

半理性设计提高 *Anabaena variabilis* 来源的苯丙氨酸解氨酶的催化活性

魏西羽¹, 冯翠月¹, 吕瑞杰¹, 樊帅², 杨兆勇^{2*}, 张志斐^{1*}

(1. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063200; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 可催化 *L*-苯丙氨酸生成反式肉桂酸, 广泛应用在制药、食品和农业等领域中, 尤其来源于多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 的 PAL (AvPAL) 是现有唯一治疗苯丙酮尿症的蛋白类药物。但较低的活性和较差的稳定性限制了 PAL 在工业中广泛的应用。本研究针对组成 AvPAL 底物结合腔的氨基酸, 通过点饱和和突变文库筛选获得了活性提高的突变体, 并通过定点突变探讨了 M222 位点对活性的影响。研究发现突变体 M222L 和 M222V 的 k_{cat} 值相比于 AvPAL 提高 90% 和 60%, 同时 k_{cat}/K_m 较 AvPAL 提高至 1.4 和 1.5 倍。结合分子对接结果显示, 突变体 M222L 和 M222V 通过增加底物结合腔的疏水性提高 AvPAL 的催化活性。本研究对于阐明 AvPAL 关键底物结合位点结构与活性的关系具有重要的意义。

关键词: 苯丙氨酸解氨酶; 饱和突变; 催化效率; 分子对接

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3669-06

Semi-rational design improves the catalytic activity of phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis*

WEI Xi-yu¹, FENG Cui-yue¹, LV Rui-jie¹, FAN Shuai², YANG Zhao-yong^{2*}, ZHANG Zhi-fei^{1*}

(1. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia lyase (PAL) can catalyze *L*-phenylalanine to produce *trans*-cinnamic acid, which is widely used in the fields of pharmacy, food and agriculture. In particular, phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis* (AvPAL) is the only protein drug for the treatment of phenylketonuria. However, the poor activity and low stability limit the application in industry of AvPAL. In this study, the key amino acids of substrate-binding cavity in AvPAL were identified by screening the single site saturation mutagenesis library. Subsequently, the impact of replacing M222 with the additional 19 amino acids on activity was also evaluated by site-directed mutagenesis. It was found that the k_{cat} values of mutants M222L and M222V were 90% and 60% higher than that of AvPAL, and the k_{cat}/K_m was 1.4 and 1.5 times as that of AvPAL. Molecular docking results revealed that the higher activity of M222L and M222V may be due to the increase of hydrophobicity favorable for the substrate-binding cavity. This study is important for elucidating the structure-function relationship of AvPAL.

Key words: phenylalanine ammonia lyase; saturation mutation; catalytic efficiency; molecular docking

收稿日期: 2022-05-25; 修回日期: 2022-06-07.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872782); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-055).

*通讯作者 E-mail: zhangzhifeifei7208@163.com;
zhaoyongy@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0631

苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU) 是由于苯丙氨酸羟化酶缺乏而影响苯丙氨酸代谢的一种遗传疾病^[1]。高苯丙氨酸血症会出现严重的神经和认知并发症, 最终导致癫痫发作和智力低下^[2,3]。现阶段, 饮食疗法可将血液中的苯丙氨酸浓度降至非神经毒性范围内, 但是, 很多 PKU 患者并不能始终严格遵守这些饮食

要求^[4], 因此, 开发替代饮食疗法的治疗药物已成为现阶段研究的焦点。1961年, Koukol等^[5]首次在植物中发现苯丙氨酸解氨酶 (EC 4.3.1.5, phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 以来, 越来越多的PAL基因已经从植物、真菌和原核生物中分离和鉴定出来, 如丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)^[6]、粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)^[7]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[8]、绿竹 (*Bambusa oldhamii*)^[9]、粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)^[10]等, 而来源于 *Anabaena variabilis* 的PAL (AvPAL) 经定点突变和聚乙二醇修饰, 已被证明是治疗效果最好、人体内稳定性最高的PAL^[11,12], 并于2018年被美国 Food and Drug Administration (FDA) 批准作为PKU的酶替代疗法^[13]。同时, PAL是苯丙烷类代谢途径的关键酶, 可催化L-苯丙氨酸非氧化脱氨生成反式肉桂酸^[14], 再进一步代谢转化为一类苯丙素类化合物, 如黄酮类、木质素、香豆素、植物抗毒素等^[15], 苯丙素因具有抗氧化、抗癌、抗动脉粥样硬化、抗炎和抗病毒等特性, 在医药和营养领域广泛应用而备受关注^[16]。同时, AvPAL催化反应为可逆反应, 也可以催化廉价的氨水和芳基丙烯酸绿色合成高价值的非天然氨基酸^[17], 从而具有在精细化工中广泛应用的潜力, 然而, AvPAL酶活显著低于真核生物来源的PAL^[18], 在一定程度上限制了该酶的应用。

大部分PAL均由4个相同的亚基形成四聚体发挥生物活性, 单个亚基均有辅因子4-甲基二烯-咪唑-5酮 (MIO), 其由高度保守的Ala-Ser-Gly三联体自环化脱水形成。虽然PAL的三维结构^[19]、酶学性质^[20-22]有了广泛的研究, 但其较低的催化效率和稳定性限制了PAL在制药和工业上的广泛应用^[23]。目前通过易错PCR^[24]、定点突变^[25]或PEG修饰^[26]提高了PAL的活性和稳定性, 但对于制药和精细化工所要求酶的性能还远远不够。因此, 对于PAL, 仍需要通过蛋白质工程手段来提高酶的性质以满足制药和精细化工工艺的要求。

本研究针对组成AvPAL底物结合腔的关键氨基酸构建点饱和突变文库, 筛选获得活性提高的突变体, 并优化了AvPAL大肠杆菌表达菌株, 再结合定点突变探讨M222位点对活性的影响, 最终获得具有更好催化性能的突变体。

材料与方法

菌株与试剂 菌株TOP10用于表达质粒的构建和克隆, 菌株 *E. coli* K12、*E. coli* BL21 (DE3)、Rosetta-gami2 (DE3)、ArcticExpress (DE3) pRARE2、Over-Express C43 (DE3)、Rosetta (DE3)、Origami2 (DE3)、BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL用于表达质粒的表达, 克隆和表达菌株购自美国 Agilent Technologies 或 Novagen

公司; 表达质粒pET-21a (+) 购自 Novagen 公司; 质粒提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、内切酶购自康润生物公司; 氨苄青霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生物工程有限公司; Co²⁺-NTA 填料购自日本 TaKaRa 公司; 30 K 超滤浓缩管购自美国 Millipore 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

构建点饱和突变文库和定点突变 来源于 *Anabaena variabilis* 的 AvPAL (NCBI: WP_011320679.1) 经密码子优化基因全合成 (华大基因), 经酶切连接得到表达质粒 pET-21AvPAL, 以此为模板, 设计兼并引物, 针对不同位点, 采用 ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning Kit (诺唯赞) 突变试剂盒进行实验。PCR 扩增反应体系为: 模板 DNA 1 μ L, buffer 25 μ L, dNTP (2 mmol·L⁻¹) 4 μ L, ddH₂O 17 μ L, KOD 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L。PCR 条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 68 °C 延伸 7 min。将构建的突变体质粒转入 *E. coli* K12, 从而得到单位点饱和突变文库。定点突变过程与上述流程一致, 点饱和突变引物和定点突变引物见表 1。

Table 1 Primers used in this study. M = A or C; N = A, C, G, or T; K = G or T

Primer name	Primer sequence (5'-3')
AvPAL-F	GAAGGAGATATACATATGAAAACCCCT GAGCCAGGCGC
AvPAL-R	GTGGTGGTGGTCTCGAGATGCAGG CACGGCAGAATA
L104-F	TGCAGACCAATNNKGTGTGGTTTCT
L104-R	AGAAACCACACMNNATTGGTCTGCA
L108-F	TGGTGTGGTTTNNKAAAACCGGCGC
L108-R	GCGCCGGTTTTMNNAAACCACACCA
L219-F	CGAAAGAAGGCNNKGCATGATGAA
L219-R	TTCATCATCGCMNNGCCTTCTTTCG
M222-F	GCCTGGCGATGNNKAAACGGCACCAG
M222-R	CTGGTGCCGTTMNNCATCGCCAGGC
N223-F	TGGCGATGATGNNKGGCACCAGCGT
N223-R	ACGCTGGTGCCMNNCATCATCGCCA
N451-F	CGGAACAGTTTNNKAGAACATTAA
N451-R	TTAATGTTCTGMNNAACTGTTCCG
F363-F	ATGGCGGCAACNNKCTGGGCCAGTA
F363-R	TACTGGCCAGMNNGTGCCGCCAT

突变文库筛选 利用 AvPAL 催化活性偶联菌株生长的高通量筛选已被报道^[24], 具体过程如下: 在缺乏氮源的基础培养基上添加苯丙氨酸, *E. coli* K12 菌株无法生长, 而 AvPAL 可催化苯丙氨酸生成反式肉桂酸和 NH₄⁺, *E. coli* K12 可利用 NH₄⁺ 作为氮源生长, 因此 AvPAL 及其突变体催化活性高低可与菌株生长 A₆₀₀ 值偶联, 通过 96 孔板筛选可以获得活性提高的突变体。

AvPAL 及其突变体的表达与纯化 经测序验证正确的质粒转化到 OverExpress C43 (DE3) 中, 并于

LB 固体培养基上 37 °C 过夜培养, 挑选菌落接种到 2 mL 含氨苄霉素 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LB 培养基中, 37 °C 下 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜活化, 把活化后的菌液按照 1:100 比例接种到含有氨苄霉素 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 下培养至吸光度值为 0.4~0.6 时, 加入终浓度为 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达, 16 °C 下继续振荡培养 16 h; 4 °C、6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体, 并在裂解缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 8.0) 中用高压均质器进行破碎, 在 4 °C、6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min 后将上清液通过 0.45 μm 的过滤膜, 装入平衡好的 Co^{2+} -NTA 亲和柱中, 用冲洗缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.4) 冲洗, 再用洗脱液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 8.0) 洗脱目的蛋白。使用超滤浓缩管将含有 AvPAL 的组分汇集并浓缩至 1 mL。所有突变体的纯度通过 12.5% 的 SDS-PAGE 电泳分析, 并用考马斯亮蓝 R250 染色。以牛血清白蛋白为标准, 采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

AvPAL 及其突变体酶活性测定 酶催化反应体系为 450 μL , 将 5 μg 蛋白加入到含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯丙氨酸的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 中, 40 °C 反应 5 min, 加入 50 μL TCA 终止反应, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 于紫外分光光度计下 290 nm 处测量吸光度值, 并通过标准曲线确定生成肉桂酸的量, 计算 PAL 酶活。每分钟催化生成 1 μmol 反式肉桂酸所需的 PAL 量定义为 1 U。

AvPAL 及其突变体酶动力学测定 为评估酶的动力学参数 K_m 和 k_{cat} , 以溶于 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH

7.5) 的 10~20 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯丙氨酸作为底物, 分别与适当稀释的酶液反应, 测定酶活性, 利用 GraphPad Prism 8.0 中 Michaelis-Menten 非线性拟合作图法计算 K_m 和 V_{max} 值, 并通过测定的蛋白浓度计算出对应的 k_{cat} 。

AvPAL 及其突变体最适反应温度与最适 pH 配制 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液, 7.0、7.5、8.0、8.5 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液, 9.0、9.5、10.0 和 10.5 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钠缓冲液, 在 40 °C, 不同 pH 条件下反应 5 min, 以最高活性为 100%, 计算相对酶活性以确定酶的最适反应 pH。将适量酶液与底物在不同温度 (30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 和 100 °C) 反应 5 min, 以最高活性为 100%, 测定相对酶活, 以确定酶反应的最适温度。

AvPAL 分子对接 分子对接由 AutoDock Vina^[27] 完成, 以 AvPAL (PDB: 2NYN) 为目标蛋白, 将小分子 L-苯丙氨酸对接至底物结合腔, 选取合适构象进行分析。三维结构图片由 PyMOL (www.pymol.org) 绘制。

结果与讨论

1 突变位点的选择及突变体库的建立和筛选

AvPAL 三维结构中不对称单位包含两个二聚体, 经两个对称操作后形成完整的四聚体结构 (图 1A), 分子对接结果显示, 组成 L-苯丙氨酸的底物结合腔的氨基酸有: L104、L108、L219、M222、N223、F363 和 N451 (图 1B), 一般认为组成底物结合腔的氨基酸会明显影响蛋白活性, 因此选择上述 7 个位点进行点饱和突变研究。

建立不同位点的饱和突变文库利用 96 孔板进行筛选, 菌体 A_{600} 值越大预示突变体的酶活越高^[24]。通

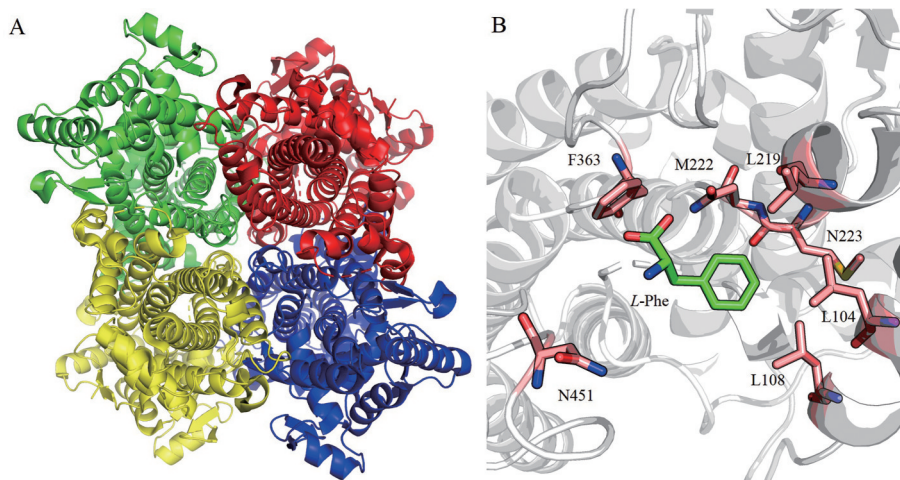


Figure 1 The crystal structures (A) and substrate binding cavity (B) of phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis* (AvPAL). A: AvPAL contains four chains in crystal asymmetric unit, and are colored in green, red, blue, and yellow for the subunits, respectively; B: Residues in substrate and its binding cavity of AvPAL are shown in sticks

过酶标仪测定 96 孔板每孔在 600 nm 下的吸光度值, 获得突变库中活力提高的突变体, 7 个突变体库中得到的阳性突变体经华大基因有限公司测序后, 确定其具体信息如下: 突变体 M222-23, 将 222 位 M 突变为 N, 命名为突变体 M222N; 突变体 M222-67 和 M222-122, 将 222 位 M 突变为 L, 命名为突变体 M222L; 突变体 N451-16, 将 451 位 N 突变为 A, 命名为突变体 N451A。

将上述所有测序验证的突变体, 经过重新上摇瓶发酵破碎纯化得到对应蛋白后, 经体外酶活测定, 最终确定突变体 M222L 和 M222N 的活性均分别提高了 60% 和 23%, 而突变体 N451A 的活性在体外测活实验中无提高, 因此后续实验不对其进行研究, 鉴于 M222 位点在 96 孔板筛选可能会有遗漏, 针对 M222 位点分别做定点突变, 探究 M222 位点各个突变体对活性的影响。

2 大肠杆菌表达菌株的优化

因常规大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 表达 AvPAL 大部分为包涵体 (数据未显示), 不利于后续实验, 因此考察了 *E. coli* BL21 (DE3)、Rosetta-gami2 (DE3)、ArcticExpress (DE3) pRARE2、OverExpress C43 (DE3)、Rosetta (DE3)、Origami2 (DE3)、BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 不同菌株表达 AvPAL 的情况, 在 20 °C 和 0.2 mmol·L⁻¹ IPTG 浓度的条件下, 低温诱导 12 h, 离心收集菌体, 破碎纯化后, 同体积取样进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示 (图 2), OverExpress C43 (DE3) 的可溶性表达量最高, 达 2 mg·L⁻¹, 因此, 本实验后续选择 OverExpress C43 (DE3) 作为表达菌株。

3 M222 位点的饱和突变

针对 M222 位点对活性的影响, 通过定点突变探究 M222 位点对活性的影响, 初步获得此位点突变为其余 19 种氨基酸的活性数据, 如图 3 所示, M222 位点突变为任意氨基酸的活性均能保持在 65% 以上, 其中突变体 M222L、M222I、M222N 和 M222V 的活性相较于 AvPAL 分别提高了 60%、4%、23%、16%。

4 AvPAL 及其突变体酶学性质研究

突变体 M222L、M222V、M222I 和 M222N 的酶动力学实验结果 (表 2) 显示, 突变体 M222L、M222V、M222I 和 M222N 的 k_{cat} 值相比于 AvPAL 提高 90%、60%、40% 和 90%, 但突变体的 K_{m} 值均不同程度的提高, 表示突变体对底物的亲和力有所下降, 最终突变体 M222L 和 M222V 的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 是 AvPAL 的 1.4、1.5 倍。

对突变体 M222L 和 M222V 的酶学性质进行了研究, 如图 4A 所示, AvPAL 和突变体 M222L 的最适 pH 值为 7.5, 而突变体 M222V 的最适 pH 值为 8.5; AvPAL 和突变体 M222L 的最适反应温度为 55 °C (图 4B), 突变体 M222V 的最适反应温度提高 5 °C, 达到 60 °C, 并

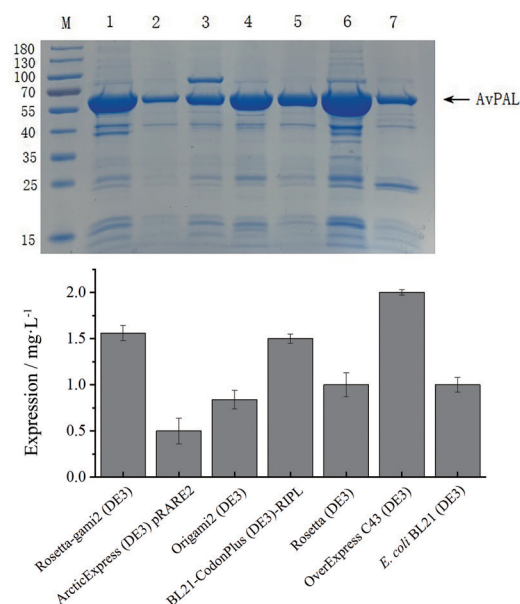


Figure 2 The recombinant AvPAL expressed in different strains of *E. coli*. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 3$). M: Marker; 1: Rosetta-gami2 (DE3); 2: ArcticExpress (DE3) pRARE2; 3: Origami2 (DE3); 4: BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL; 5: Rosetta (DE3); 6: OverExpress C43 (DE3); 7: *E. coli* BL21 (DE3)

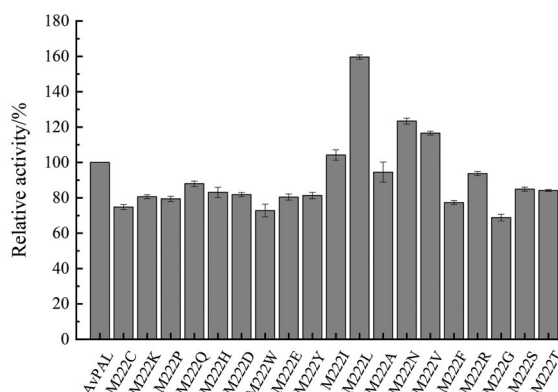


Figure 3 The activity of mutants of M222. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 3$)

Table 2 Kinetic parameters of AvPAL and its mutants

Enzyme	k_{cat}/s^{-1}	$K_{\text{m}}/mmol\cdot L^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}/s^{-1}\cdot(mmol\cdot L^{-1})^{-1}$
AvPAL	1.39	0.66	2.1
M222L	2.59	0.89	2.9
M222V	2.21	0.68	3.2
M222I	1.99	1.42	1.4
M222N	2.69	1.63	1.7

且在 50~75 °C 内维持较高的活性, 在 75 °C 时, 突变体 M222V 能维持 89% 的残余活性, 而 AvPAL 为 71%。

5 AvPAL 分子对接及突变体结构分析

AvPAL 的晶体结构已被解析^[18], 晶体结构显示, AvPAL 有 4 个亚基 (亚基 A~D), 4 个亚基结合稳定组

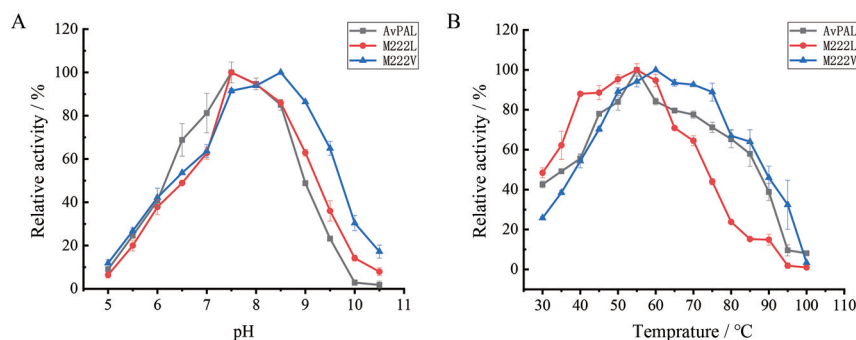


Figure 4 Effects of pH (A) and temperature (B) on AvPAL and its mutants. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 3$)

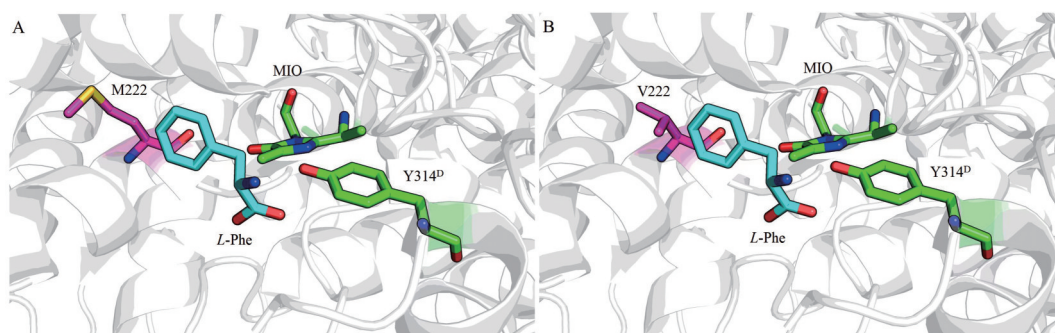


Figure 5 Molecular docking analysis of interactions between AvPAL, variant M222V and substrate *L*-Phe

成一个寡聚体 (图 1A), 活性中心由辅因子 MIO 和 Y314 组成, 其中 MIO 来自亚基 A, 而 Y314 来自亚基 D (图 5), 由此, 四聚体 AvPAL 具有 4 个活性中心。尽管 AvPAL 的晶体已被报道多年, 但 AvPAL 与底物 *L*-苯丙氨酸的复合结构未见报道, 因此采用分子对接的方式将底物 *L*-苯丙氨酸对接到 AvPAL 活性腔。分子对接结果显示, *L*-苯丙氨酸苯基在由 T102、L108、G218 和 M222 组成的结合腔内, 并且第 102 位的苏氨酸突变为疏水性的脯氨酸, 提高了 AvPAL 的活性^[28], 而本研究中, 将第 222 位的蛋氨酸突变为疏水性氨基酸 (缬氨酸和亮氨酸), 增加了与苯丙氨酸苯基的疏水相互作用, 从而提高了突变体的活性。

结论

来源于 *Anabaena variabilis* 的 AvPAL 是 2018 年被美国 FDA 批准的唯一用于治疗 PKU 的酶类药物, AvPAL 和目前已大量报道的植物^[29]及酵母^[30]等真核生物来源的苯丙氨酸脱氨酶在活性中心的结构上高度保守, 催化部位都是由 Ala-Ser-Gly 经环化脱水形成的 MIO 基团和一个含有 Tyr 的高度柔性的 loop 区组成。在三维结构上, 真核生物来源的 PAL 与 AvPAL 的 C 端多一段多螺旋区域, 此区域不稳定且对蛋白酶敏感^[31], 因此 AvPAL 的稳定性和抗降解能力要比真核生物来源的 PAL 更好, 但 AvPAL 的催化速度要比真核来源的 PAL 低。

本研究利用 PAL 分解苯丙氨酸生成 NH_4^+ , 可作为大肠杆菌生长氮源的筛选方法, 偶联点饱和突变文库, 筛选获得了可提高 AvPAL 活性的位点, 并结合定点突变探究了 AvPAL 结合底物苯丙氨酸的关键位点 M222 对反应活性的影响, 结果显示, 突变体 M222L 和 M222V 的 k_{cat} 值分别为 AvPAL 的 1.9 和 1.6 倍, 通过分子对接分析, M222 处于底物 *L*-Phe 的苯基结合部位, 由极性氨基酸突变为疏水氨基酸, 有利于苯丙氨酸锚定于结合腔, 从而提高了催化效率。

作者贡献: 魏西羽撰写了论文; 魏西羽、冯翠月、吕瑞杰完成了实验; 魏西羽、樊帅分析了实验数据; 杨兆勇、张志斐负责设计本项实验; 全部作者均阅读并参与修改了本文。

利益冲突: 本文的作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Pereira de Sousa I, Gourmel C, Berkovska O, et al. A microparticulate based formulation to protect therapeutic enzymes from proteolytic digestion: phenylalanine ammonia lyase as case study [J]. *Sci Rep*. 2020, 10: 3651.
- [2] Levy HL, Sarkissian CN, Scriver CR. Phenylalanine ammonia lyase (PAL): from discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria [J]. *Mol Genet Metab*. 2018, 124: 223-229.
- [3] Durrer KE, Allen MS, Hunt von Herbing I. Genetically engineered probiotic for the treatment of phenylketonuria (PKU); assessment of a novel treatment *in vitro* and in the PAHenu2

- mouse model of PKU [J]. PLoS One, 2017, 12: e0176286.
- [4] Kang TS, Wang L, Sarkissian CN, et al. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria [J]. Mol Genet Metab, 2010, 99: 4-9.
- [5] Koukol J, Conn EE. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare* [J]. J Biol Chem, 1961, 236: 2692-2698.
- [6] Song J, Wang ZZ. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36: 939-952.
- [7] Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW. Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals [J]. J Biol Chem, 1976, 251: 4646-4650.
- [8] Wanner LA, Li G, Ware D, et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 327-338.
- [9] Hsieh LS, Hsieh YL, Yeh CS, et al. Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL1*) from *Bambusa oldhamii* [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 283-290.
- [10] Sikora LA, Marzluf GA. Regulation of *L*-phenylalanine ammonia-lyase by *L*-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa* [J]. J Bacteriol, 1982, 150: 1287-1291.
- [11] Zhang F, Huang N, Zhou L, et al. Modulating the pH activity profiles of phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis* by modification of center-near surface residues [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 183: 699-711.
- [12] Longo N, Harding CO, Burton BK, et al. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial [J]. Lancet, 2014, 384: 37-44.
- [13] Kawatra A, Dhankhar R, Mohanty A, et al. Biomedical applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: current status and future prospects [J]. Biochimie, 2020, 177: 142-152.
- [14] Wang ZY, Huang LQ, Yuan Y, et al. Antibody preparation and enzyme linked immunosorbent assay of *Lonicera japonica* phenylalanine ammonia lyase [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1498-1502.
- [15] Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1085-1097.
- [16] Cui PW, Zhong WH, Qin Y, et al. Characterization of two new aromatic amino acid lyases from actinomycetes for highly efficient production of *p*-coumaric acid [J]. Bioproc Biosyst Eng, 2020, 43: 1287-1298.
- [17] Weise NJ, Ahmed ST, Parmeggiani F, et al. Zymophore identification enables the discovery of novel phenylalanine ammonia lyase enzymes [J]. Sci Rep, 2017, 7: 13691.
- [18] Wang L, Gamez A, Archer H, et al. Structural and biochemical characterization of the therapeutic *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase [J]. J Mol Biol, 2008, 380: 623-635.
- [19] Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis [J]. Biochemistry, 2004, 43: 11403-11416.
- [20] Zhu LB, Zhou L, Cui WJ, et al. Mechanism-based site-directed mutagenesis to shift the optimum pH of the phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis* JN-1 [J]. Biotechnol Rep (Amst), 2014, 3: 21-26.
- [21] Bencze LC, Filip A, Bánóczy G, et al. Expanding the substrate scope of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum* towards styrylalanines [J]. Org Biomol Chem, 2017, 15: 3717-3727.
- [22] Lovelock SL, Turner NJ. Bacterial *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase: a biocatalyst with broad substrate specificity [J]. Bioorg Med Chem, 2014, 22: 5555-5557.
- [23] Zhu LB, Cui WJ, Fang YQ, et al. Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis* [J]. Biotechnol Lett, 2013, 35: 751-756.
- [24] Mays ZJ, Mohan K, Trivedi VD, et al. Directed evolution of *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia-lyase (PAL) identifies mutants with enhanced activities [J]. Chem Commun (Camb), 2020, 56: 5255-5258.
- [25] Tomoiagă RB, Tork SD, Horváth I, et al. Saturation mutagenesis for phenylalanine ammonia lyases of enhanced catalytic properties [J]. Biomolecules, 2020, 10: 838.
- [26] Sarkissian CN, Gámez A, Wang L, et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105: 20894-20899.
- [27] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31: 455-461.
- [28] Trivedi VD, Chappell TC, Krishna NB. In-depth sequence-function characterization reveals multiple pathways to enhance enzymatic activity [J]. ACS Catal, 2022, 12, 2381-2396.
- [29] Ritter H, Schulz GE. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. Plant Cell, 2004, 16: 3426-3436.
- [30] Bazukian IL, Vardanian AE, Ambartsumian AA, et al. Catalytic properties of *Rhodotorula aurantiaca* KM-1 phenylalanine ammonia-lyase [J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2009, 45: 23-27.
- [31] Pilbak S, Tomin A, Retej J, et al. The essential tyrosine-containing loop conformation and the role of the C-terminal multi-helix region in eukaryotic phenylalanine ammonia-lyases [J]. FEBS J, 2006, 273: 1004-1019.