

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

Etapa 1: Mutageneza direcționată pe situs a fenilalanină amoniac liazei din *Petroselinum crispum* (*PcPAL*)

Activitatea 1.1. Selectarea resturilor de aminoacizi din structura cristalină a *PcPAL* care vor fi modificate prin mutageneză situs-direcționată și proiectarea amorselor mutagenice (primeri) pentru aceste resturi de aminoacizi

Inițial s-au selectat resturi de Phe (pentru imobilizarea situs-specifică a *PcPAL* prin încorporarea unui aminoacid nenatural – *p*-azido-Phe) și Ser (pentru imobilizarea situs-specifică prin cuplare maleimidă-tiol) din structura cristalină a *PcPAL* (PDB 1W27), accesibile, situate la suprafața enzimei și departe de situsul catalitic al acesteia (**Fig. 1**). Pentru pozițiile selectate s-au proiectat amorse mutagenice (**Tabelul 1**) pentru realizarea mutațiilor punctiforme Phe → Stop și respectiv Ser → Cys.

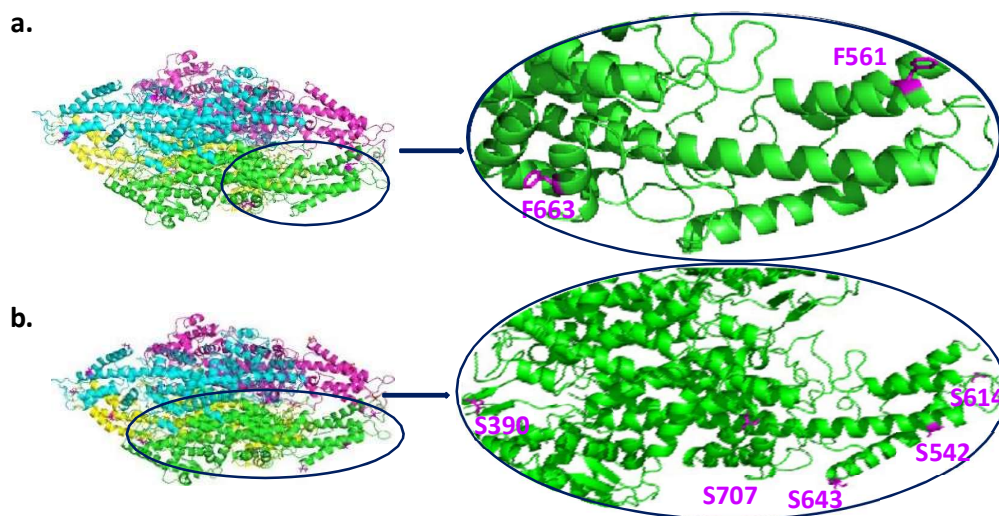


Figura 1. Resturile de aminoacizi selectate pentru mutageneză direcționată pe situs: **a)** Phe selectate pentru schimbarea în codonul Stop TAG. **b)** Ser selectate pentru schimbarea în Cys

Tabelul 1. Lista mutațiilor *PcPAL* proiectați și secvențele nucleotidice ale amorselor mutagenice corespunzătoare

Nr. crt.	Mutant	Secvență amorse mutagenice (5'-3')
Imobilizarea situs-specifică prin încorporarea <i>p</i>-Az-Phe		
1	<i>PcPAL</i> F561Stop	F561Stop/FP: CCTCCAGATAGTGCGAAAAGGACTTGTTGAGAGTAGTAGACAGAG
		F561Stop/RP: TTCGCACTATCTGGAGGGATGCAATTCTCCGTTTACTCC
2	<i>PcPAL</i> F663Stop	F663Stop/FP: GTACAAGTAGGTAAGAAAGGAATTGGGAAGTGAATACTTG
		F663Stop/RP: CCTTCTTACCTACTGTACAAGGGGTAGGATCTGC

Imobilizarea situs-specifică prin cuplare maleimidă-tiol		
3	<i>PcPAL S390C</i>	S390C/FP: GACGTATGCAGAAACAAGGCCATTTCATGGAG S390C/RP: GTTCTGCATACGTCAATCAAGGGGTTGTGC
4	<i>PcPAL S542C</i>	S542C/FP: GTATCCTGCGTAGCCAAGAGAGTATTGACTATGGG S542C/RP: GCTACGCAGGATACAGTGTTCCTTACAGTGGAC
5	<i>PcPAL S614C</i>	S614C/FP: GTCCACTTGCATTTCCAGAAGATTGCCACTTTCGAAG S614C/RP: GGAAAATGCAAGTGGACAAGTTTCTTTCGTTGTCTCCG
6	<i>PcPAL S643C</i>	S643C/FP: CTTGGAATGCGGAAACCCCGCCATTCCCAACAG S643C/RP: GTTCCGCATTCCAAGGCGGCTCTGGCGG
7	<i>PcPAL S707C</i>	S707C/FP: CTTGGAATGCTGGAACGGAGCCCCCTTGCC S707C/RP: GTTCCAGCATTCCAAGGATTCCAACAAGGGGTCAATAATTC

Activitatea 1.2. Optimizarea reacției în lanț a polimerazei (PCR) pentru mutageneza situs-direcționată a *PcPAL*

Mutageneza situs-direcționată s-a realizat în toate cazurile prin experimente PCR (Fig. 2) conform protocoalelor existente.^{1,2} În cazul variantelor mutante *PcPAL S542C*, *PcPAL S643C*, *PcPAL S707C* experimentele inițiale PCR au eșuat și a fost necesară optimizarea reacției PCR. S-au variat următorii parametri: concentrația amorselor mutagenice, concentrația ADN-ului matrită (plasmida pET-19b conținând gena *PcPAL*, dezvoltată în cadrul centrului de cercetare), temperatura de atașare a amorselor (T_a) și s-a testat efectul unor aditivi (DMSO).

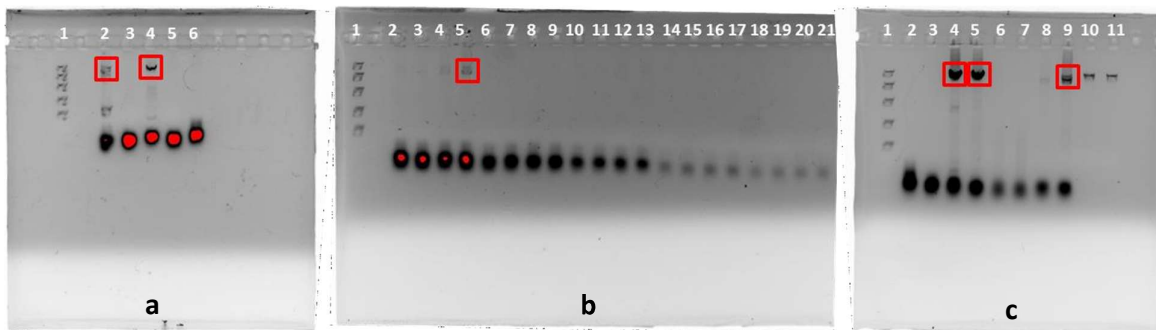


Figura 2. Geluri de agaroză pentru verificarea reacțiilor de PCR: **a)** 1 – marker de ADN (10000, 4000, 2000, 1000, 500 bp), 2 – *PcPAL S390C* (7817 bp), 3 – *PcPAL S542C*, 4 – *PcPAL S614C* (7817 bp), 5 – *PcPAL S643C*, 6 – *PcPAL S707C*; **b)** Optimizarea reacției de PCR pentru gena mutantă *PcPAL S707C*: 1 – marker de ADN (10000, 4000, 2000, 1000, 500 bp), 2-5: 3 μ M amorse, 6-9: 2 μ M amorse, 10-13: 1 μ M amorse, 14-17: 0.5 μ M amorse, 18-21: 0.3 μ M amorse; T_a : 2, 6, 10, 14, 18: 58.6 °C; 3, 7, 11, 15, 19: 62.6 °C; 4, 8, 12, 16, 20: 66.9 °C; 5, 9, 13, 17, 21: 70.4 °C; 5 -*PcPAL S707C* (7817 bp): 3 μ M amorse, T_a =70.4 °C; **c)** Optimizarea reacției de PCR pentru genele mutante *PcPAL S542C* (2-5) și *PcPAL S643C* (6-9): 1 – marker de ADN (10000, 4000, 2000, 1000, 500 bp), T_a : 58.6 °C (2, 6), 62.6 °C (3, 7), 66.9 °C (4, 8), 70.4 °C (5, 9); 4,5 – *PcPAL S542C* (7817 bp), 9 – *PcPAL S643C* (7817 bp), 10,11 – controale pozitive: gena *wtPcPAL*.

Activitatea 1.3. Transformarea produsului PCR în celule competente *E. coli* XL1-Blue și testarea coloniilor rezultate

Prođușii PCR au fost supuși digestiei cu enzima de restricție DpnI și transformați prin șoc termic în celule competente *E. coli* XL1-Blue. După transformare, celulele au fost crescute pe plăci de agar conținând antibioticele corespunzătoare pentru selecție (50 μg/mL carbenicilină pentru plasmidă și 10 μg/mL tetraciclină pentru celula gazdă) iar coloniile rezultate au fost testate prin PCR de colonii utilizând amorsele: T7_prom: **5'AATACGACTCACTATAGGGGAATTG3'** și PcPAL_term: **5'CCCAAGGGGTTATGCTAGTT3'** (Fig. 3). Prezența în celule a plasmidei care poartă gena mutantă de interes a fost verificată prin PCR de colonii.

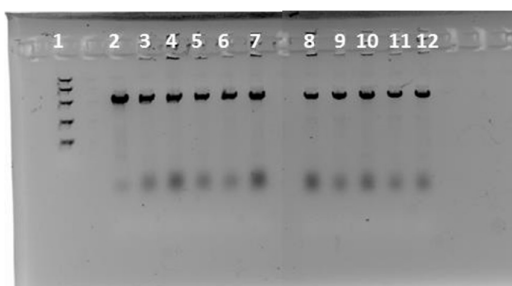


Figura 3. Gel de agaroză pentru experimentul de PCR de colonii confirmând prezența genelor de interes (2162 bp) PcPAL S542C (2-7) și PcPAL S707C (8-12) în coloniile celulare rezultate în urma transformării produșilor de PCR în celule competente *E. coli*

Activitatea 1.4. Extracția ADN-ului plasmidic din coloniile celulare pozitive și secvențierea genei PcPAL

Coloniile celulare pozitive au fost utilizate pentru realizarea unor culturi celulare din care s-a extras ADN-ul plasmidic. Plasmidele au fost secvențializate pentru verificarea prezenței mutației în gena enzimei (Fig. 4). Cu excepția mutației PcPAL S643C, toate celelalte 6 mutații au fost confirmate prin secvențializarea genelor PcPAL din plasmidele extrase.

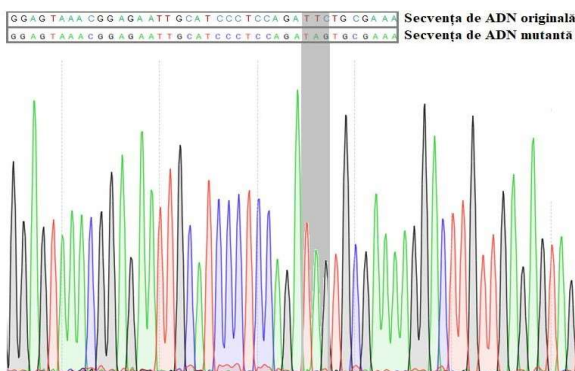


Figura 4: Cromatograma obținută la secvențializarea genei mutante PcPAL F561Stop.

Rezultatele Etapei 1: S-au obținut 6 plasmide care conțin genele PcPAL cu mutațiile punctiforme

selectate pentru imobilizarea situs-specifică a enzimei

Etapa 2: Exprimarea, purificarea și imobilizarea covalentă situs-specifică a enzimelor PAL mutante

Activitatea 2.1. Transformarea/co-transformarea plasmidelor în celule competente *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS / *E. coli* C321.ΔA și testarea coloniilor rezultate

Pentru încorporarea cu succes a *p*-azido-Phe (pAzF) în structura PcPAL este necesară o pereche tARN-aminoacil-tARN sintetaza bioortogonală (codificată de plasmida pEVOL-pAzF), capabilă să introducă aminoacidul nenatural la codonul stop TAG introdus în gena PcPAL prin mutagenză direcționată pe situs, în poziții bine alese (F561 și F663). Co-transformarea plasmidelor necesare (pEVOL-pAzF și pET-19b conținând gena mutantului PcPAL) a fost testată în 2 tipuri de celule gazdă: celule *E. coli* C321.ΔA (care au toți codoni stop endogeni UAG înlocuiți cu UAA și lipsește gena factorului de eliberare 1 specific codonului UAG dar lipsește și gena pentru T7 ARN polimeraza necesară exprimării enzimei PcPAL, fiind necesară în acest caz o a treia plasmidă care codifică gena acesteia, pCS6) și celule *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Introducerea plasmidelor în celule s-a realizat cu succes prin electroporare (în cazul celulelor *E. coli* BL21(DE3)pLysS) și transformare secvențială prin șoc termic (în cazul celulelor *E. coli* C321.ΔA) și a fost confirmată prin experimente de PCR de colonii.

Plasmidele pET-19b conținând genele variantelor mutante ale enzimei PcPAL (PcPAL S390C, PcPAL S542C, PcPAL S614C și PcPAL S707C) au fost transformate în celule competente *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS prin șoc termic. După transformare, celulele au fost crescute pe plăci de agar conținând antibioticele corespunzătoare pentru selecție (50 μg/mL carbenicilină pentru plasmidă și 34 μg/mL cloramfenicol pentru celula gazdă) iar coloniile rezultate au fost utilizate pentru realizarea de culturi stoc în soluție de glicerol 20% pentru păstrarea la -80 °C.

Activitatea 2.2. Izolarea și purificarea enzimelor PAL mutante; testarea activității enzimatică

Izolarea și purificarea variantelor mutante PcPAL F561Stop și F663Stop s-a realizat conform protocolului descris în literatură^{3,4} însă nici în urma optimizărilor (testarea mai multor celule gazdă, a concentrației de inductor – arabinoză sau a condițiilor de creștere celulară) nu s-au obținut proteine active. Se observă în analizele SDS-PAGE și Western-Blot obținerea unor benzi intense cu masă moleculară mai mică decât a enzimei PcPAL (**Figura 5**). În continuare ne-am axat pe imobilizarea situs-specifică a enzimei PAL prin cuplare tiol-maleimidă.

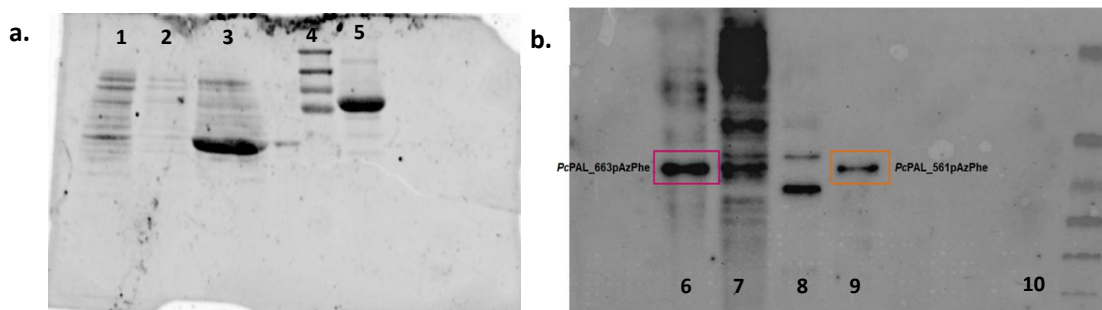


Figura 5. a. Gelul SDS-PAGE obținut la purificarea enzimei *PcPAL* F663Stop din celule *E. coli* C321.ΔA. **1:** lizat, **2:** flow-through, **3:** fracția eluată, **4:** marker de masă moleculară (250, 130, 100, 70 kDa), **5:** control pozitiv – *wt-PcPAL* (78 kDa); **b.** Analiza Western-blot a probelor din diferite etape de izolare ale proteinelor PAL mutante. **6:** enzima izolată din celule *E. coli* BL21; **7:** lizat celular – *E. coli*. BL 21; **8:** control pozitiv – *wt-PcPAL*; **9:** enzima izolată din celule C321ΔA; **10:** marker proteic (40, 55, 70, 100, 130, 250 kDa).

Izolarea și purificarea celor 4 variante mutante ale enzimei *PcPAL*, conținând mutațiile Ser→Cys s-a realizat conform protocolului optimizat anterior.⁵ S-au realizat preculti prin inocularea a 50 mL mediu de cultură LB (Luria-Bertani) steril, conținând carbenicilină (50 μg/mL) și cloramfenicol (34 μg/mL), cu celulele *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS care conțin plasmida pET-19b cu genele *PcPAL* mutante și incubare la 37 °C sub agitare (200 rpm) peste noapte. Din preculti s-a inoculat 2% (v/v) în culturi de 4 x 500 mL mediu LB steril și s-a lăsat la agitat la 200 rpm la 37 °C până la atingerea densității optice OD₆₀₀ de 0.6-0.8 (măsurată spectrofotometric la 600 nm). Apoi s-a realizat inducția cu IPTG (izopropil-β-D-tiogalactozidă), pentru exprimarea enzimelor de interes, prin adăugarea de IPTG la mediul de cultură până la concentrația de 0.2 mM; ulterior, cultura s-a lăsat la agitat la 200 rpm la 25 °C peste noapte. Celulele au fost recoltate prin centrifugare (25 min, 6000 rpm) și supuse lizei celulare printr-o metodă combinată, care utilizează liza enzimatică cu lizozim și mecanică prin ultrasonicare. După îndepărtarea resturilor celulare prin centrifugare supernatantul a fost trecut peste o coloană cromatografică de afinitate de tip Ni-NTA-agaroză pentru purificarea proteinelor de interes. Puritatea enzimelor obținute a fost verificată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE) iar concentrația a fost determinată cu metoda Bradford.

Activitatea enzimatică a celor 4 mutanți *PcPAL* a fost măsurată spectrofotometric prin urmărirea în timp a reacției de eliminare a amoniacului din L-fenilalanină (L-Phe) la 290 nm, lungime de undă la care produsul acestei reacții, acidul *trans*-cinamic (TCA), prezintă un maxim de absorbție și comparată cu cea a enzimei native *wt-PcPAL* (**Tabelul 2**).

Tabel 2. Activități enzimatiche specifice și relative ale mutațiilor PcPAL purificați

Activitate enzimatică specifică (μmol/(mg E*min))	Activitate enzimatică relativă (%)	Enzima
0.296	103.88	PcPAL S390C
0.279	97.86	PcPAL S542C
0.263	92.03	PcPAL S614C
0.332	116.20	PcPAL S707C
0.285	100	wt-PcPAL

Variantele mutante ale enzimei PcPAL au fost comparate cu enzima nativă și sub aspectul conversiei reacțiilor de eliminare și aditie a amoniacului (**Figura 6**).

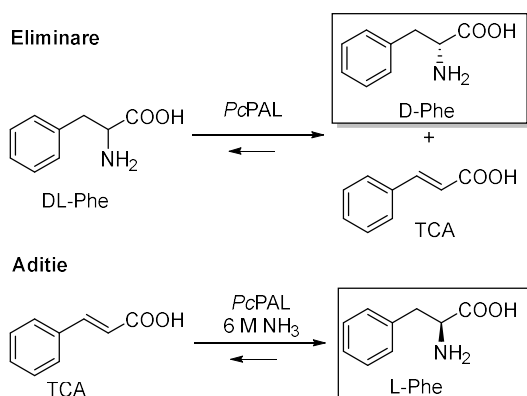


Figura 6. Reacții catalizate de fenilalanină amoniac-liaza

Reacțiile s-au realizat în tuburi Eppendorf de 1.5 mL, în volumul de 0.5 mL, având aceeași concentrație de enzimă liberă - 0.049 mg/mL. Pentru reacțiile de eliminare a amoniacului s-a utilizat o concentrație a substratului D,L-Phe de 4 mM în soluție tampon Tris (20 mM Tris.HCl, 100 mM NaCl, pH 8) iar pentru reacțiile de aditie a amoniacului s-a utilizat o concentrație a substratului, acidul *trans*-cinamic, de 2 mM în soluție de NH₄OH 6 M (pH 10). Reacțiile au fost incubate la 30 °C și 750 rpm și la anumite intervale de timp s-au luat probe (50 μL), peste care s-a adăugat un volum echivalent de MeOH, au fost vortexate, centrifugate și filtrate pe membrane de 0.2 μm și ulterior analizate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea conversiei. Metoda de separare HPLC utilizată este redată în **Tabelul 3**. Pentru determinarea conversiei reacțiilor s-au utilizat factorii de răspuns din tabelul de mai jos determinați din curbe de calibrare realizate anterior.

Tabelul 3. Condiții de separare HPLC

Coloană	Faza mobilă* gradient (%B)	Timp de retenție (min)		Factor de răspuns	Factor de răspuns	Temperatură (°C)
		L-Phe	TCA	TCA vs. L-Phe	L-Phe vs. TCA	
Gemini NX-C18 (150×4.5 mm; 5 μm)	10 - 40 în 8 min	4.3	7.9	14.615	0.0722	25

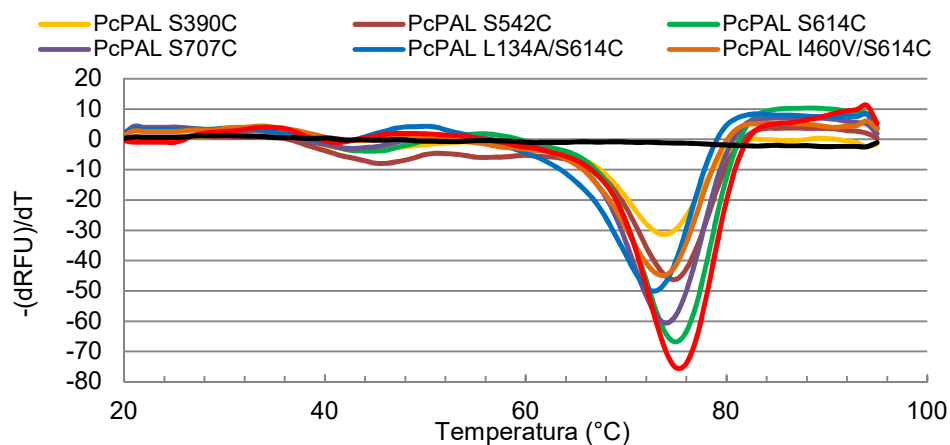
*Faza mobilă: A: soluție NH₄OH (0.1 M, pH 9.0), B: MeOH; debit: 1.0 mL/min. Detecție UV la 220 nm.

Tabel 4. Compararea activității enzimelor mutante *PcPAL* cu *wt-PcPAL* sub aspectul conversiilor

Enzime libere	Conversie (%)					
	Adiție			Eliminare		
	1 h	2 h	4 h	1 h	2 h	4 h
wt-PcPAL	72.9	82.2	85.9	38.6	38.5	38.8
PcPAL S390C	64.5	76.0	85.9	31.3	35.6	39.0
PcPAL S542C	64.7	76.2	85.6	32.8	39.2	38.4
PcPAL S614C	65.4	77.8	85.6	29.9	35.6	37.9
PcPAL S707C	67.7	79.6	85.5	35.5	38.3	39.4

Rezultatele din **Tabelele 2 și 4** demonstrează faptul că activitatea mutanților nu a fost alterată/seminificativ modificată în urma mutațiilor.

De asemenea, utilizând un termocycler BioRad CFX96 Real-Time Thermal Cyler cu filtru de fluorescență ROX și colorantul SYPRO Orange Protein Gel Stain, s-a investigat profilul de denaturare termică a celor 4 variante mutante și s-a observat o similaritate ridicată cu cel al enzimei native (**Figura 7**), sugerând faptul că mutațiile produse nu au afectat modul de împachetare al proteinelor.

**Figura 7.** Profilul de denaturare termică a variantelor enzimei *PcPAL* (NC: control negativ)

Activitatea 2.3. Funcționalizarea suporturilor pentru imobilizarea enzimelor

Pentru imobilizarea enzimelor PcPAL s-au ales ca suporturi nanotuburile de carbon cu un singur perete, funcționalizate cu grupări $-COOH$ și $-NH_2$ ($SWCNT_{COOH}$ și $SWCNT_{NH_2}$) deoarece în studii anterioare s-au dovedit a fi suporturi eficiente pentru imobilizarea covalentă nespecifică a enzimelor, inclusiv a amoniac-liazelor.^{6,7} Procedura de funcționalizare a suporturilor și imobilizarea situs-specifică a enzimelor pe suporturile activate cu gruparea maleimidică este redată în **Figura 8**. În cazul $SWCNT_{COOH}$, suportul (20 mg) a fost inițial activat cu 1,1'-carbonildiimidazol (200 mM, în 3 mL CH_2Cl_2), apoi funcționalizat cu 1,3-propandiamină (10 μ L în 3 mL H_2O distilată), de care s-a legat *N*-maleoil- β -alanina (25 mM în 3 mL DMF), în prealabil activată cu *N*-hidroxisuccinimidă (NHS, 60 mM) și 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă (EDAC, 100 mM), furnizând astfel gruparea maleimidică prin care s-a realizat imobilizarea enzimei, la nivelul grupării tiolice prezente în resturile de cisteină introduse prin mutageneză situs-direcționată la suprafața enzimei în cadrul **Activității 1.2 (Figura 8a)**. În cazul $SWCNT_{NH_2}$ s-a realizat direct funcționalizarea acestora cu o grupare maleimidică prin intermediul grupării $-NH_2$, de care s-a legat apoi enzima prin cuplare tiol-maleimidică (**Figura 8b**).

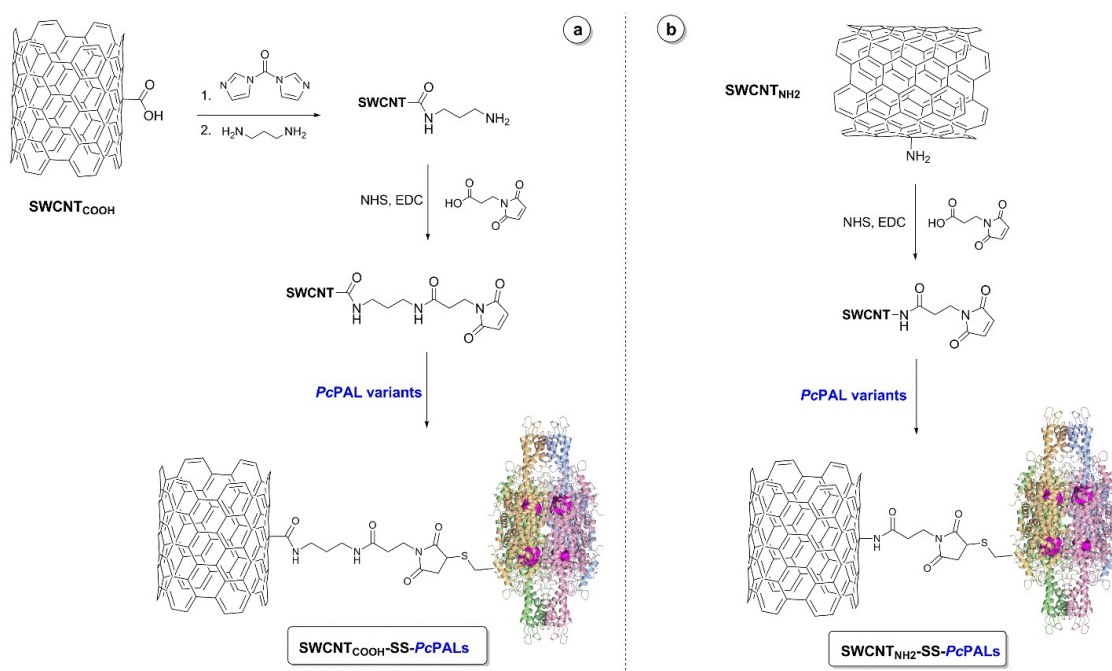


Figura 8. Imobilizarea covalentă situs-specifică a enzimei PcPAL pe **a)** $SWCNT_{COOH}$ și **b)** $SWCNT_{NH_2}$

S-au determinat randamentele de legare a enzimelor de suporturile activate prin măsurarea concentrației inițiale de enzimă, a concentrației de enzimă din filtratul rămas după procesul de imobilizare și din apele de spălare a preparatului enzimatic imobilizat, utilizând metoda Bradford. Randamentele de imobilizare au fost în toate cazurile $>96\%$ (**Tabelul 5**).

Tabelul 5. Randamente de imobilizare

Enzimă	SWCNT _{COOH}		SWCNT _{NH2}	
	Legată	mg enzimă/mg suport	Legată	mg enzimă/mg suport
wt-PcPAL	98.7%	4.9×10 ⁻²	98.1%	4.9×10 ⁻²
S390C	98.6%	4.9×10 ⁻²	98.6%	4.9×10 ⁻²
S542C	97.6%	4.9×10 ⁻²	96.9%	4.9×10 ⁻²
S614C	97.3%	4.9×10 ⁻²	97.7%	4.9×10 ⁻²
S707C	97.7%	4.9×10 ⁻²	97.4%	4.9×10 ⁻²

Activitatea 2.4. Imobilizarea enzimelor; testarea activității, stabilității și reciclabilității preparatelor imobilizate, optimizarea condițiilor de imobilizare

În studiile preliminare (**Tabelul 6**) s-a observat faptul că în cazul reacției de eliminare a amoniacului, biocatalizatorii obținuți prin imobilizarea PcPAL pe SWCNT_{COOH} au fost mai eficienți (s-au obținut conversii de reacție mai mari), iar în cazul reacției de adiție a amoniacului cei rezultați prin legarea PcPAL de SWCNT_{NH2} au fost mai eficienți.

Tabelul 6. Teste preliminare ale preparatelor imobilizate situs-specific vs. nespecific pe diferite SWCNT.

PcPAL/S390C și wt-PcPAL imobilizat pe SWCNT	Conversie _{24 h} (%)	
	Eliminare de amoniac	Adiție de amoniac
SWCNT _{COOH} -SS-PcPAL/S390C	22.2	14.2
SWCNT _{NH2} -SS-PcPAL/S390C	9.8	25.5
SWCNT _{COOH} -GDE-wtPcPAL	11.7	8.2
SWCNT _{NH2} -GDE-wtPcPAL	3.6	18.9

Ulterior preparatele enzimatiche imobilizate au fost testate în reacții de eliminare și adiție a amoniacului. Pentru a investiga eficiența imobilizării covalente situs-specifice a PcPAL s-a realizat în paralel și imobilizarea covalentă nespecifică pe aceleași suporturi, conform protocolului dezvoltat anterior în cadrul grupului de cercetare al instituției gazdă^{2,3}, și s-au comparat conversiile reacțiilor catalizate de enzimele imobilizate situs-specific și nespecific (**Figura 9**).

În ceea ce privește reacția de eliminare a amoniacului, trei dintre biocatalizatorii imobilizați situs-specific au demonstrat eficiență catalitică superioară variantei imobilizate nespecific iar în cazul reacției de adiție a amoniacului, biocatalizatorul obținut prin imobilizarea situs-specifică a PcPAL S614C s-a dovedit a fi semnificativ mai eficient decât oricare dintre celelalte variante. Întrucât reacția de adiție a amoniacului la derivați de acid *trans*-cinamic este o rută sintetică extrem de atractivă pentru

obținerea analogilor de L-fenilalanină în continuare ne-am axat pe această reacție și am realizat optimizarea condițiilor de reacție utilizând ca biocatalizator *PcPAL* S614C imobilizat situs-specific, $\text{SWCNT}_{\text{NH}_2}$ -*SS-PcPAL*.

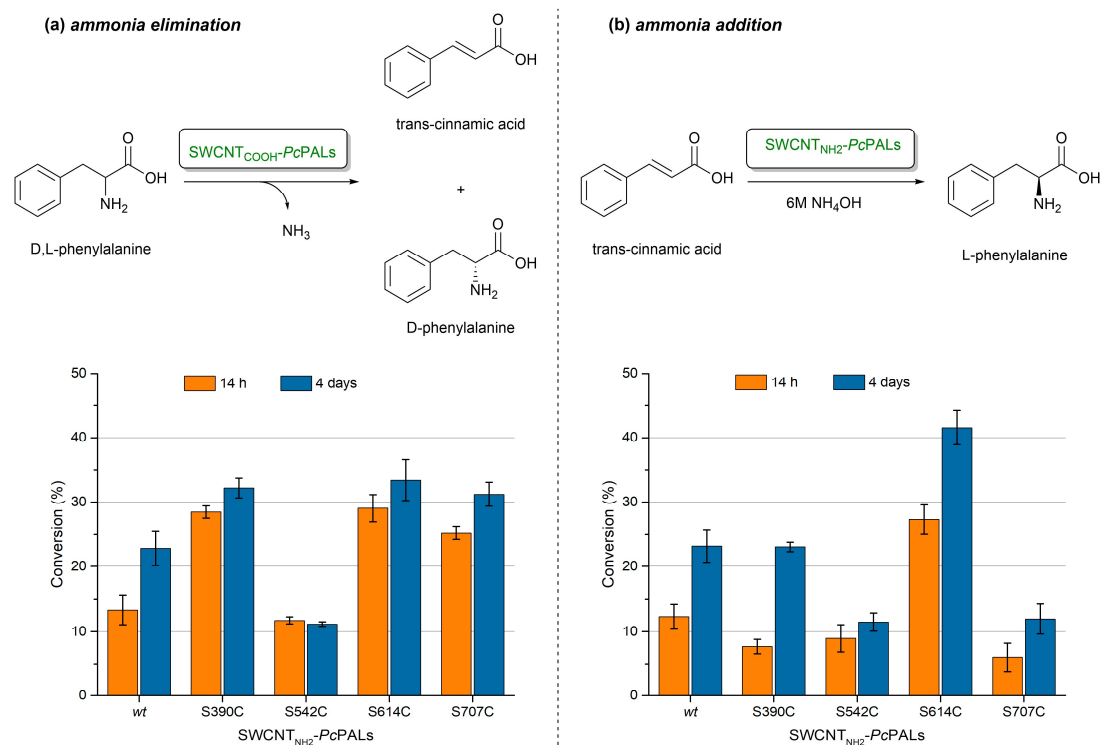


Figura 9. Conversiile reacțiilor de a) eliminare a amoniacului din D,L-fenilalanină și b) adădire a amoniacului la acidul *trans*-cinamic utilizând ca biocatalizatori variantele *PcPAL* S390C, S542C, S614C și S707C imobilizate situs-specific și *wt-PcPAL* imobilizat nespecific pe $\text{SWCNT}_{\text{COOH}}$ și $\text{SWCNT}_{\text{NH}_2}$.

Pentru optimizarea condițiilor reacției de adădire a amoniacului s-au realizat reacții în duplicat la scară analitică, în tuburi Eppendorf (1.5 mL), în volumul de 1 mL, având concentrația substratului de 2 mM, utilizând diferite cantități de biocatalizator, diferite tipuri și concentrații ale sursei de amoniac. Reacțiile au fost incubate la diferite temperaturi sub agitare (750 rpm) pentru intervale diferite de timp.

Prima etapă a studiului de optimizare a condițiilor reacției de adădire a amoniacului a fost testarea influenței cantității de biocatalizator (**Figura 10**). S-a observat o tendință crescătoare a conversiei cu creșterea cantității de biocatalizator, prin urmare în continuare s-a investigat gradul de încărcare a suportului cu enzimă (**Figura 11**). Încărcări mai mari de ~0.5 (mg enzimă/mg suport) au condus la randamente de imobilizare reduse (<80%) de aceea nu s-au testat valori mai mari, pentru a evita pierderea enzimei care nu se leagă de suport. Din valorile conversiilor (**Figura 11**) s-a observat că încărcarea optimă cu enzimă este de ~0.13, iar un conținut mai mare în enzimă al preparatului

imobilizat nu a determinat o creștere semnificativă a conversiei de aceea această valoare a fost utilizată în experimentele ulterioare.

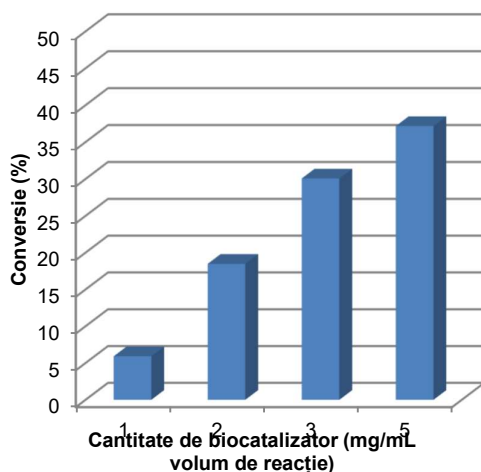


Figura 10. Influența cantității de biocatalizator asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului

În continuare s-a investigat influența sursei de amoniac asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului la substratul model, acidul *trans*-cinamic. Pentru aceasta, s-au selectat hidroxidul de amoniu (NH_4OH) și carbamatul de amoniu ($\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$), surse de amoniac eficiente în studii anterioare^{8,9,10}, și s-au testat diferite concentrații ale acestora în mediul de reacție. Rezultatele din **Tabelul 7** indică $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ ca fiind sursa optimă de amoniac.

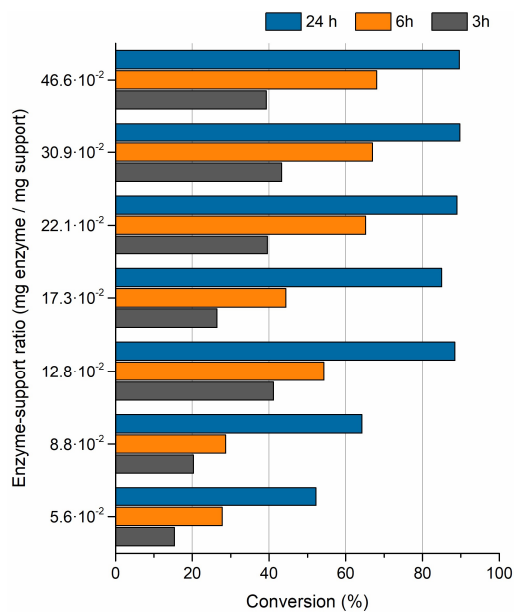


Figura 11. Conversia reacției de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic după 3, 6 și 24 h utilizând preparatul $\text{SWCNT}_{\text{NH}_2}\text{-SS-PcPAL}$ având diferite încărcări cu enzimă

Tabelul 7. Influența sursei de amoniac asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic, catalizată de SWCNT_{NH₂}-SS-PcPAL

	Sursa de amoniac						
	NH ₂ CO ₂ NH ₄				NH ₄ OH		
Conc. (M)	1	2	3	4	2	4	6
Conv. (%)	74.7	87.8	92.6	94.1	61.7	80.2	84.9

O cerință extrem de importantă a unui biocatalizator eficient, cu aplicații industriale este reciclabilitatea, prin urmare s-a testat stabilitatea operațională a biocatalizatorului SWCNT_{NH₂}-SS-PcPAL la recirculare. Experimentele de recirculare s-au realizat în tuburi de tip spin columns care au permis cu ușurință îndepărtarea mediului de reacție, spălarea biocatalizatorului și pornirea unui nou ciclu de reacție, fără a avea pierderi de biocatalizator.

Deoarece sursa de amoniac poate influența nu doar conversia reacției ci și stabilitatea operațională a biocatalizatorului, teste de recirculare a biocatalizatorului s-au realizat cu ambele surse amoniac, soluție de NH₄OH cât și de NH₂CO₂NH₄ (**Figurile 12, 13, 14**). De asemenea reciclabilitatea noului biocatalizator SWCNT_{NH₂}-SS-PcPAL s-a comparat în aceleași condiții de reacție cu cea a biocatalizatorului anterior dezvoltat prin legarea covalentă nespecifică SWCNT_{NH₂}-GDE-wtPcPAL (**Figura 13**).

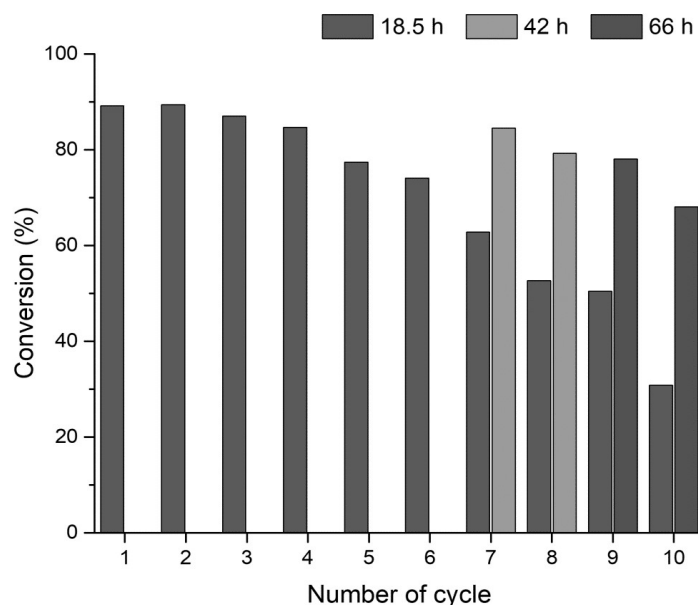


Figura 12. Recircularea SWCNT_{NH₂}-SS-PcPAL în reacția de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic utilizând ca sursă de amoniac 6 M NH₄OH (pH=10.0)

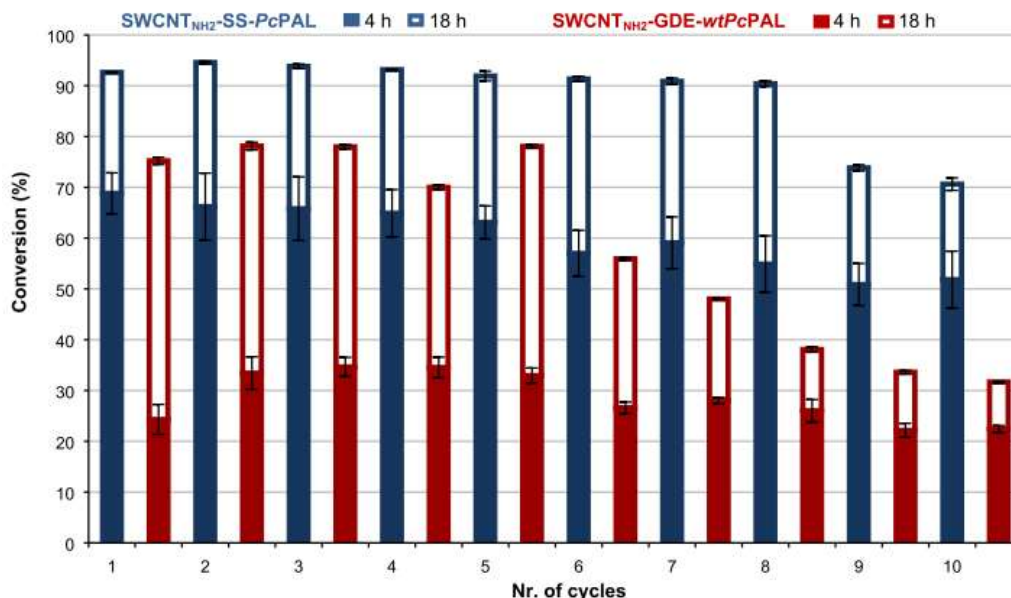


Figura 13. Recircularea SWCNT_{NH2}-SS-PcPAL și SWCNT_{NH2}-GDE-wtPcPAL în reacția de adiție a amoniului la acidul *trans*-cinamic utilizând condițiile optime de reacție: carbamat de amoniu 3 M, pH 9.6–10.0) ca sursă de amoniac și încărcarea cu enzimă de ~0.13 (mg enzimă/mg suport)

S-a observat faptul că biocatalizatorul obținut prin imobilizarea situs-specifică a PcPAL prezintă stabilitate la recirculare mai crescută în soluție de NH₂CO₂NH₄ decât în NH₄OH, oferă conversii mai mari și poate fi recirculat de mai multe ori fără o scădere semnificativă a conversiei decât biocatalizatorul imobilizat covalent nespecific SWCNT_{NH2}-GDE-wtPcPAL (**Figura 13**).

Alegând carbamatul de amoniu ca sursă optimă de amoniac s-a investigat recircularea biocatalizatorului dezvoltat SWCNT_{NH2}-SS-PcPAL în soluții de carbamat de amoniu de diferite concentrații (**Figura 14**). Deși concentrația de NH₂CO₂NH₄ de 2 M a condus la o stabilitate în recirculare a biocatalizatorului mai mare, s-a luat în calcul și valoarea conversiei reacției de adiție, iar la concentrația NH₂CO₂NH₄ de 3 M s-au înregistrat conversii mai mari, cu scădere ne semnificativă în 8 cicluri de reacție, prin urmare soluția de NH₂CO₂NH₄ de 3 M a fost utilizată în continuare ca sursă optimă de amoniac.

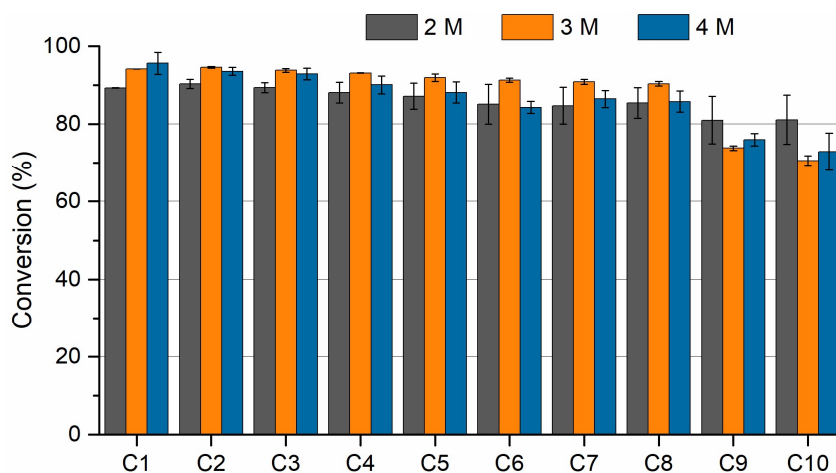


Figura 14. Reciclabilitatea SWCNT_{NH₂}-SS-*Pc*PAL în reacția de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic în soluții de carbamat de amoniu de diferite concentrații

S-a studiat și efectul temperaturii asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului la substratul model. Temperatura de 40 °C s-a dovedit a fi optimă și a condus la o conversie a reacției foarte ridicată, de ~90% în 24 h (**Figura 15**).

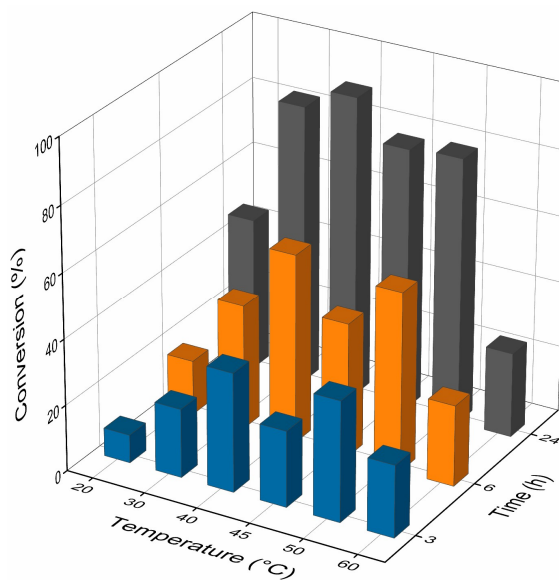


Figura 15. Efectul temperaturii asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic în condițiile optime de reacție determinate anterior (carbamat de amoniu 3 M, pH 9.6–10.0 și încărcarea cu enzimă de ~0.13 mg enzimă/mg suport)

Utilizând condițiile de reacție optime s-a investigat profilul în timp al conversiei (**Figura 16**). O valoare excelentă a conversiei s-a obținut deja după 10 h de reacție ($c > 90\%$), iar un timp de reacție mai îndelungat nu a condus la o creștere a acesteia, sugerând faptul că s-a atins echilibrul reacției.

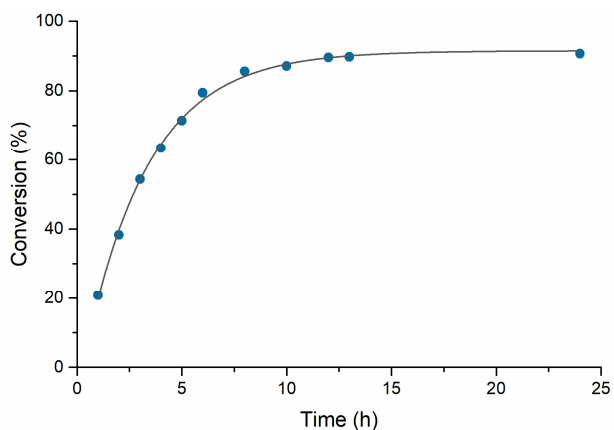


Figura 16. Profilul în timp al conversiei reacției de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic, catalizată de SWCNT_{NH₂}-SS-*Pc*PAL în condițiile optime de reacție (NH₂CO₂NH₄ 3M, 0.13 mg enzimă/mg suport, 40 °C)

Rezultatele Etapei 2:

- s-a dezvoltat o metodă de imobilizare covalentă situs-specifică a fenilalanină amoniac-liazei pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări amino, prin cuplarea tiol-maleimidă, care s-a dovedit a fi superioară variantei similare de imobilizare nespecifică.
- s-a dezvoltat un biocatalizator eficient (conversie ~ 90% în 10 h) și stabil la recirculare (> 7 cicluri de reacție) prin imobilizarea situs-specifică a *Pc*PAL S614C pe SWCNT_{NH₂}, în reacția de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic, cu formarea L-fenilalaninei.

Etapa 3: Dezvoltarea de bioprocese eficiente pentru obținerea aminoacizilor nenaturali optic puri utilizând enzimele PAL imobilizate

Activitatea 3.1. Testarea noilor biocatalizatori în sisteme discontinue pentru obținerea aminoacizilor nenaturali optic puri prin procese de rezoluție cinetică enzimatică și adiție asimetrică

În continuare s-a studiat aplicabilitatea biocatalizatorului dezvoltat prin imobilizarea covalentă situs-specifică a *Pc*PAL în reacții de adiție a amoniacului la derivați de acid *trans*-cinamic, în scopul sintezei unor analogi nenaturali ai L-fenilalaninei (**Figura 17**). În acest sens s-a realizat imobilizarea situs-specifică pe SWCNT_{NH₂} a două variante mutante ale *Pc*PAL, și anume L134A și I460V, care s-au dovedit a avea eficiență catalitică superioară variantei native față de o serie de substraturi nenaturale^{5,11}, iar biocatalizatorii nou dezvoltați au fost testați în reacții de adiție a amoniacului.

Pentru realizarea imobilizării situs-specifice a mutațiilor *PcPAL* s-au dezvoltat inițial dublu mutații L134A/S614C și I460V/S614C prin mutageneză direcționată pe situs utilizând genele *pcpal* L134A și *pcpal* I460V introduse în vectori pET-19b ca matriță. Enzimele dublu mutante au fost exprimate, izolate și purificate conform **Activității 2.2**, iar activitatea și stabilitatea termică (**Figura 7**) a acestora au fost determinate și comparate cu cele ale variantelor cu mutații singulare, *PcPAL* L134A și *PcPAL* I460V. Și în acest caz, mutația S614C nu a afectat stabilitatea termică și activitatea enzimatică. Enzimele *PcPAL* L134A/S614C și *PcPAL* I460V/S614C au fost imobilizate situs-specific pe SWCNT_{NH2} conform protocolului descris la **Activitatea 2.4** și au fost testate în reacții de adiție a amoniacului la patru derivați de acid *trans*-cinamic, în condițiile optime identificate anterior.

Conversiile obținute pentru reacțiile catalizate de variantele PAL imobilizate situs-specific au fost comparate cu cele obținute în cazul utilizării variantelor imobilizate nespecific, obținute prin legare covalentă utilizând glicerol-diglicidil eter ca linker⁷. S-a observat că în toate cazurile, enzimele imobilizate situs-specific (SWCNT_{NH2}-SS-PAL) au demonstrat performanță catalitică superioară celor imobilizate nespecific (SWCNT_{NH2}-GDE-PAL).

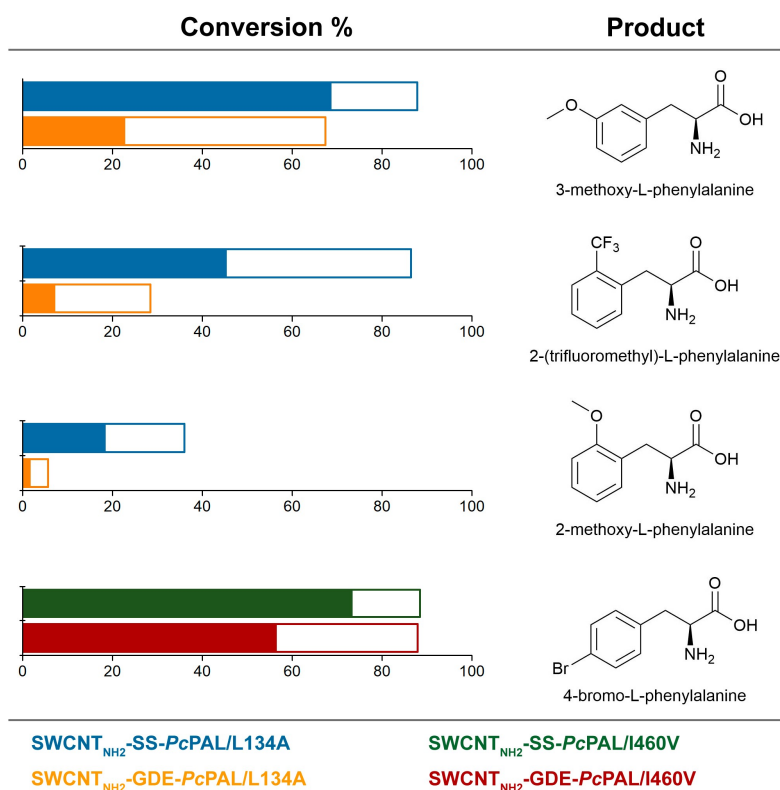


Figura 17. Adiția amoniacului la derivați ai acidului *trans*-cinamic catalizată de variantele mutante ale *PcPAL* L134A și I460V imobilizate covalent situs-specific și nespecific pe SWCNT_{NH2}. Barele pline reprezintă conversia după 4 h de reacție iar cele goale conversia după 20 h.

În scopul dezvoltării unor proceduri enzimatic eficiente pentru sinteza aminoacizilor nenaturali, s-au testat enzime PAL și din alte surse, bine caracterizate și studiate, și anume PAL din *Rhodospiridium toruloides*^{12,13} (*RtPAL*) și *Arabidopsis thaliana*¹⁴ (*AtPAL*), performanțele lor catalitice fiind comparate cu cele ale *PcPAL*. Strategia de îmbunătățire a performanțelor catalitice ale *PcPAL* prin mutagenază situs-direcționată la nivelul situsului de legare hidrofob a condus la obținerea unor variante mutante cu proprietăți îmbunătățite față de varianta nativă^{10,11}, prin urmare, aceeași abordare s-a aplicat și enzimelor *AtPAL* și *RtPAL* (**Figura 18**) în scopul elaborării unei strategii generale de îmbunătățire a activității enzimelor PAL față de substraturile nenaturale țintite, bazată pe designul rațional al situsului catalitic dar și pentru a dezvolta procese enzimatic eficiente pentru obținerea fenilalaninelor nenaturale.

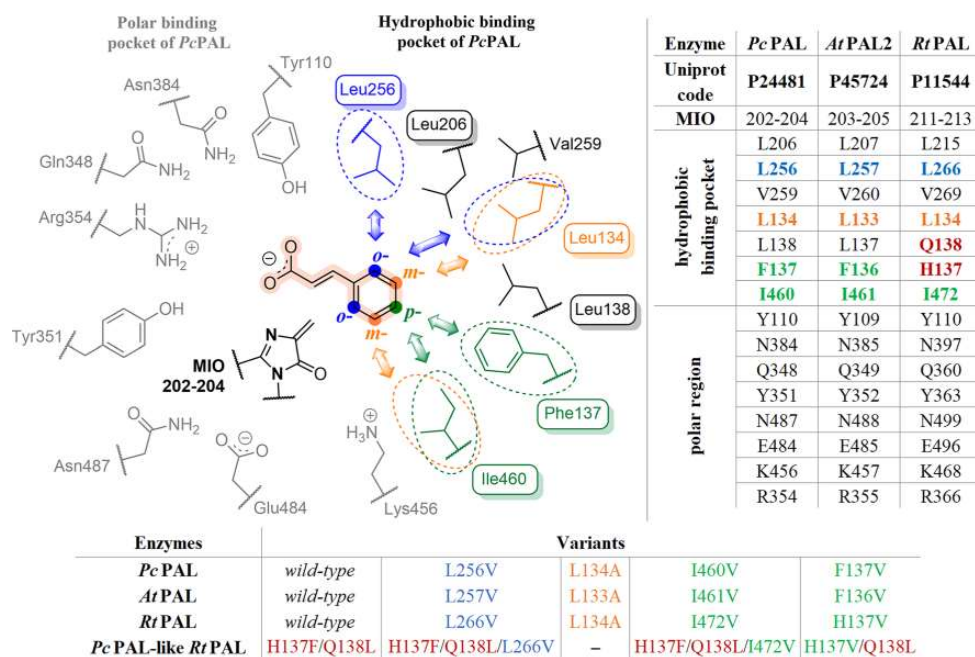


Figura 18. Situsul catalitic al *PcPAL* - resturile de aminoacizi sunt marcate cu culori în funcție de proximitatea față de substituenții de pe inelul aromatic al substraturilor. Resturile de aminoacizi omoloage din situsul activ al *RtPAL* (P11544) și *AtPAL* (P45724) rezultate în urma alinierii secvențelor acestora cu cea a *PcPAL* (tabelul dreapta sus), cele marcate cu culori fiind cele selectate pentru mutagenază și biblioteca de mutanți generată (tabelul de jos)

Variantele mutante și native (*wt*) ale enzimelor PAL (sub formă de celule întregi dar și enzime purificate) au fost investigate în reacții de eliminare și adădire a amoniacului, pe o gamă vastă de analogi nenaturali ai substraturilor (**Figura 19**), prin determinarea conversiilor reacțiilor (determinate prin HPLC) dar și prin măsurarea parametrilor cinetici (K_M , v_{max} , k_{cat}) în reacțiile de eliminare a amoniacului

(determinați spectrofotometric, prin urmărirea absorbanței la 290 nm a produsului reacției, derivatul de acid *trans*-cinamic).

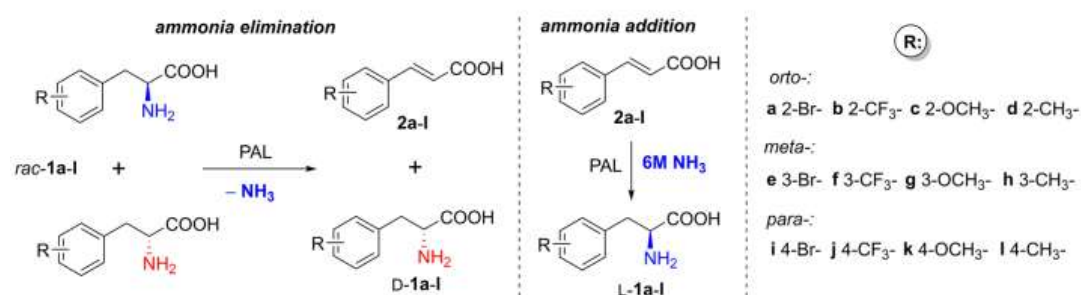


Figura 19. Reacții de eliminare a amoniacului de la derivații de fenilalanină *rac*-**1a-I** și aditie a amoniacului la derivații de acid *trans*-cinamic **2a-I**, catalizate de variantele *Rt*PAL și *At*PAL

Rezultatele experimentale obținute, susținute de studii de modelare moleculară, au demonstrat în majoritatea cazurilor activitatea superioară a variantelor mutante față de variantele native iar faptul că enzima *At*PAL (având 81% identitate de secvență cu *Pc*PAL și situsuri active identice) s-a dovedit în general a fi mai eficientă decât *Pc*PAL sugerează că pe lângă aminoacizii din situsul catalitic, există și alte elemente structurale care influențează activitatea enzimatică și specificitatea de substrat. **Figura 20** sumarizează rezultatele obținute în cadrul acestui screening amplu, ilustrând varianta PAL care a furnizat cele mai bune conversii în cazul reacțiilor de aditie a amoniacului la derivații de acid *trans*-cinamic **2a-I**.

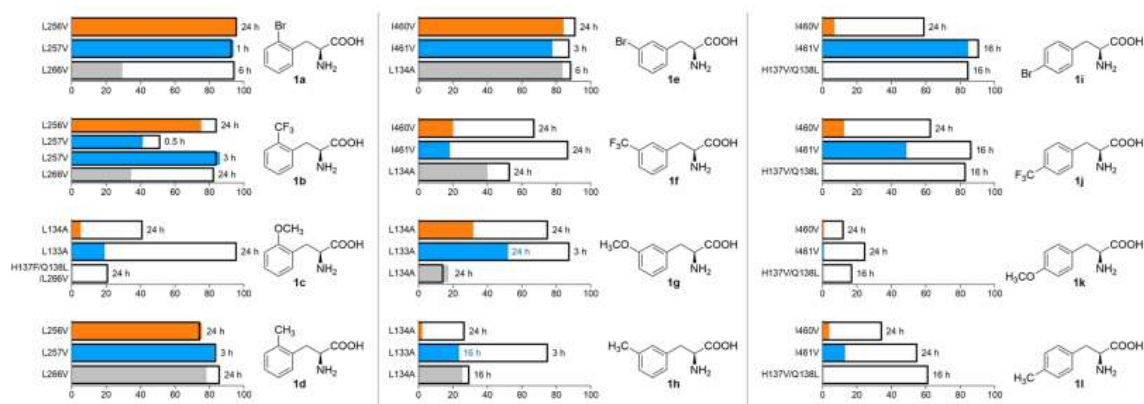


Figura 20. Obținerea derivaților de L-fenilalanină *L*-**1a-I** prin reacții de aditie a amoniacului catalizate de enzimele PAL cu cele mai bune performanțe catalitice (*wt*-*Pc*PAL – portocaliu, *wt*-*At*PAL – albastru, *wt*-*Rt*PAL – gri). Coloanele albe suprapuse peste cele colorate redau creșterea conversiei reacției catalizate de varianta mutantă față de cea nativă.

Acest studiu a evidențiat faptul că pentru a identifica biocatalizatorul cel mai potrivit pentru un anumit proces este necesară testarea enzimelor din diferite surse, cu diferite secvențe de aminoacizi, deoarece diferențele de activitate nu depind doar de structura situsului catalitic.

Întrucât enzima *AtPAL*, în varianta nativă sau mutantă s-a dovedit a fi superioară enzimei *PcPAL* în transformarea substraturilor nenaturale, în continuare ne-am axat pe imobilizarea situs-specifică a acesteia. În urma alinierii secvențelor celor două enzime, *AtPAL* (P45724) și *PcPAL* (P24481), s-a observat o identitate de secvențe ridicată (81%) și situsuri catalitice identice. Prin analogie cu structura cuaternară a *PcPAL*, s-au identificat în cazul *AtPAL* cinci resturi de Cys, presupuse a fi la suprafața enzimei. Întrucât reușita imobilizării situs-specifice prin cuplare tiol-maleimidă este condiționată de absența resturilor de Cys superficiale, aceste resturi de Cys au fost supuse mutagenzei direcționate pe situs pentru a fi schimbate la Ser, ulterior introducându-se mutația S615C care furnizează gruparea tiolică superficială unică prin care se realizează imobilizarea situs-specifică a enzimei (**Figura 21**). În **Tabelul 8** sunt redate amorsele mutagenice proiectate.

Rest AA	<i>wtAtPAL</i>	<i>AtPAL</i> mutant
584	C	S
615	S	C
656	C	S
694	C	S
705	C	S
717	C	S

<i>wtAtPAL</i>	1712	TTGTTGATCGTGAGCAAGTGTTCACGTATGTGGATGATCC	C584S	1771
Sequencing result	694	TTGTTGATCGTGAGCAAGTGTTCACGTATGTGGATGATCC	TCT	753
<i>wtAtPAL</i>	1772	TGATGCAGAGACTAAGACAAGTTATTGTTGATCACGCTTTGTC	CAACGGTGAGACTGAGA	1831
Sequencing result	754	TGATGCAGAGACTAAGACAAGTTATTGTTGATCACGCTTTGTC	CAACGGTGAGACTGAGA	813
<i>wtAtPAL</i>	1832	AGAATGCAAGTGAATCTCTTTCAAAGATTGGAGCTTTTGAAGAGAC	CTTAAGCGCTG	1891
Sequencing result	814	AGAATGCAAGTGAATCTCTTTCAAAGATTGGAGCTTTTGAAGAGAC	CTTAAGCGCTG	873
<i>wtAtPAL</i>	1892	TGCTTCAAAGGAAGTTGAAGCGGCTAGAGCGGCTTATGGGAATGGAAC	TGCGCGGATTC	1951
Sequencing result	874	TGCTTCAAAGGAAGTTGAAGCGGCTAGAGCGGCTTATGGGAATGGAAC	TGCGCGGATTC	933
<i>wtAtPAL</i>	1952	CTAACCGGATTAAGGATCTAGGTCGATCCGTTGATAGGTTCTGAGGGAAAG	AGACTTTG	2011
Sequencing result	934	CTAACCGGATTAAGGATCTAGGTCGATCCGTTGATAGGTTCTGAGGGAAAG	AGACTTTG	993
<i>wtAtPAL</i>	2012	GAAAGCAAGTTGTTGACTGGAGAAAAGTTGTGTCTCCGGGAGAGAGTTGATAAG	GCTT	2071
Sequencing result	994	GAAAGCAAGTTGTTGACTGGAGAAAAGTTGTGTCTCCGGGAGAGAGTTGATAAG	GCTT	1053
<i>wtAtPAL</i>	2072	TCACCTGCTATGTTAAGGTAACCTATTGATCCGTTGATGGA	TGTTCAAGGAATGGA	2131
Sequencing result	1054	TCACCTGCTATGTTAAGGTAACCTATTGATCCGTTGATGGA	TGTTCAAGGAATGGA	1113
<i>wtAtPAL</i>	2132	ACGGAGCTCCGATTCGATTTGC	AAA	2157
Sequencing result	1114	ACGGAGCTCCGATTCGATTTGC	AAA	1139

Figura 21. Alinierea secvențelor enzimelor *AtPAL* și *PcPAL* cu evidențierea resturilor de Cys și Ser supuse mutagenzei direcționate pe situs. Cu verde este marcată mutația realizată în scopul imobilizării enzimei

Tabelul 8. Secvențele nucleotidice ale amorselor mutagenice utilizate pentru imobilizarea situs-specifică a *AtPAL*

Mutație	Secvență nucleotidică 5'-3'
S615C	for: GTGACTTGCATCTTTCAAAGATTGGAGCTTTTGAAGAG rev: GAAAGATGCAAGTCACTGCATTCTTCTCAGTCTCAC
C584S	for: GATCCTTCTAGCGCTACGTACCCGTTGATGC rev: AGCGCTAGAAGGATCATCCACATACGTGAACACT
C656S	for: AAGGAATCTAGGTCGATCCGTTGATAGGTTCTG rev: CGACCTAGATTCCTTAATCCGGTTAGGAATCG
C694S	for: GCTATGTCTGAAGGTAACCTATTGATCCGTTGA

	rev: CCTTCAGACATAGCAGTGAAGACCTTATCAAAC
C705S	for: GATGGATTCTCTCAAGGAATGGAACGGAGCTC rev: CTTGAGAGAATCCATCAGGTAAACTTATTGATCCGTT
C717S	for: CCGATTTCTAACTCGAGGATCCGGCTGC rev: GAGTTAGGAAATCGGAATCGGAGCTCCGTT

După realizarea experimentelor PCR, transformarea produsului PCR, extracția plasmidei și confirmarea prezenței celor 6 mutații prin secvențiere (conform **Activităților 1.1 – 1.4**), enzima AtPAL mutantă a fost apoi exprimată, izolată și purificată conform procedurilor descrise la **Activitățile 2.1 – 2.2**. Puritatea enzimei AtPAL C584S/S615C/C656S/C694S/C705S/C717S a fost verificată prin electroforeză SDS-PAGE (**Figura 22**) și activitatea enzimatică a acesteia a fost determinată (spectrofotometric prin urmărirea absorbantei produsului de reacție, acidul *trans*-cinamic la 290 nm) și comparată cu cea a *wt*-AtPAL. Se observă în **Figura 23** că mutațiile introduse nu au afectat activitatea enzimatică.

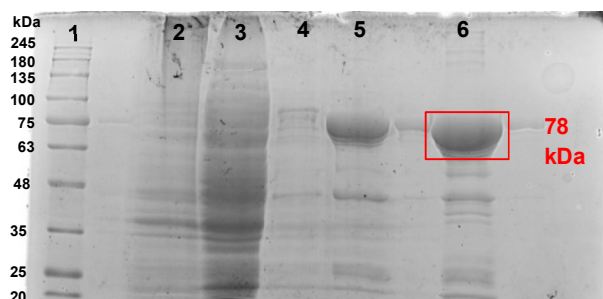
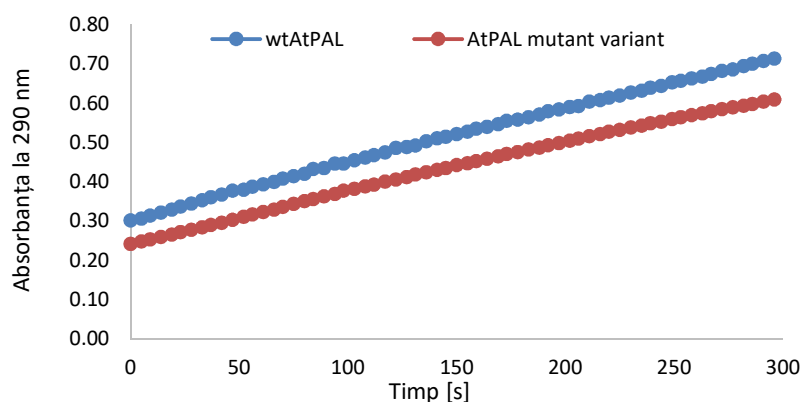


Figura 22. Gelul SDS-PAGE pentru verificarea purității enzimei mutante AtPAL. 1: marker de masă moleculară; 2: flow-through; 3: lizat; 4: soluție spălare 20 mM imidazol; 5: fracție eluată fraction; 6: fracția eluată după concentrare



Enzimă	Activitate enzimatică specifică [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg E}^{-1}$]
<i>wt</i> -AtPAL	0.54
AtPAL mutant	0.49

Figura 23. Activitatea enzimatică specifică a mutantului AtPAL vs. *wt*-AtPAL

Activitatea 3.2. Testarea noilor biocatalizatori în sisteme continue utilizând reactoare cu strat fix de catalizator pentru obținerea aminoacizilor nenaturali optic puri prin procese de rezoluție cinetică enzimatică și adiție asimetrică

Biocatalizatorul dezvoltat $\text{SWCNT}_{\text{NH}_2}\text{-SS-PcPAL}$ a fost testat în sistem continuu utilizând un minireactor din inox (30×3 mm) cu strat fix de catalizator (42 mg), atașat la un sistem de microfluidică SpinSplit FlowChem. S-a investigat reacția de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (2 mM), utilizând condițiile optime de reacție identificate în cadrul **Activității 2.4** (temperatura de reacție de 40°C , iar sursa de NH_3 $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ 3M) (**Figura 24**).

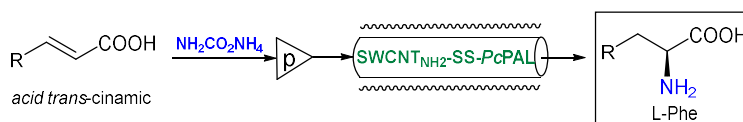


Figura 24. Reacția de adiție a amoniacului în sistem continuu catalizată de PcPAL S614C imobilizat situs-specific pe $\text{SWCNT}_{\text{NH}_2}$

Inițial s-a determinat volumul necesar de probă (soluție de substrat) pentru atingerea regimului staționar, la diferite debite de alimentare ($0.1 - 1 \mu\text{L}/\text{min}$); în toate cazurile s-a observat atingerea staționarității la volume de probă de minim 1 mL. În scopul atingerii unei productivități cât mai mari, s-a investigat efectul unor parametri precum debitul de alimentare (**Tabelul 9**) și concentrația substratului (**Tabelul 10**) asupra conversiei reacției. Experimentele s-au realizat în triplicat. Întrucât cea mai mare conversie (87%) s-a atins la debitul de $0.11 \mu\text{L}/\text{min}$ (**Tabelul 9**) experimentele ulterioare, în care s-au testat diferite concentrații de substrat, s-au realizat la această valoare a debitului.

Tabelul 9. Influența debitului de alimentare asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului în sistem continuu (concentrația substratului 2 mM)

Debit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Conversie (%)
0.11	87 ± 3
0.3	63 ± 1
0.6	38 ± 1
1	25 ± 3

Tabelul 10. Influența concentrației substratului asupra conversiei reacției de adiție a amoniacului în sistem continuu (debit 0.11 $\mu\text{L}/\text{min}$)

Concentrația substratului (mM)	Conversie (%)
4	84 \pm 2
5	74 \pm 2
10	52 \pm 1
20	40 \pm 1
40	7 \pm 1
100	0

S-a observat că valoarea conversiei scade odată cu concentrația substratului. Astfel, dacă la o concentrație de 4 mM a substratului conversia măsurată a fost de 84%, cu creșterea concentrației substratului, conversia acestuia scade până la zero (**Tabelul 10**). S-a observat faptul că dublând concentrația inițială a substratului (4 mM) conversia s-a menținut la o valoare foarte mare, 84%, iar mărirind concentrația substratului de 10 ori s-a atins o valoare satisfăcătoare a conversiei de 40%. La valori ale concentrației mai mari de 20 mM s-au înregistrat conversii foarte mici, inclusiv nule (pentru 100 mM substrat). După spălarea (cu soluție tampon Tris 20 mM, pH 8, debit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$) și reutilizarea biocatalizatorului în experimente cu concentrații mai mici de substrat (2 și 20 mM) s-au atins conversiile inițiale, demonstrând stabilitatea operațională a biocatalizatorului (**Tabelul 10**).

Tabelul 10. Reutilizarea biocatalizatorului SWCNT_{NH₂}-SS-PcPAL în reacția de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic, în regim continuu (debit 0.11 $\mu\text{L}/\text{min}$)

Concentrația substratului (mM)	Conversie (%)
2	89 \pm 3
20	39 \pm 2

Activitatea 3.3. Participare la conferință

Rezultatele obținute în cadrul etapei 3, prezentate sub forma unui poster, au fost diseminate în cadrul Conferinței Internaționale ROMCAT, organizată de Societatea de Cataliză din România, la Băile Govora în perioada 19-24 iunie 2022.

Titlu poster: *Site-specifically immobilized phenylalanine ammonia lyases for continuous flow processes*

Autori: Mădălina Elena Moisă, Judith-Hajnal Bartha-Vári, László-Csaba Bencze, Florin Dan Irimie, Csaba Paizs, Monica Ioana Toșa

Rezultatele Etapei 3:

- s-au dezvoltat biocatalizatori robuști și activi prin imobilizarea situs-specifică a unor variante PcPAL optimizate prin inginerie genetică (PcPAL L134A/S614C și PcPAL I460V/S614C), pentru sinteza a patru analogi nenaturali ai L-fenilalaninei.
- s-au dezvoltat proceduri enzimactice eficiente, în sistem discontinuu și continuu, pentru sinteza L-fenilalaninelor, utilizând variante mutante ale enzimei PAL imobilizate covalent situs-specific.
- prin mutageneză situs-direcționată s-au proiectat variante mutante ale enzimelor PAL din *Arabidopsis thaliana* și *Rhodospiridium toruloides* pentru obținerea unei game variate de aminoacizi nenaturali.

Diseminarea rezultatelor s-a realizat prin participarea la Conferința Internațională RomCat (menționată la **Activitatea 3.3**) și publicarea a două articole științifice în jurnalele Catalysis Science & Technology (IF 6.119) și Scientific Reports (IF 4.996):

1. Krisztina Boros, Mădălina Elena Moisă, Levente Csaba Nagy, Csaba Paizs, Monica Ioana Toșa, László Csaba Bencze, *Robust, site-specifically immobilized phenylalanine ammonia-lyases for the enantioselective ammonia addition of cinnamic acids*, *Catal. Sci. Technol.* **2021**, *11*, 5553-5563, DOI: 10.1039/d1cy00195g.
2. Souad Diana Tork, Mădălina Elena Moisă, Lilla Cserepes, Alina Filip, Levente Csaba Nagy, Florin Dan Irimie, László Csaba Bencze, *Towards a general approach for tailoring the hydrophobic binding site of phenylalanine ammonia-lyases*, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10606, DOI:10.1038/s41598-022-14585-0.

Obiectivul principal al proiectului de a **dezvolta biocatalizatori cu stabilitate și activitate ridicată prin imobilizarea situs-specifică a fenilalanină amoniac-liazei** a fost îndeplinit. Biocatalizatorii nou dezvoltați prin cuplarea tiol-maleimidă a enzimelor modificate genetic (prin mutații punctiforme Ser→Cys) pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări amino și ulterior derivatizate cu gruparea maleimidică (SWCNT_{NH2}-SS-PcPAL) au fost aplicați cu succes în sisteme discontinue și continue de reacție pentru obținerea unor aminoacizi nenaturali de importanță sintetică ridicată, realizând **Obiectivele specifice 2 (Site-specific covalent immobilization of PcPAL through maleimide/thiol coupling)** și **3 (Biocatalytic procedures with novel immobilized PcPALs in batch and continuous-flow systems)** prevăzute în cererea de finanțare. **Obiectivul specific 1 (Site-specific covalent immobilization of PcPAL by incorporation of unnatural amino acids)** a fost parțial realizat, întrucât proteinele izolate PcPAL F561Stop și PcPAL F663Stop nu au prezentat activitate, probabil datorită

instabilității structurale generată de introducerea mutației (conform analizelor SDS-PAGE și Western-Blot se obțin proteine cu His-Tag, dar trunchiate, cu masă moleculară mai mică decât a enzimei native).

Rezultatul cel mai semnificativ obținut în cadrul proiectului constă în obținerea unor **biocatalizatori stabili și activi în reacția de adiție a amoniacului**, rută sintetică extrem de atractivă pentru sinteza L-aminoacizilor dar dificil de realizat la scară mare din cauza concentrației ridicate de amoniac care afectează stabilitatea biocatalizatorilor. Biocatalizatorul SWCNT_{NH₂}-SS-PcPAL a demonstrat activitate și stabilitate îmbunătățite (conversii de ~90% menținute > 7 cicluri de reacție) în reacția de adiție a amoniacului față de alte preparate imobilizate de PAL și reprezintă un posibil candidat pentru aplicare în procese la scară mare. Rezultatele obținute în proiectul de față au un impact ridicat în domeniul enzimelor MIO întrucât pot contribui la răspândirea utilizării acestora în industrie, în sinteza aminoacizilor nenaturali optic puri, dar și în domeniul biocatalizei deoarece strategia de imobilizare situs-specifică poate fi adaptată și aplicată altor enzime, oferind perspective de înlocuire a metodelor chimice clasice de sinteză cu alternative blânde, selective și ecologice.

Pagina web a proiectului: http://chem.ubbcluj.ro/~mmoisa/PD_2020/

Director Proiect,
MOISĂ Mădălina Elena



Referințe bibliografice

- ¹ H. Liu, J. H. Naismith, *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*, 91-101
- ² L. C. Bencze, A. Filip, G. Bánóczy, M. I. Toşa, F. D. Irimie, Á. Gellért, L. Poppe, C. Paizs, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3717-3727
- ³ S. Tyagi, E. A. Lemke, *Methods Cell. Biol.* **2013**, *113*, 169-187.
- ⁴ S. T. Yang, S. I. Lim, V. Kiessling, I. Kwon, L. Tamm, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32866.
- ⁵ N. A. Dima, A. Filip, L. C. Bencze, M. Oláh, P. Sátorhelyi, B. G. Vértessy, L. Poppe, C. Paizs, *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.*, **2016**, *61*, 21.
- ⁶ J. H. Bartha-Vári, M. I. Toşa, F. D. Irimie, D. Weiser, Z. Boros, B. G. Vértessy, C. Paizs, L. Poppe, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 1122.
- ⁷ J. H. Bartha-Vári, L. C. Bencze, E. Bell, L. Poppe, G. Katona, F. D. Irimie, C. Paizs, M. I. Toşa, *Period. Polytech., Chem. Eng.*, **2017**, *61*, 59.
- ⁸ N. J. Weise, S. T. Ahmed, F. Parmeggiani, E. Siirola, A. Pushpanath, U. Schellb, N. J. Turner, *Catal. Sci. Technol.*, **2016**, *6*, 4086.
- ⁹ A. Filip, E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, G. Bánóczy, I. M. Toşa, F. D. Irimie, L. Poppe, C. Paizs, L. C. Bencze, *ChemCatChem*, **2018**, *10*, 2627.
- ¹⁰ S. D. Tork, E. Z. A. Nagy, L. Cserepes, D. M. Bordea, B. Nagy, M. I. Toşa, C. Paizs, L. C. Bencze, *Sci. Rep.*, **2019**, *9*, 20123.
- ¹¹ E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, P. A. Lang, A. Filip, F. D. Irimie, L. Poppe, I. M. Toşa, C. J. Schofield, J. Brem, C. Paizs, *ACS Catal.*, **2019**, *9*, 8825.
- ¹² G. Renard, J. C. Guilleux, C. Bore, V. Malta-Valette, D. A. Lerner, *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 673-678.
- ¹³ S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *42*, 773-778.
- ¹⁴ A. Dreßen, T. Hilberath, U. Mackfeld, A. Billmeier, J. Rudat, M. Pohl, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 148-157.