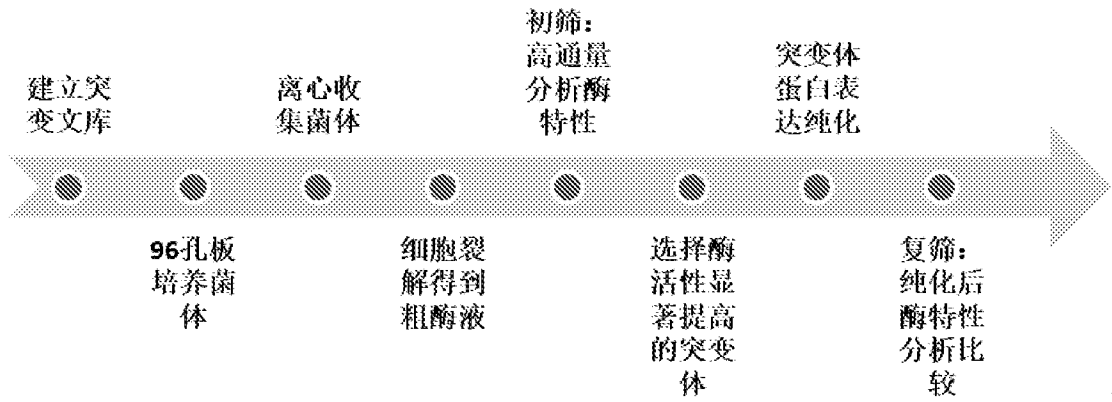


图 1

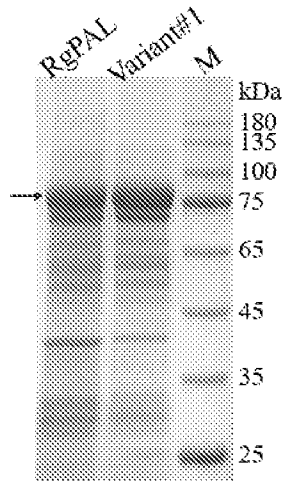


图 2

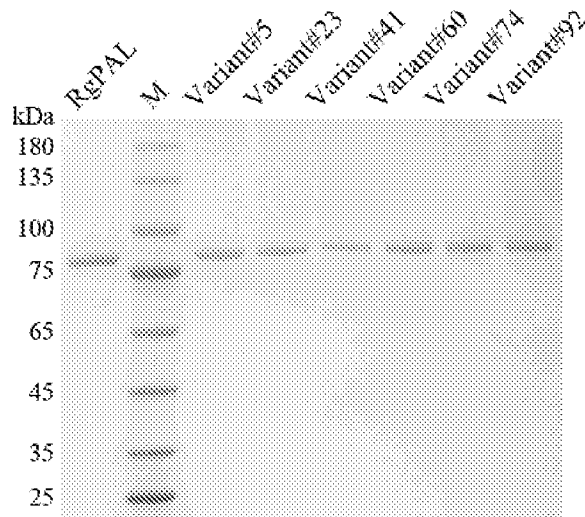


图 3

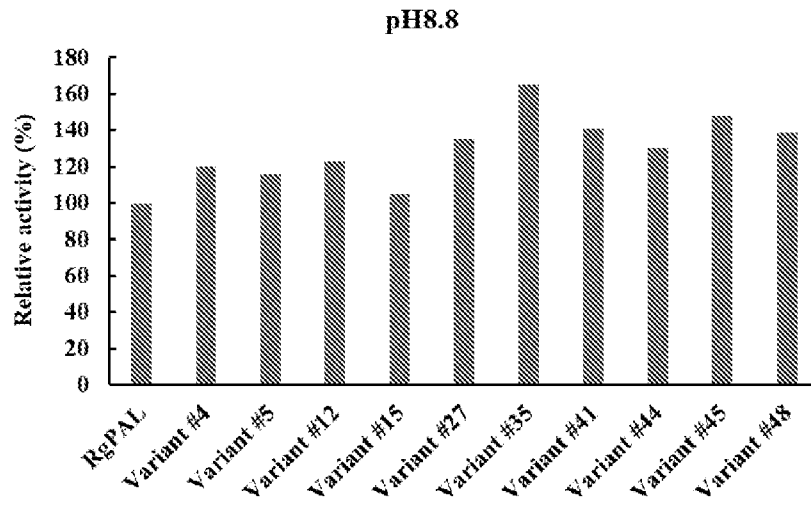


图 4

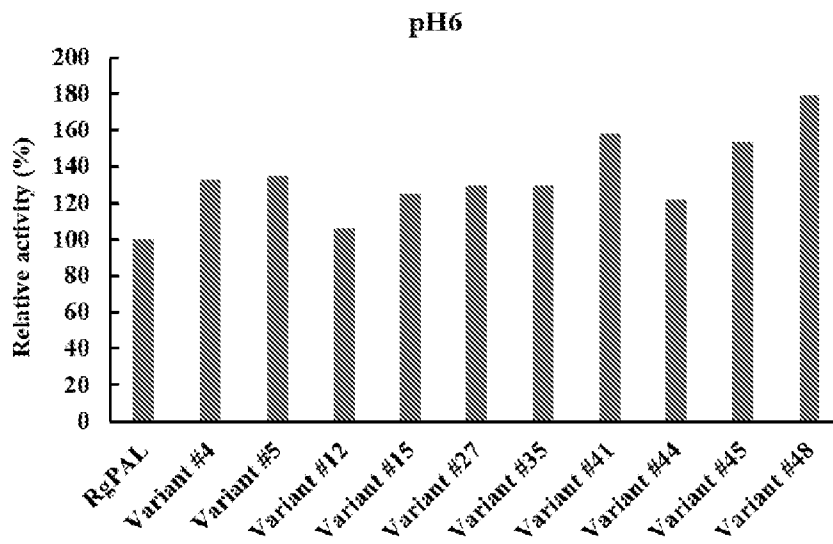


图 5

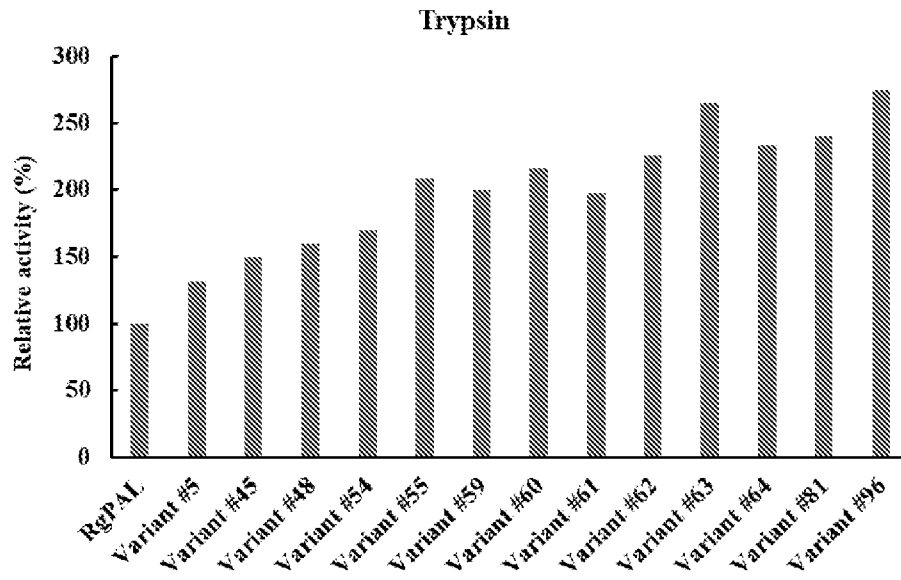


图 6

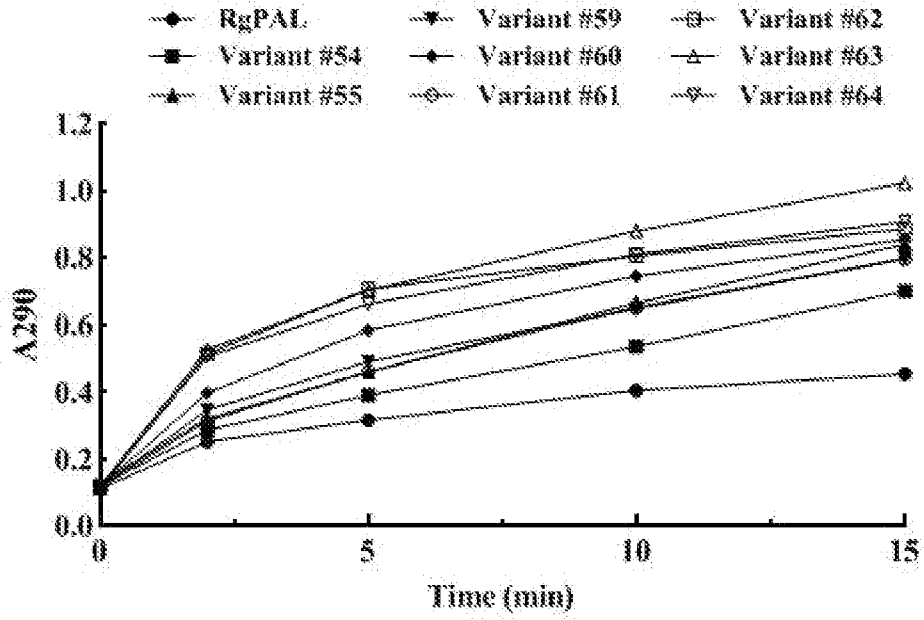


图 7
37°C

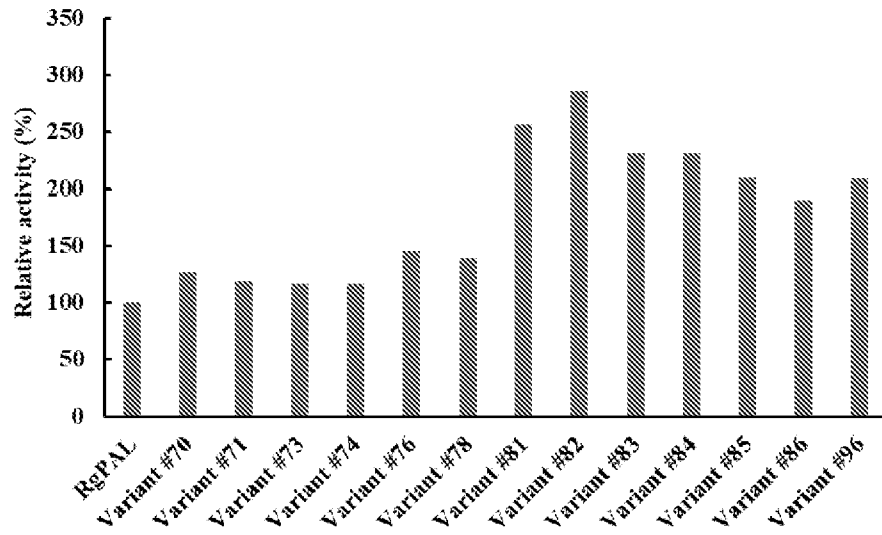


图 8
50°C

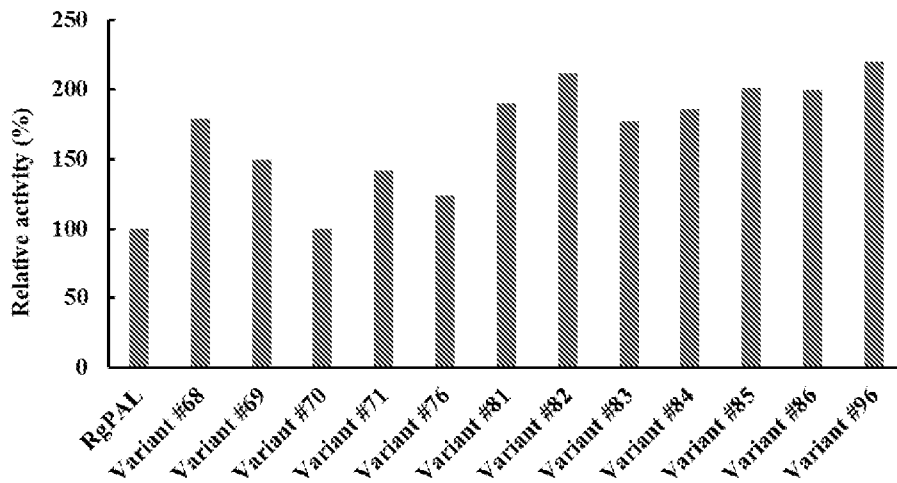


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/087182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/05(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; A61P 3/00(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N, C12P, A61P, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 苯丙氨酸解氨酶, 苯丙氨酸脱氨酶, 突变, 变体, 92, 肉桂酸, 苯丙酮尿症, Phenylalanine ammonia lyase, PAL, mutate, mutant, cinnamic acid, phenylketonuria; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NO: 2的序列检索, GenBank+EMBL+China Patent Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NO: 2.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106133144 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 16 November 2016 (2016-11-16) see claims 1-9, sequence 2, description, paragraph 102	1-2, 6-12 (all in part)
A	CN 102753566 A (BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.) 24 October 2012 (2012-10-24) see claim 1-75	1-2, 6-12 (all in part)
A	WO 2020013951 A1 (CODEXIS, INC.) 16 January 2020 (2020-01-16) see claims 1-43	1-2, 6-12 (all in part)
A	魏西羽 等 (WEI, Xiyu et al.). "半理性设计提高Anabaena variabilis来源的苯丙氨酸解氨酶的催化活性 (Semi-rational Design Improves the Catalytic Activity of Phenylalanine Ammonia Lyase from Anabaena variabilis)" <i>药学报 (Acta Pharmaceutica Sinica)</i> , 11 July 2022 (2022-07-11), pages 3669-3674, see abstract	1-2, 6-12 (all in part)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 July 2023		Date of mailing of the international search report 16 July 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/087182

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Zachary JS Mays et al. "Directed Evolution of <i>Anabaena variabilis</i> Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) Identifies Mutants with Enhanced Activities" <i>Chem Commun (Camb)</i> , 14 May 2020 (2020-05-14), pages 5255-5258, see abstract	1-2, 6-12 (all in part)

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions 1-3: claims 1-2 and 6-12 (all in part) relate to phenylalanine ammonia lyase mutants and related subject matter thereof, wherein amino acid sequences of the phenylalanine ammonia lyase mutants have amino acid mutations at sites K92, Q488 and Q576 respectively on the basis of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

Inventions 4-35: claims 3 and 6-12 (all in part) relate to phenylalanine ammonia lyase mutants and related subject matter thereof, wherein amino acid sequences of the phenylalanine ammonia lyase mutants have amino acid mutations at sites A13, N18, T28, S29, R77, I89, I127, S145, L151, T169, I184, K231, Q237, M239, T275, T279, T342, H376, S379, N399, N444, D513, E542, E544, A557, T560, S592, E606, A623, I624, A636 and I654 respectively on the basis of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4.

Inventions 36-40: claims 4 and 6-12 (all in part) relate to phenylalanine ammonia lyase mutants and related subject matter thereof, wherein amino acid sequences of the phenylalanine ammonia lyase mutants have amino acid mutations at sites K26, Y64, R177, R445 and K676 respectively on the basis of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

Inventions 41-45: claims 5-12 (all in part) relate to phenylalanine ammonia lyase mutants and related subject matter thereof, wherein amino acid sequences of the phenylalanine ammonia lyase mutants have amino acid mutations at sites R101, E124, H340, E341 and V344 respectively on the basis of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

According to paragraph 0016 and table 1 of the description of the present application, the ammonia lyase mutant shown in SEQ ID NO: 4 is a mutant obtained by mutation at the following sites: K92E, Q488E and Q576E on the basis of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. It can be seen that the common technical feature among the 45 inventions is: a mutant of a wild type phenylalanine ammonia lyase shown in SEQ ID NO: 2; however, the prior art (see CN 106133144 A, 16 November 2016, see claims 1-9 and SEQ ID NO: 2) discloses deletion, substitution, insertion or addition of a protein, which is formed by amino acid sequences of one or more amino acids and has phenylalanine ammonia lyase activity, in the amino acid sequence shown in SEQ IN NO: 2 of the present invention. It can be seen that the same technical feature among the 45 inventions is also disclosed in the prior art, and cannot be used as a special technical feature (i.e. a feature defining a contribution which the inventions make over the prior art). Therefore, inventions 1-45 do not have a same or corresponding special technical feature, do not fall within a single general inventive concept, lack unity of invention, and do not comply with PCT Rule 13.1.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-2 and 6-12 (all the subject matter which relates to mutation site K92)**

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/087182

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106133144	A	16 November 2016	WO	2015119251	A1	13 August 2015
				JPWO	2015119251	A1	30 March 2017
				JP	6796927	B2	09 December 2020
				US	2016362711	A1	15 December 2016
				US	10053716	B2	21 August 2018
				EP	3103877	A1	14 December 2016
				EP	3103877	A4	15 November 2017
				JP	2020174686	A	29 October 2020
CN	102753566	A	24 October 2012	ES	2690542	T3	21 November 2018
				CY	1120768	T1	11 December 2019
				EP	2531209	A2	12 December 2012
				EP	2531209	A4	03 July 2013
				EP	2531209	B1	20 April 2016
				ES	2582459	T3	13 September 2016
				DK	3025728	T3	29 October 2018
				PL	3025728	T3	31 December 2018
				JP	2013518893	A	23 May 2013
				JP	5828844	B2	09 December 2015
				CA	2782444	A1	11 August 2011
				CA	2782444	C	23 October 2018
				PT	3025728	T	05 November 2018
				SI	3025728	T1	30 November 2018
				US	2016362675	A1	15 December 2016
				US	10221408	B2	05 March 2019
				IL	221099	B	28 February 2018
				IL	257437	A	30 April 2018
				IL	257437	B	30 June 2019
				US	2013039898	A1	14 February 2013
				EP	3479842	A2	08 May 2019
				EP	3479842	A3	17 July 2019
				AU	2011212929	A1	21 June 2012
				AU	2011212929	B2	27 October 2016
				EP	4062928	A2	28 September 2022
				EP	4062928	A3	30 November 2022
				LT	3025728	T	25 October 2018
				US	2019345475	A1	14 November 2019
				US	11505790	B2	22 November 2022
				HUE	039516	T2	28 January 2019
				HRP	20181602	T1	30 November 2018
				HK	1225299	B	08 September 2017
EP	3025728	A1	01 June 2016				
EP	3025728	B1	08 August 2018				
WO	2011097335	A2	11 August 2011				
WO	2011097335	A3	20 October 2011				
WO	2020013951	A1	16 January 2020	CA	3105916	A1	16 January 2020
				IL	279916	A	01 March 2021
				JP	2021531749	A	25 November 2021
				US	2022056431	A1	24 February 2022
				SG	11202012198	QA	28 January 2021
				US	2020017845	A1	16 January 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/087182

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 11198861 B2	14 December 2021
		EP 3820833 A1	19 May 2021
		EP 3820833 A4	03 August 2022
<hr/>			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/05(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; A61P 3/00(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C12N, C12P, A61P, C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 苯丙氨酸解氨酶, 苯丙氨酸脱氨酶, 突变, 变体, 92, 肉桂酸, 苯丙酮尿症, Phenylalanine ammonia lyase, PAL, mutata, mutant, cinnamic acid, phenylketonuria; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NO:2的序列检索。</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 106133144 A (国立研究开发法人科学技术振兴机构) 2016年11月16日 (2016 - 11 - 16) 参见权利要求1-9、序列2、说明书第102段</td> <td>1-2、6-12 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102753566 A (生物马林药物股份有限公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 参见权利要求1-75</td> <td>1-2、6-12 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020013951 A1 (CODEXIS INC) 2020年1月16日 (2020 - 01 - 16) 参见权利要求1-43</td> <td>1-2、6-12 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>魏西羽 等. "半理性设计提高 <i>Anabaena variabilis</i> 来源的苯丙氨酸解氨酶的催化活性" 药学报, 2022年7月11日 (2022 - 07 - 11), 第3669-3674页, 参见摘要</td> <td>1-2、6-12 (均为部分)</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 106133144 A (国立研究开发法人科学技术振兴机构) 2016年11月16日 (2016 - 11 - 16) 参见权利要求1-9、序列2、说明书第102段	1-2、6-12 (均为部分)	A	CN 102753566 A (生物马林药物股份有限公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 参见权利要求1-75	1-2、6-12 (均为部分)	A	WO 2020013951 A1 (CODEXIS INC) 2020年1月16日 (2020 - 01 - 16) 参见权利要求1-43	1-2、6-12 (均为部分)	A	魏西羽 等. "半理性设计提高 <i>Anabaena variabilis</i> 来源的苯丙氨酸解氨酶的催化活性" 药学报, 2022年7月11日 (2022 - 07 - 11), 第3669-3674页, 参见摘要	1-2、6-12 (均为部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 106133144 A (国立研究开发法人科学技术振兴机构) 2016年11月16日 (2016 - 11 - 16) 参见权利要求1-9、序列2、说明书第102段	1-2、6-12 (均为部分)															
A	CN 102753566 A (生物马林药物股份有限公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 参见权利要求1-75	1-2、6-12 (均为部分)															
A	WO 2020013951 A1 (CODEXIS INC) 2020年1月16日 (2020 - 01 - 16) 参见权利要求1-43	1-2、6-12 (均为部分)															
A	魏西羽 等. "半理性设计提高 <i>Anabaena variabilis</i> 来源的苯丙氨酸解氨酶的催化活性" 药学报, 2022年7月11日 (2022 - 07 - 11), 第3669-3674页, 参见摘要	1-2、6-12 (均为部分)															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年7月5日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年7月16日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>吴汀晨</p> <p>电话号码 (+86) 010-62089319</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Zachary JS Mays 等. "Directed evolution of Anabaena variabilis phenylalanine ammonia-lyase (PAL) identifies mutants with enhanced activities" Chem Commun (Camb), 2020年5月14日 (2020 - 05 - 14), 第5255 - 5258页, 参见摘要	1-2、6-12 (均为部分)

第1栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的;
- b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

发明1-3: 权利要求1-2、6-12(均为部分), 分别涉及苯丙氨酸解氨酶突变体及其相关主题, 其氨基酸序列是在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的基础上, 在K92, Q488或Q576位中分别存在氨基酸突变;

发明4-35: 权利要求3、6-12(均为部分), 分别涉及苯丙氨酸解氨酶突变体及其相关主题, 其氨基酸序列是在SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的基础上, 在A13, N18, T28, S29, R77, I89, I127, S145, L151, T169, I184, K231, Q237, M239, T275, T279, T342, H376, S379, N399, N444, D513, E542, E544, A557, T560, S592, E606, A623, I624, A636或I654位中分别存在氨基酸突变;

发明36-40: 权利要求4、6-12(均为部分), 分别涉及苯丙氨酸解氨酶突变体及其相关主题, 其氨基酸序列是在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的基础上, 在K26, Y64, R177, R445或K676位中分别存在氨基酸突变;

发明41-45: 权利要求5-12(均为部分), 分别涉及苯丙氨酸解氨酶突变体及其相关主题, 其氨基酸序列是在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的基础上, 在R101, E124, H340, E341或V344位中分别存在氨基酸突变。

根据本申请说明书第0016段和表1可知, SEQ ID NO:4所示的解氨酶突变体是在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列基础上进行如下位点突变: K92E, Q488E和Q576E而获得的突变体。可见, 上述45组发明之间的共同技术特征是: 它们均为SEQ ID NO:2所示野生型苯丙氨酸解氨酶的突变体; 但是, 现有技术(参见CN 106133144 A, 2016-11-16, 参见权利要求1-9和SEQ ID NO:2)公开了在本发明SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列中, 缺失、置换、插入或增加一个或数个氨基酸的氨基酸序列形成的、并且具有苯丙氨酸脱氨酶活性的蛋白质。可见, 上述45组发明之间的相同技术特征也已经被现有技术所公开, 其不能作为特定技术特征(即发明对现有技术做出贡献的特征)。因此, 发明1-45之间不具有相同或相应的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 不具有单一性, 不符合PCT细则13.1的规定。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是: 1-2、6-12(均为涉及K92突变位点的主题)

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/087182

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106133144	A	2016年11月16日	WO	2015119251	A1	2015年8月13日
				JPWO	2015119251	A1	2017年3月30日
				JP	6796927	B2	2020年12月9日
				US	2016362711	A1	2016年12月15日
				US	10053716	B2	2018年8月21日
				EP	3103877	A1	2016年12月14日
				EP	3103877	A4	2017年11月15日
				JP	2020174686	A	2020年10月29日
				CN	102753566	A	2012年10月24日
CY	1120768	T1	2019年12月11日				
EP	2531209	A2	2012年12月12日				
EP	2531209	A4	2013年7月3日				
EP	2531209	B1	2016年4月20日				
ES	2582459	T3	2016年9月13日				
DK	3025728	T3	2018年10月29日				
PL	3025728	T3	2018年12月31日				
JP	2013518893	A	2013年5月23日				
JP	5828844	B2	2015年12月9日				
CA	2782444	A1	2011年8月11日				
CA	2782444	C	2018年10月23日				
PT	3025728	T	2018年11月5日				
SI	3025728	T1	2018年11月30日				
US	2016362675	A1	2016年12月15日				
US	10221408	B2	2019年3月5日				
IL	221099	B	2018年2月28日				
IL	257437	A	2018年4月30日				
IL	257437	B	2019年6月30日				
US	2013039898	A1	2013年2月14日				
EP	3479842	A2	2019年5月8日				
EP	3479842	A3	2019年7月17日				
AU	2011212929	A1	2012年6月21日				
AU	2011212929	B2	2016年10月27日				
EP	4062928	A2	2022年9月28日				
EP	4062928	A3	2022年11月30日				
LT	3025728	T	2018年10月25日				
US	2019345475	A1	2019年11月14日				
US	11505790	B2	2022年11月22日				
HUE	039516	T2	2019年1月28日				
HRP	20181602	T1	2018年11月30日				
HK	1225299	B	2017年9月8日				
EP	3025728	A1	2016年6月1日				
EP	3025728	B1	2018年8月8日				
WO	2011097335	A2	2011年8月11日				
WO	2011097335	A3	2011年10月20日				
WO	2020013951	A1	2020年1月16日	CA	3105916	A1	2020年1月16日
				IL	279916	A	2021年3月1日
				JP	2021531749	A	2021年11月25日
				US	2022056431	A1	2022年2月24日
				SG	11202012198	QA	2021年1月28日
				US	2020017845	A1	2020年1月16日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/087182

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		US	11198861	B2	2021年12月14日
		EP	3820833	A1	2021年5月19日
		EP	3820833	A4	2022年8月3日