

RAPORT ȘTIINȚIFIC 2015

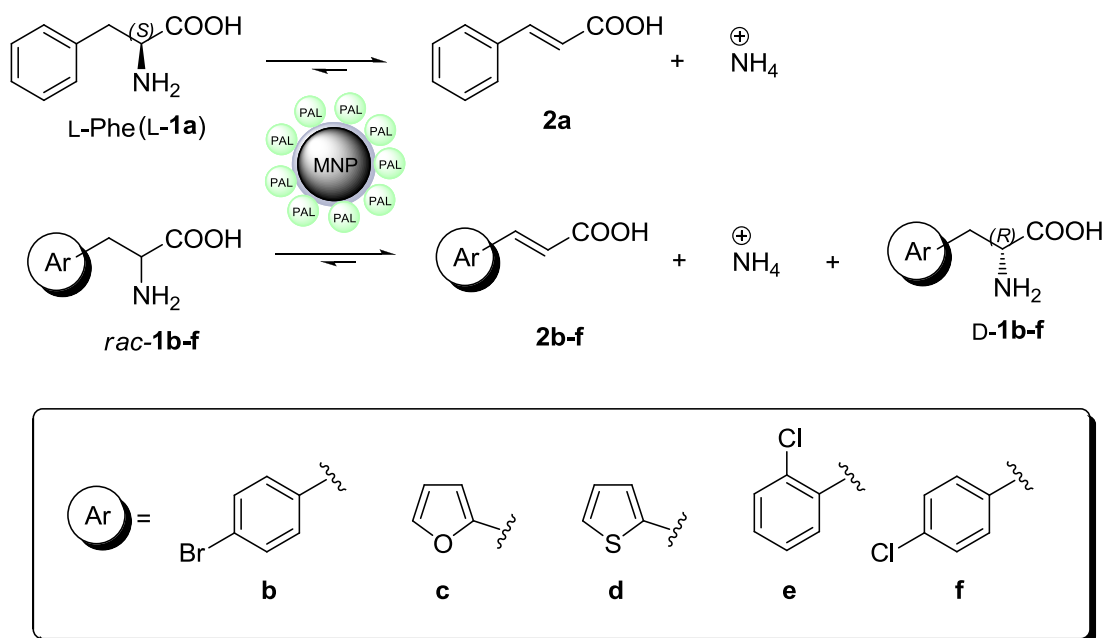
Platforma Magne-Chip pentru biotransformarea analogilor de fenilalanină utilizând fenilalanin amoniac liază imobilizată covalent pe nanoparticule magnetice

Aplicația enzimelor imobilizate în microfluidică oferă posibilități atât în aplicațiile sintetice cât și în cele analitice. În cazul fenilalaninamoniaciazei (PAL) imobilizată pe nanoparticule magnetice (MNPs), nanoparticulele magnetice se pot deplasa în sistemele microfluidice împreună cu lichidul sau pot fi ancorate în poziții predefinite, astfel încât debitul de fluid în sistem să poate fi ales liber față de biocatalizator. Se creează astfel o oportunitate unică pentru dezvoltarea microsistemelor modulare cu posibilitatea variației flexibile a biocatalizatorului.

Magne-Chip este o platformă microfluidică care cuprinde actuatorii (ex. Pompe, valve, termostat) și senzorii necesari (ex. senzor de presiune), o unitatea de control și un chip microfluidic care conține un număr de camere de reacție de ordinul microlitrilor. Camerele sunt adresabile selectiv de un câmp magnetic direcționat care face posibil acumularea de MNP, de la o suspensie de MNP selectată anterior, în camera respectivă.

Unul din obiective a fost studierea proprietăților și parametrilor de setare a unui sistem Magne-Chip în biotransformări cu enzima PAL, folosind substratul natural L-fenilalanina (**L-1a**) și cinci aminoacizi nenaturali (*rac-1b-f*), inclusiv acidul D, L-2-amino-3-(4-bromofenol)propanoic (*rac-1b*), care nu a mai fost testat ca și substrat pentru *PcPAL* neimobilizat.

A fost analizată experimental fiabilitatea și reproductibilitatea experimetelor efectuate cu platforma Magne-Chip pe substratul natural fenilalanina, fiind obținute astfel bazele studiilor ulterioare a biotransformării în chip cu MNP derivatizat cu PAL (MNPs) acționând pe subsstraturi nenaturale (*rac-1b-f*, in Schema 1). În primul rând s-a studiat și s-a optimizat debitul și concentrația folosind L-fenilalanina ca și substrat. Apoi s-a determinat activitatea biocatalitică a biotransformării în chip a fiecărui aminoacid nenatural în parte, comparându-se cu activitatea biocatalitică a L-fenilalaninei.



Schema 1–Eliminarea de amoniac din aminoacizi diferiți (**1a-f**) catalizată de PAL imobilizat pe MNP

La umplerea chipului, suspensia de MNP s-a condus prin chip prin aplicarea unei presiuni de aer (0.2-0.3 bar) asupra fiolei suspensiei conectată la racordul de intrare al Magne-Chipului printr-un tub de PTFE, în timp ce temperatura chipului s-a păstrat la 25 °C. În timpul procesului de umplere MNPs acestea s-au acumulat în celulele de reacție cu ajutorul unor magneți. Odată cu umplerea unei celule (Figura 1), magnetul celulei din amonte s-a amplasat sub celulă. Procedura s-a repetat până la umplerea numărului de celule dorite. Fiecare celulă de Magne-Chip poate capta cca. 250 μg de PAL-MNPs.

Efectuarea experimentelor cu parametri variabili în Magne-Chip

Odată cu umplerea Magne-Chipului cu PAL-MNPs, dozarea lichidului ce curge prin chip poate fi controlată într-o manieră programată. Din moment ce biocatalizatorii MNPs sunt reutilizabili, chipul poate fi reinițializat prin spălare după fiecare experiment de biotransformare. Acest fapt a permis schimbarea substratului sau schimbarea parametrilor de lucru pentru fiecare ciclu, fără a înlocui biocatalizatorul din sistem.

Manipularea fluidului în timpul experimentelor

O seringă (“siringa de substrat”) s-a umplut prin valva de comutare (Figur 1, pozițiile S-A, S-B, ...S-F) cu substratul adecvat din stocurile de substrat A-F. Odată ce seringă ce conține substratul (volum de 1 mL) era complet încărcat valva s-a comutat pe poziția S-I. Substratul, soluția

tampon de spălare sau un amestec al acestora s-a condus prin chip la un debit determinat. Presiunea interioară a circuitelor de fluid s-a monitorizat continuu. Chipul s-a menținut la o temperatură constantă în timpul măsurătorilor.

Efectuarea experimentelor cu parametri multipli în Magne-Chip

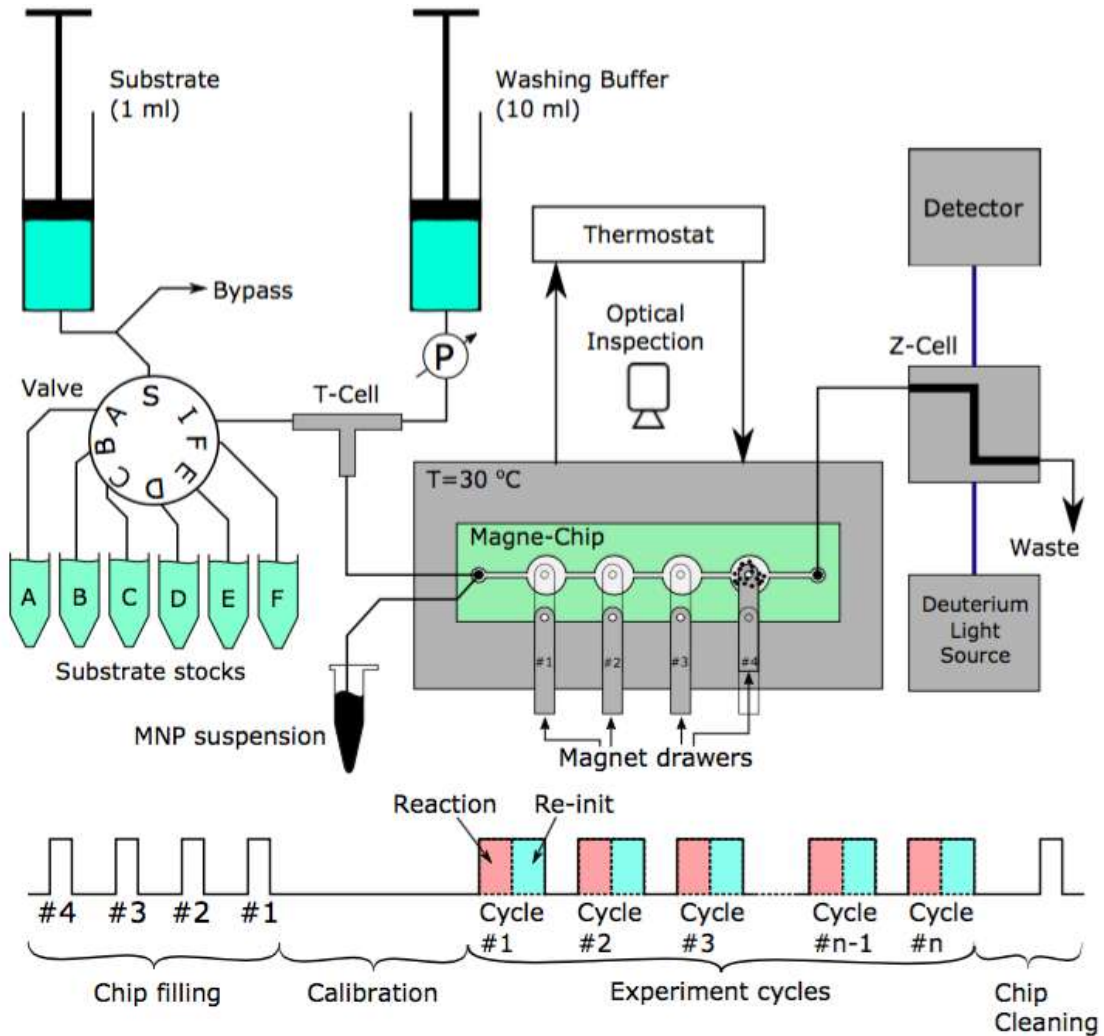


Figura 1 – Diagrama schematică a sistemului de control a fluidelor

Experimentele cu Magne-Chip au implicat patru etape: 1) umplerea chipului cu MNPs, 2) calibrarea absorbantei, 3) cicluri de experimente, 4) curățarea chipului

Experimente

Fiecare experiment implică o etapă de reacție și o etapă de reinițializare.

Etapa de reacție – (Figura 2, $t_{end} - t_{start,n+1}$): Dozarea substratului a început conform uneia dintre următoarele variante (datele Tabel 3, Schimbarea parametrilor). A fost monitorizată continuu valoarea absorbanței la lungimea de undă selectată anterior. Ciclul s-a terminat când timpul desemnat s-a scurs sau procesul a atins condiția de stare staționară în cel puțin pentru $\Delta t_{stat,min} = 10$ min.

Varianta a) S-a început dozarea substratului (primul ciclu) sau a continuat la un debit neschimbat

Varianta b) S-a început dozarea substratului (primul ciclu) sau a continuat în timp ce debitul se poate schimba de la un ciclu la altul.

Varianta c) Dozarea substratului și a soluției de spălare s-a efectuat paralel la un raport desemnat rezultat dintr-o diluție predefinită a substratului la racordul de intrare a chipului

Varianta d) Substratul rămas s-a drenat prin valva de by-pass.

Etapa de reinițializare – (Figura 2, $t_{end} - t_{start,n+1}$) Dozarea substratului s-a oprit în timp ce soluția de spălare s-a condus prin sistem la un debit prestabilit. Ciclul s-a terminat după timpul prestabilit, sau sau procesul a atins condiția de stare staționară în cel puțin pentru $\Delta t_{stat,min} = 10$ min.

Etapa de reacție și etapa de reinițiere constituie un ciclu. Ciclurile se repetă de mai multe ori, potrivit secvenței de măsurare predefinită.

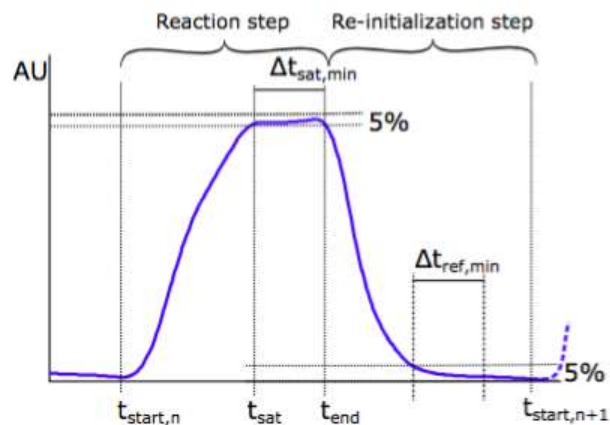


Figura 2 – Graficul absorbantei în timp la un ciclu a măsurătorilor cu parametri mulți în chip la o anumită lungime de undă.

1.1 Evaluarea fiabilității măsurătorilor

1.1.1 Considerații generale asupra măsurătorilor în Magne-Chip

Măsurătorile efectuate în sistem pot fi considerate fiabile dacă îndeplinesc următoarele condiții:

- produsul reacției enzimatică poate fi măsurat selectiv în UV-VIS
- produsul și substratul pot fi complet îndepărtate în etapa de spălare
- activitatea enzimatică a biocatalizatorului rămâne neschimbată în timpul măsurătorilor
- cantitatea de MNP în reactoarele magnetice rămâne neschimbată în timpul măsurătorilor

Pentru a testa îndeplinirea condițiilor, s-a efectuat după fiecare experiment o măsurătoare de control.

1.1.2 Verificarea optică a camerei de reacție

În timpul măsurătorii chipul s-a inspectat optic cu un microscop dotat și cu o cameră cu viteză de capturarea imaginii ridicată. S-a stocat ca și referință perspectiva de plan a chipului (P_{ref}) înaintea evaluării secvenței de măsurare. La sfârșitul pasului i a secvenței de măsurare, perspectiva de plan a chipului s-a setat din nou ($P_{seq,i}$) și s-a comparat cu referință, după cum urmează:

$$P_{diff}(j,k) = \begin{cases} P_{ref}(j,k), & P_{ref}(j,k) - P_{seq,i}(j,k) < 0 \\ 0, & P_{ref}(j,k) - P_{seq,i}(j,k) \geq 0 \end{cases}$$

unde (j,k) sunt coordonatele pixelilor din imaginea planului, astfel schimbările față de referință sunt arătate cu pixeli albi. Numărul total al pixelilor albi se definește ca scorul diferenței de celule (*cell difference score SC*), folosit ca și marker pentru a descrie schimbările în aranjamentul stratului de MNP.

1.1.3 Analiza CFD a celulei de reacție

S-a analizat modelul 3D al unei singure celule de reacție. Într-un volum dat condiția celulei poroase s-a aplicat pentru a modela spațiul ocupat de MNPs. Scăderea de presiune s-a măsurat la 7 debite în intervalul $10 \mu\text{L min}^{-1}$ - $80 \mu\text{L min}^{-1}$ cu și fără MNPs în camere, rezultând căderi de presiune specifice de $0.086 \text{ kPa } \mu\text{L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ și $0.059 \text{ kPa } \mu\text{L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Fiind curgere laminară în canale, presiunea este proporțională cu viteza:

$$\text{grad } p = -\mu Dv$$

unde μ este viscozitatea dinamică a fluidului, p este presiunea măsurată iar v este viteza la intrare. D reprezintă rezistența viscoasă a materiei poroase (stratul de MNPs). Presupunând parametrii din baza de date a software-ului, s-a aflat că $D=2.071 \times 10^{10} m^{-2}$.

Rezultatele CFD sunt prezentate pentru două cazuri relevante în Figura 3c și d. În primul caz stratul de nanoparticule umple în totalitate camera, iar în al doilea caz stratul de MNP este parțial distrus datorită prezenței bulelor de aer.

Erori în stratul de MNP detectate de inspecția vizuală

Stratul de MNP poate fi deteriorat în reactoarele magnetice datorită forțelor de antrenare interne la debite ridicate și a bulelor de aer formate în timpul reacției sau a bulelor de aer nedorite provenite din surse externe, care pot intra în interiorul chipului în timpul măsurătorilor.

Inspecția vizuală a camerei oferă o măsurare continuă a schimbărilor majore în structura stratului de MNP. S-a caracterizat aranjarea actuală a stratului printr-o comparație cu imaginea inițială (de referință) (SC-scor de diferență). Efectul bulelor de aer se poate observa în Figura 3.

În practică, valori ale SC sub 2000 în general indică schimbări neglijabile. Valori ale $SC > 3000$ pot indica schimbări structurale majore ale stratului de MNP, de exemplu trecerea completă a unei bule (Figura 3b). În general bulele de aer nu se sparg la intrarea în canal, ci se deplasează pe o parte a peretelui camerei. Simulările numerice au arătat că profilul vitezei devine asimetric datorită trecerii bulelor, iar debitul global prin stratul poros de MNP scade semnificativ ($28.6 \mu\text{L min}^{-1}$ în comparație cu $20.7 \mu\text{L min}^{-1}$). În plus, bulele pot deplasa particule, scăzând astfel masa biocatalizatorului. Astfel, activitatea biocatalitică a celulei scade, iar măsurătorile devin nefiabile.

Evaluarea fiabilității măsurătorilor

Evaluarea fiabilității măsurătorilor se bazează în general pe următorii parametri:

- 1) SC – Peste $SC > 4000$ măsurătoarea s-a respins
- 2) Măsură de control – Peste o eroare de 5% măsurătoarea s-a respins.

În tabelul 1 sunt sumarizate evaluările fiabilității măsurătorilor.

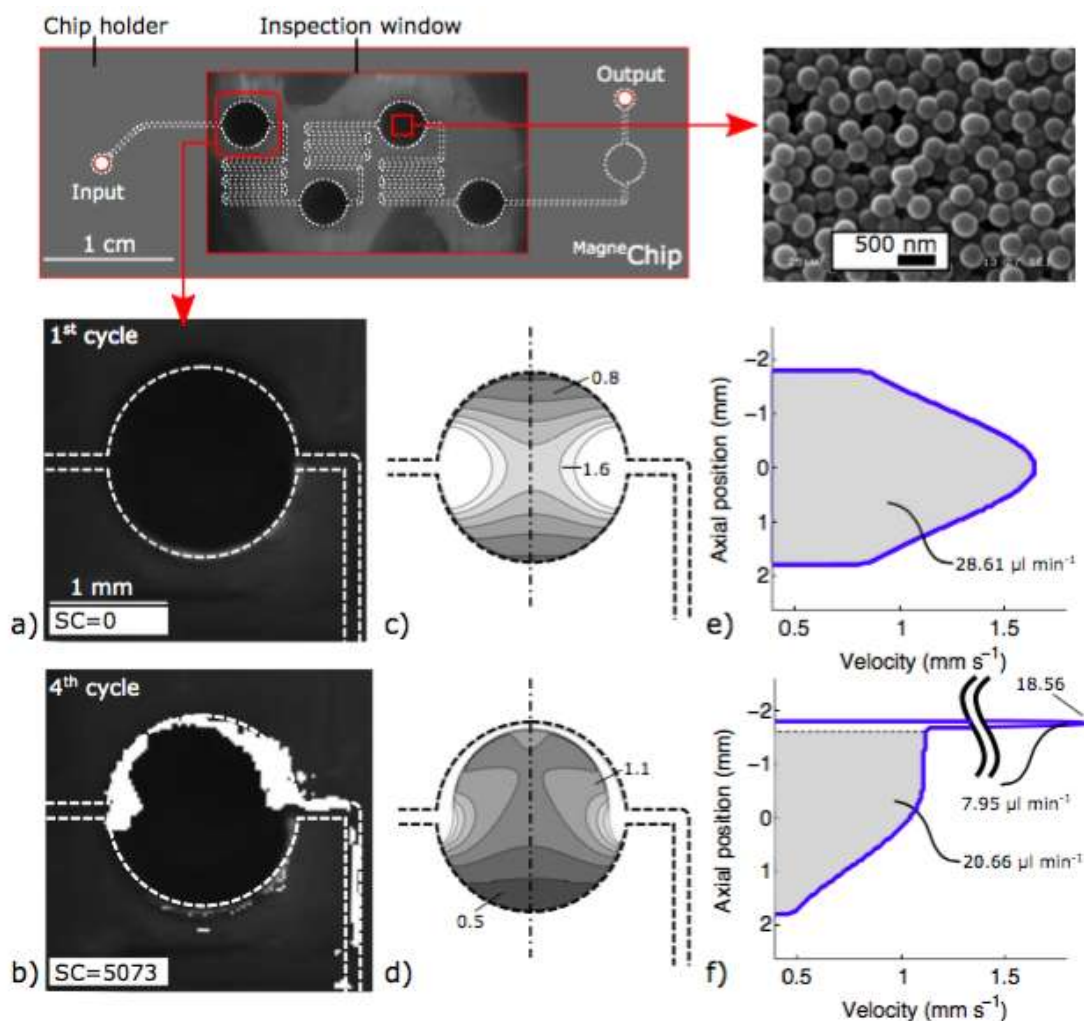


Figura 3 – Dispozitiv Magne-Chip cu patru microcamere încărcate cu MNPs. Imagini SEM al stratului de MNP (dreapta). a)-f): Efectul bulelor de aer a) fotografie înainte de trecere b) imaginea diferențială (scor de diferență $SC=5073$), după trecere c) viteza calculată a debitului înainte și d) după trecere, e) profilul vitezei în secțiunea de mijloc al camerei înainte și f) după trecere

Tabel 1 – Sumarul evaluării fiabilității măsurătorilor

Experiment	% Eroare din măsurătoarea de control (%)	SC medie	SC maxim	Evaluare
Umpleri multiple, încărcare cu MNP	3.1	-	-	Acceptat
Parametru unic ciclic (încercarea 1)	1.4	1322	1609	Acceptat
Parametru unic ciclic (încercarea 2)	32.0	4158	5742	Respins
Optimizare debit	3.2	196	338	Acceptat
Screening de substrat	1.5	1691	2000	Acceptat

1.2 Reproducibilitatea măsurătorilor individuale

1.2.1 Omogenitatea suspensiei și efectul umplerii camerelor cu MNP

Biotransformarea L-fenilalaninei (L-1a) la acid (E)-cinamic (2a) mediată de suspensia de biocatalizator MNP (Schema 1) s-a realizat în sistem batch în trei cazuri independente, rezultând $U_B = 2.91 \pm 0.08 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ceea ce demonstrează omogenitatea corespunzătoare a suspensiei de MNP.

O cameră a Magne-Chipului s-a umplut prin aplicarea unui câmp magnetic a unui magnet permanent mic, cu aceeași suspensie de MNP și aceeași reacție s-a efectuat în curgere continuă și s-a monitorizat prin UV-VIS on-line. Magnetul camerei s-a deconectat ulterior, iar MNP-ul s-a colectat în următoarea cameră. Experimentul s-a repetat de trei ori, rezultând $U_B = 8.01 \pm 0.14 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Rezultatele sugerează că nici omogenitatea suspensiei de MNP nici procedura de umplere a camerelor nu a avut efect considerabil asupra reproductibilității experimentelor. Diferența semnificativă dintre valorile U_B sugerează o reacție mai eficientă în Magne-Chip.

Productivitatea biocatalizatorului MNP în chip a depășit de mai mult de trei ordini de mărime productivitatea reacției batch ($8.82 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vs. $3.13 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Reinițializarea chipului și reutilizarea biocatalizatorului în măsurători ciclice

Magne-Chipul s-a umplut cu biocatalizatorul MNP, iar biotransformarea L-fenilalaninei la acidul (E) cinamic s-a efectuat în 7 cicluri consecutive, în timp ce chipul s-a reinițializat între pași prin eliminarea completă a substratului și a produsului prin spălare. Graficul de absorbantă din Figura 4 arată schimbarea concentrației acidului cinamic, măsurată la lungimea de undă de 290nm. Se poate observa că chipul s-a reinițializat cu succes în fiecare ciclu în timpul experimentului, iar reacția s-a repetat de 7 ori urmând aceeași cinetică.

S-a calculat pentru fiecare ciclu cantitatea de produs format. În Figura 5 sunt prezentate rezultatele a două experimente independente. La prima încercare (Figura 5, coloane albastre) stratul de MNP a rămas stabil în timpul experimentelor, rezultând o cantitate medie de produs de $P = 0.12 \pm 1.5\% \mu\text{mol}$. $SC = 1322$ (1609 max) reflectă, de asemenea, schimbări neglijabile în stratul de MNP. Totuși, valoarea semnificativ mărită $SC = 4158$ (5742 max) de la a doua încercare (Figura 5, coloane roșii) indică deteriorarea stratului de MNP datorită bulelor.

Rezultatele sugerează o reproductibilitate excelentă în cazul reinițializării periodice a chipului.

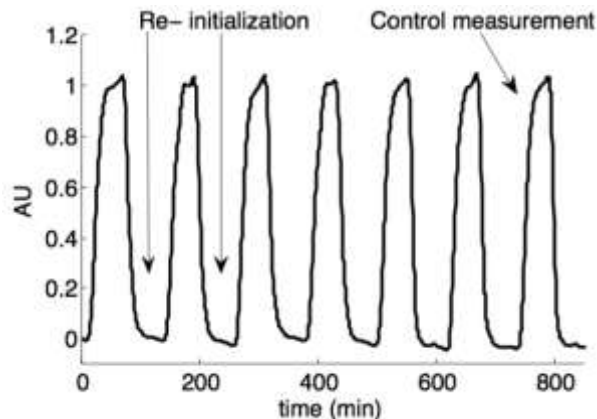


Figura 4 – Graficul de timp a schimbării periodice a absorbanței în timpul măsurătorilor ciclice. (încercarea 1, strat stabil). Chipul este reinițializat între etapele reacției prin îndepărtarea completă substratului și a produsului prin spălare. Ultima măsurătoare reprezintă control în fiecare experiment.

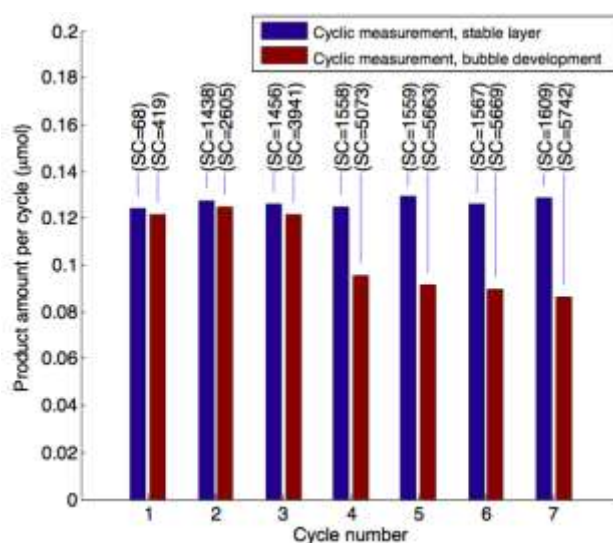


Figura 5– Cantitatea de produs P pe ciclu de reacție în timpul măsurătorilor ciclice cu parametri nemodificați.

Determinarea debitului optim pentru biotransformarea cu L-1a

Magne-Chipul s-a umplut cu biocatalizatorul MNP iar biotransformările L-1a la 2a s-au realizat la debite diferite în 7 cicluri consecutive, în timp ce chipul s-a reinițializat la sfârșitul fiecărui ciclu, fiind apoi stabilit un nou debit de substrat. Cel mai mic debit ales a fost de $3.6 \mu\text{L min}^{-1}$ care s-a mărit în ciclurile următoare până la $28.6 \mu\text{L min}^{-1}$ (Figura 6). Diferențele între activitatea biocatalitică specifică (U_B) a măsurătorilor de referință și de control au fost de doar 3%, ceea ce arată că nici cel mai mare debit nu determină schimbări ireversibile ale activității enzimaticе.

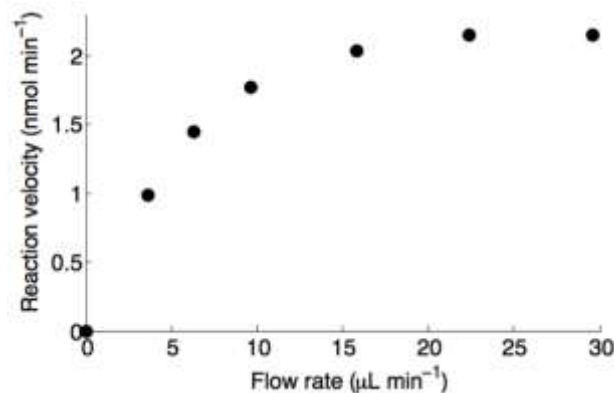


Figura 6 – Dependența de debit a vitezei de reacție în Magne-Chip la transformarea L-Phe în acid (*E*)-cinamic acid mediată de MNP-PAL.

S-a calculat pentru fiecare ciclu viteza de reacție. Prin creșterea debitului a crescut și viteza de reacție, până s-a ajuns la saturație la cca. $25 \mu\text{L min}^{-1}$.

Determinarea concentrației de substrat de saturație pentru L-1a

Magne-Chipul s-a umplut cu biocatalizatorul MNP iar biotransformările L-1a la 2a s-au realizat la concentrații diferite de L-1a, în 10 cicluri consecutive, în timp ce chipul s-a reinițializat la sfârșitul fiecărei ciclu și s-a stabilit o nouă concentrație de substrat (Figura 7). S-a constatat că reacția urmează o cinetică de ordinul întâi până la $[S]=3 \text{ mM}$, și se saturează la $[S]=20 \text{ mM}$.

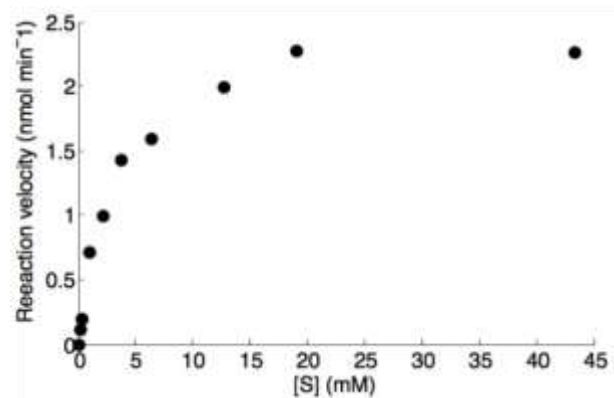


Figura 7 – Dependența vitezei de reacție de concentrația de substrat în Magne-Chip la transformarea L-1a la 2a catalizată de MNPs . Valoarea saturației s-a atins la 20 mM

Screening-ul de substrat cu biocatalizatorul MNP în sistemul Magne-Chip

Experimentele de screening s-a realizat cu substratul natural (L-1a), patru analoguri de fenilalanină cunoscuți ca și substrat pentru PcPAL (*rac*-1c-f) și un npu substrat, 4-

bromofenilalanina (*rac-1b*), care nu s-a mai testat pentru *PcPAL* (Schema 1). În primul rând s-au determinat coeficienții de extincție (Tabelul 2) pentru produșii de eliminare (**2a-f**, Schema 1), la lungimile de undă selectate (Figura 8).

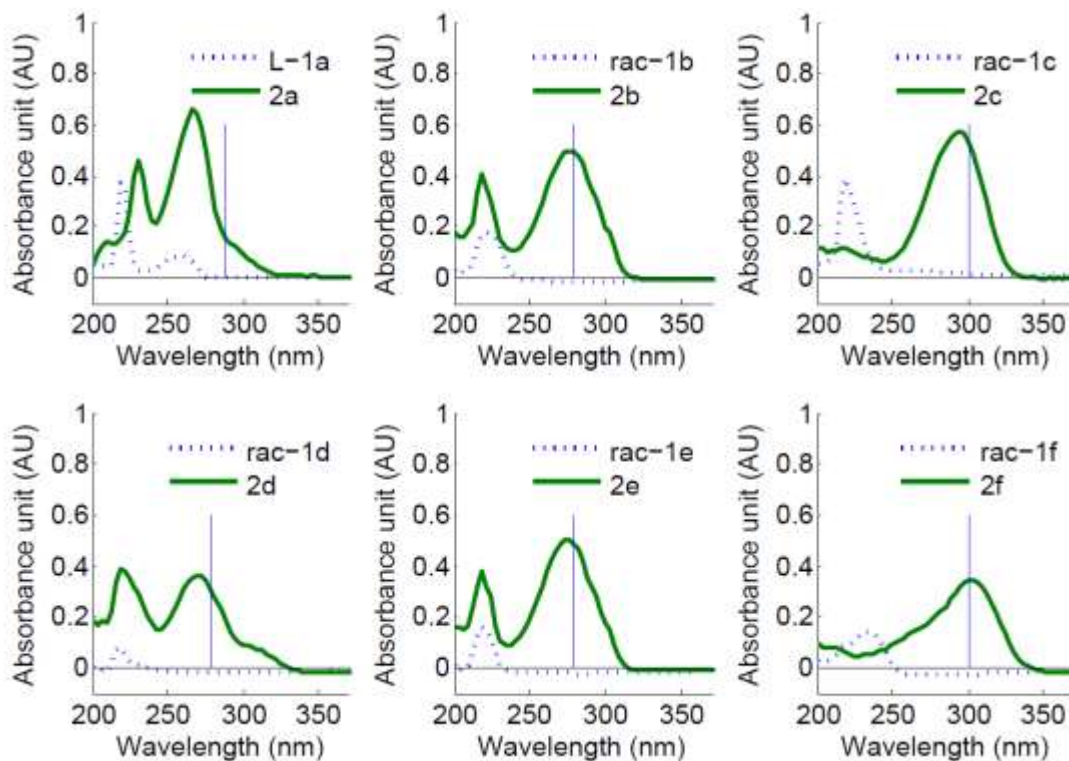


Figura 8 – Spectrele de absorbție ale *L-1a* și *rac-1b-f* (linii verzi) și ale acizilor acrilici corespunzători **2a-f** (linii mov punctate). Coeficienții de extincție s-au determinat la lungimile de undă indicate de liniile albastre.

Tabel 2 – Coeficienții de extincție pentru acizii acrilici investigați **2a-f**

<i>Acid acrilic</i>	<i>Lungime de undă (nm)</i>	<i>Coeficient de extincție ($M^{-1}cm^{-1}$)</i>	<i>Coeficient de regresie liniară</i>
2a	290	8800	0.991
2b	300	10200	0.998
2c	300	7919	0.988
2d	280	14721	0.993
2e	280	9172	0.991
2f	280	15327	0.998

Experimentele screeningului de substrat s-au realizat cu încărcare de chip unic, folosind soluțiile cu substraturi diferite. În prima etapă s-a măsurat eliminarea amoniacului din *rac-1a*. Acest exemplu s-a ales ca și referință pentru compararea cu celelate reacții de eliminare cu substraturi analoage ale PAL. Surprinzător, la debite mari, activități biocatalitice în Magne-Chip sunt mai ridicate în cazul substraturilor nenaturale (*rac-1b,c,e,f*), comparativ cu substratul natural L-**1a** (Figura 9).

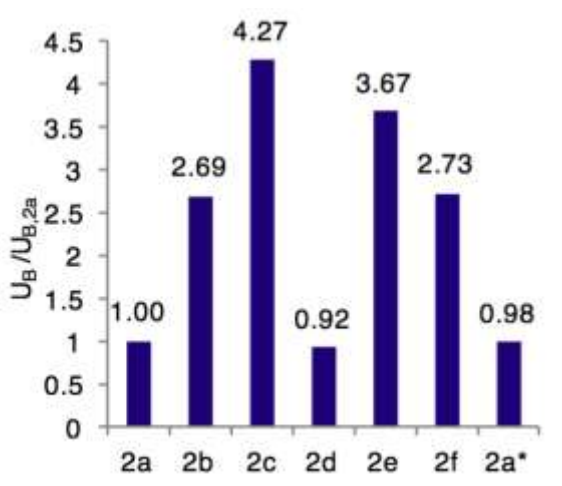


Figura 9 – Comparația activității biocatalitice a enzimei *PcPAL* immobilizate pe MNPs folosind ca și substraturi L-**1a** și *rac-1b-f* în sistem Magne-Chip ([S]= 20 mM, debit: 48.6 $\mu\text{L min}^{-1}$).

Este de remarcat faptul că toate cele 4 substraturi nenaturale care au arătat activitate biocatalitică (U_B) mai mare decât L-fenilalanina conțin mai multe fragmente aromatice electron atrăgătoare decât gruparea fenil. Această deviație semnificativă în rândul productivității, observată cu *PcPAL*, s-ar putea datora contribuției reduse a reacției inverse la viteza reacției directe în sistem de curgere continuă la debite mari.

Metode

Immobilizarea *PcPAL* pe MNPs

Într-o soluție tampon TRIS (3 mL, 0.1 M, pH 8.8) s-au adăugat epoxi-MNPs [MagneCat-250GP14 (nanoparticule magnetice funcționalizate cu grupări epoxi cu un diametru mediu de 250nm) 108 mg] și s-au dispersat prin ultrasonare (35 kHz, 20 min). Suspensia de MNP s-a

adăugat la o soluție de PcPAL (3 mg mL^{-1} , în soluție tampon TRIS: 4 mL, 0.1 M, pH 8.8) iar amestecul de reacție s-a agitat timp de 24 h ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, 450 rpm). Nanoparticulele învelite cu PAL s-au fixat pe fundul balonului cu un magnet iar supernatantul s-a decantat. Preparatul de MNP s-a spălat cu soluție tampon TRIS ($3 \times 4 \text{ mL}$, 0.1 M, pH 8.8) și cu etanol (4 mL). Biocatalizatorul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de 2 ore. După imobilizare în supernatant s-a determinat o cantitate neglijabilă de proteină, determinată prin metoda Bradford.

Sistem microfluidic cu patru celule de microreactoare magnetice (Magne-Chip)

Reacția cu biocatalizatorul MNP s-a realizat într-un microchip compus din patru camere de câte $1.1 \text{ } \mu\text{L}$. Chipurile sunt realizate din PDMS (polidimetilsiloxan, Sylgard 184, Daw Corning Ltd, Germany) legate pe un suport de sticlă. Dimensiunile microcanalelor: lățime $300 \text{ } \mu\text{m}$ și înălțime $110 \text{ } \mu\text{m}$; dimensiunile celulei de reacție: volum de $1.1 \text{ } \mu\text{L}$, diametru of 3.6 mm , înălțime $110 \text{ } \mu\text{m}$.

Chipul s-a fixat pe un suport microfluidic de chip (Fluidic Connect Pro, Micronit Inc, The Netherlands).

Sistemul este operat de software-ul $\mu\text{FLU Studio}$ (dezvoltat pentru platforma Magne-Chip), care controlează pompele, valvele și termostatul, achiziționează datele senzorului (ex. resiunea de intrare), inspectează optic chipul și colectează datele spectrofotometrului.

Umplerea microreactorului Magne-Chip cu MNPs

Într-un tub Eppendorf s-a preparat o suspensie (volum total 1.5 mL) constând din biocatalizatorul MNP (3.3 mg mL^{-1}) și Peg-400 (3.3 mg mL^{-1}) într-un amestec de 5:1 apă ultrapură și 2-propanol. Amestecul de reacție s-a sonicat timp de 15 minute la baie de ultrasunete (EMAG EMMI 15HC) la $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Înainte de procesul de umplere suspensia s-a mai sonicat o dată timp de 10 minute. În timpul procesului de umplere chipul s-a menținut la temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. În timpul încărcării chipului, pentru a evita sedimentarea, s-a ales o agitare ușoară de 700 rpm. Magneți de neodimiu s-au plasat în sertare deplasabile, care permit cumutarea “on/off” a câmpului magnetic atunci când sunt plasate sub celulele magnetice.

Curățarea chipului

Pentru curățarea microcanalelor s-a folosit o soluție de detergent (1:99 amestec de EMAG EM-080 și apă ultrapură). După reacție, prin poziționarea sertarelor deplasabile pe poziția “off”,

câmpul magnetic s-a inactivat și s-au spălat succesiv cu: soluție tampon TRIS (0.1 M, pH 8.8), soluție de detergent și apă ultrapură, timp de 2 minute fiecare, la un debit de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Reacții enzimatică în sistem batch

Biocatalizatorul MNP s-a testat în reacția de eliminare de amoniac din L-**1a** în nouă procese paralele. Pentru a asigura omogenitatea completă, biocatalizatorul (2.0 mg) și PEG 400 (2.0 mg) s-au suspendat în TRIS (1 mL, 0.1 M, pH 8.8) prin sonicare timp de 30 de minute. În fiecare reacție 500 μL MNP s-a adăugat la 500 μL soluție de L-**1a** (40 mM în soluție tampon TRIS; 0.1 M, pH 8.8), iar amestecul de reacție s-a agitat pe termoshaker Eppendorf (850 rpm, 30 °C) timp de 20 de minute. MNP s-a colectat cu magnet, iar conținutul de produs (**2a**) din supernatant s-a determinat la $\lambda = 290 \text{ nm}$ la 30 °C cu spectrofotometru UV-VIS (Milton Roy, Genesys 2).

Reacții enzimatică în Magne-Chip

Tabelul 3 Setările platformei Magne-Chip care s-au aplicat în timpul experimentelor.

Experiment	Stoc de substrat ¹	Schimbire de parametru	Debit de substrat ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Debit spălare ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Nr. de cicluris ²	Masa de MNP ³ (mg)
Încărcare multiplă de MNP	A – L- 1a	Const. [Var. a)]	48.6 (pt. 10 min)	440 (pt. 5 min)	4 (în 1 h)	0.25 (într-o celulă)
Încărcare unică, parametru unic	A – L- 1a	Const. [Var. a)]	28.6 (pt. 1 h)	28.6 (pt. 1 h)	7 (în 14 h)	1 (în 4 celule)
Optimizare debit	A – L- 1a	Debit: 3.6-28.6 $\mu\text{L min}^{-1}$ [Var b)]	Varied	28.6 (pt. 30 min)	7 (în 7 h)	1 (în 4 celule)
Saturație	A – L- 1a 3.3 mM B – L- 1a 65 mM	[S]: 0.19–43.4 mM [Var c)]	28.6 (pt. 30 min)	28.6 (pt. 30 min)	10 (în 7 hours)	1 (în 4 celule)
Screening de substrat	A – L- 1a B – <i>rac-1b</i> C – <i>rac-1c</i> D – <i>rac-1d</i> E – <i>rac-1e</i> F – <i>rac-1f</i>	Substrat [Var d)]	48.6 (pt. 10 min)	440 (f pt. 10 min)	7 (în 2.3 h)	0.5 (în 2 celule)

¹ Concentrația de substrat 20 mM (dacă nu se specifică altfel).

² Un ciclu este alcătuit din etapa de reacție și etapa de reinițiere

³ Masa biocatalizatorului s-a determinat conform descrierii

Calculul parametrilor cinetici

Concentrația de produs s-a calculat prin integrarea suprafeței din graficul care reda variația absorbției în timp la lungimea de undă specifică a produsului:

$$[P](\text{mM}) = \frac{1}{\varepsilon \Delta t} \int_{t_{\text{start}}}^{t_{\text{end}}} A(t) dt$$

unde ε reprezintă coeficientul de extincție molară, Δt este diferența limitelor de integrare

Cantitatea de produs s-a calculat din concentrația de produs:

$$P(\mu\text{mol}) = [P] \dot{Q} \Delta t$$

unde \dot{Q} este debitul de intrare

Activitatea biocatalitică s-a calculat prin integrarea regiunii de saturație a graficului de absorbantă

$$U_B(\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}) = \frac{\frac{1}{\varepsilon} \int_{t_{\text{end}}}^{t_{\text{sat}}} A(t) dt \dot{Q}}{m \Delta t}$$

unde m este masa totală de MNP.

Viteza de reacție s-a definit ca

$$V(\text{nmol min}^{-1}) = \frac{P}{\Delta t}$$

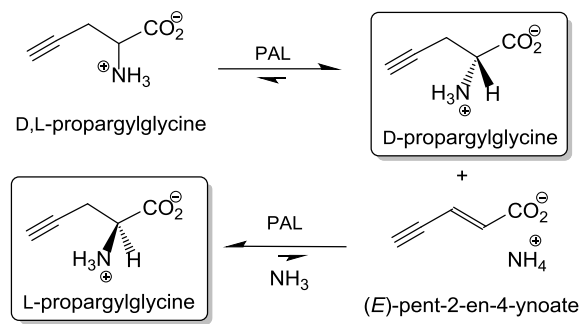
Productivitatea volumetrică s-a definit ca

$$P_V(\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}) = \frac{MP}{V_c \Delta t}$$

unde M este masa molară, V_c este suma volumelor camerelor de reacție.

Procese biocatalitice pentru sinteza enantiopură a derivaților alaninici nearomatici cu ajutorul sistemului Magne-Chip

Folosind sistemul anterior descris s-a realizat sinteza stereoselectivă a D și L-propargilglicinei (Schema 2.) cu randamente bune.



Schema 2. Sinteza D și L-propargilglicinei cu PAL-MNPs.

Schema dispozitivului este redată în Figura 10.

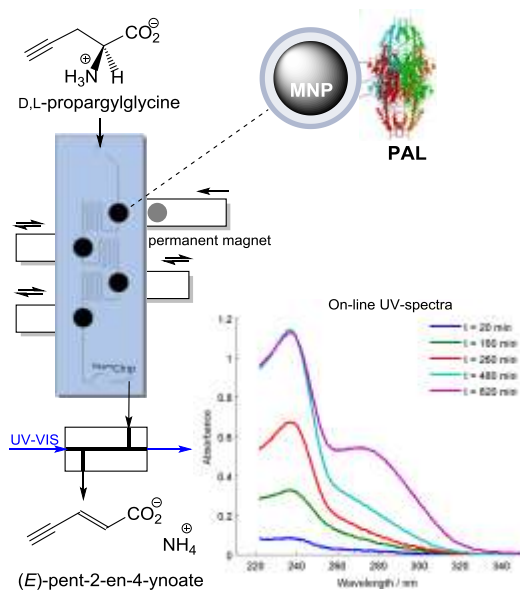


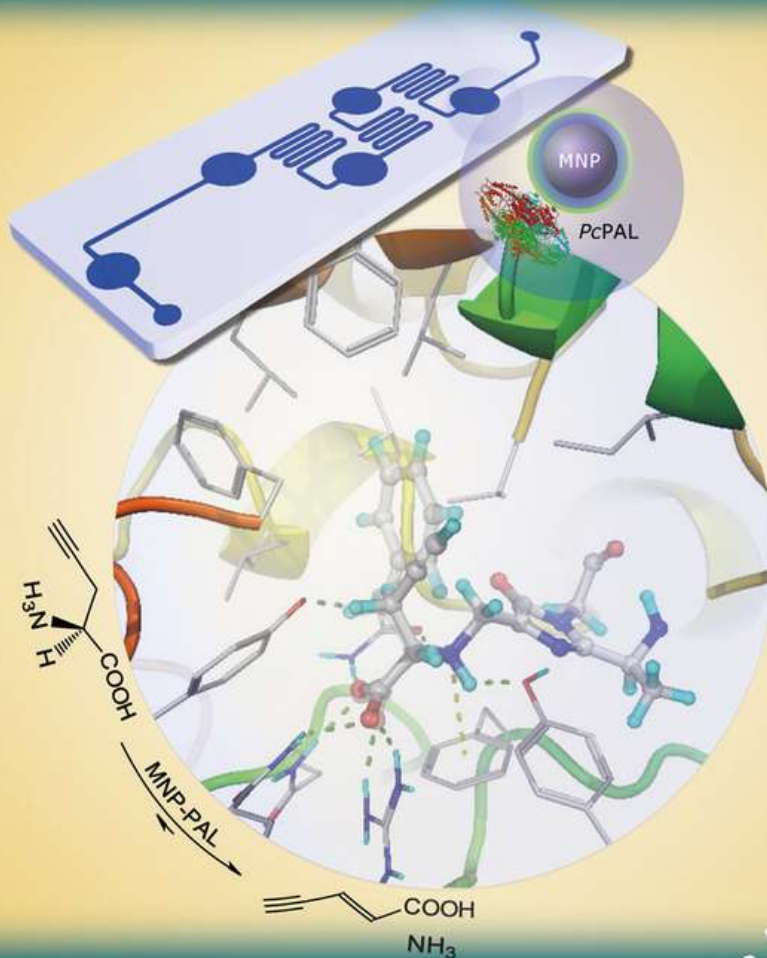
Figura 10. Conversia D,L-propargilglicinei în reactor microfluidic cu celule magnetice multiple umplute cu PAL imobilizat pe nanoparticule magnetice.

Editura revistei CHEMBIOCHEM a invitat autorii publicației rezultate din datele prezentate anterior să elaboreze grafica copertei volumului în care a apărut articolul (Figura 11).

A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY

CHEMBIOCHEM

SYNTHETIC BIOLOGY & BIO-NANOTECHNOLOGY



16/2015

Chemistry & Life Sciences

Front Cover:

C. Paizs, L. Poppe et al.

Phenylalanine Ammonia-Lyase-Catalyzed Deamination
of an Acyclic Amino Acid: Enzyme Mechanistic Studies Aided
by a Novel Microreactor Filled with Magnetic Nanoparticles

WILEY-VCH

www.chembiochem.org

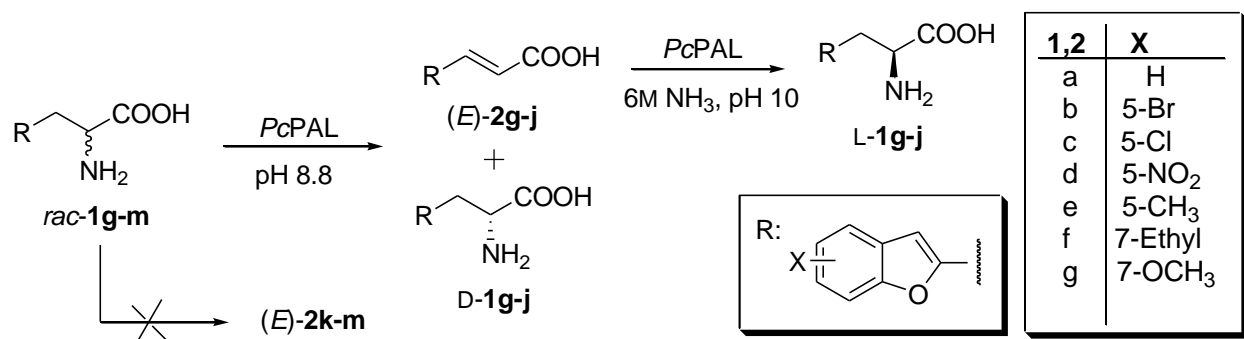
A Journal of



Figura 11. Coperta CHEMBIOCHEM, volumului 16, anul 2015.

Sinteza biocatalitică a derivaților benzofuranici mediată de PAL imobilizat pe nanotuburi de carbon

Benzofuranil alaninele și acrilatii corespunzători sintetizate anterior au fost supuși biotransformării în vas de reacție cu amestecare perfectă cu PAL imobilizat (Schema 3). S-a constatat că analogul nesubstituit, respectiv cei substituiți cu grupări electronatrăgătoare s-au dovedit a fi substraturi ai fenilalanin amoniac liazei, în timp ce structurile care posedă grupări electron respingătoare s-au dovedit a fi inhibitori ai enzimei.



Schema 3. Biotransformări catalizate de PAL imobilizat covalent pe nanotuburi de carbon.

Tabel 3. Excesul enantiomeric și valoarea rotațiilor optice ai aminoacizilor L și D sintetizați.

Substrat	Produs	ee (%)	$[\alpha]_D^{20}$ (10 mg×mL ⁻¹) ^a
<i>rac-8g</i>	D-8g	>98	+14,4
<i>rac-8h</i>	D-8h	>99	+31,0
<i>rac-8i</i>	D-8i	>99	+29,3
<i>rac-8j</i>	D-8j	>99	+21,2
(<i>E</i>)-11g	L-8g	>99	-14,5
(<i>E</i>)-11h	L-8h	>99	-30,8
(<i>E</i>)-11i	L-8i	>99	-29,1
(<i>E</i>)-11j	L-8j	>99	-21,3

^a în CH₃COOH, la 20°C

Sinteza biocatalitică a derivaților alaninici cu ajutorul biotransformărilor celulare

În continuare s-a investigat posibilitatea biotransformării substraturilor descrise anterior folosind celulele *E. coli* intacte folosite pentru expresia PAL-ului: Experimentele cu ajutorul suspensiilor celulare în sisteme cu agitare perfectă (batch) au dus la concluzia că eficiența acestora în raport cu enzimele native este mai scăzută, probabil datorită problemelor de transport-transfer la nivelul peretelui celular. Imobilizarea celulelor prin întrapare în alginat sau matrice de silice au fost

ineficiente, datorită instabilității lor structurale în mediu bazic (reacția de eliminare a amoniacului din aminoacid decurge la pH 8.8, iar cele de adiție de amoniac la acrilat decurge în soluție amoniacală, 6M, pH 10).

Folosirea agenților de reticulare au dus la formarea unor celule imobilizate a căror activitate catalitică a descrescut de circa 300 de ori față de celule neimobilizate.

Concluzii

S-a caracterizat un dispozitiv microfluidic care constă din mai multe camere de reacție de ordinul microlitrilor, umplute cu nanoparticole magnetice învelite cu fenilalanin amoniac liază. Chipul poate fi operat ciclic.

S-a arătat că nici omogenitatea suspensiei de MNP nici procedura de umplere a camerelor nu are un efect semnificativ asupra reproductibilității. Deasemenea s-a constatat și faptul că în măsurători ciclice repetate cantitatea de produs deviază cu doar 1.5% într-un timp de 14 h.

În timpul operărilor ciclice inspecția optică a stratului de MNP și măsurători de control repetate au oferit moduri de evaluare a fiabilității operației. Efectul bulelor s-a investigat atât experimental cât și prin metode numerice. S-a constatat că bulele de aer afectează reproductibilitatea și duce la creșterea valorii SC. S-a evaluat și deviația activității biocatalitice a primului și al ultimului ciclu în fiecare serie de experimente.

Valorile debitului de saturație și concentrației de substrat cu transformarea în chip cu L-fenilalanină la acid (*E*) cinamic sunt $25 \mu\text{L min}^{-1}$ respectiv 20 mM.

În acest studiu s-a testat activitatea biocatalitică în chip a biocatalizator MNP pentru patru substraturi nenaturale cunoscute pentru PAL (*rac-1c-f*) și unul nou (*rac-1b*), în comparație cu substratul natural al enzimei, L-**1a**. S-a arătat că patru dintre cele cinci substraturi nenaturale (*rac-1b,c,e,f*) au depășit activitatea biocatalitică a substratului natural (L-**1a**). În cazul analogului 2-furanil (*rac-1c*), s-a observat o creștere de 4.27 ori a activității față de substratul natural.

În concluzie, s-a dovedit că dispozitivul microfluidic Magne-Chip este un instrument eficient, capabil de screeninguri rapide, eficiente, reproductibile și total automatizate de substraturi pentru PcPAL folosind solvent (~500 μl) și biocatalizator (~1 mg MNP) minim. În comparație cu sisteme batch, reacțiile în chip au depășit productivitatea biocatalizatorului MNP cu mai mult de trei ordine de mărime.

Același dispozitiv a fost folosit cu succes pentru sinteza D și L propargilglicinei

PAL imobilizat covalent pe nanotuburi de carbon s-a dovedit a fi un biocatalizator eficient pentru sinteza a D și L benzofuranil alaninelor ce posedă o grupare electronatrăgătoare legată de unitatea heterociclică.

Biotransformările mediate de celule ce conțin PAL s-au dovedit a fi biocatalizatori ineficienți, Nu este recomandată utilizarea lor nici în suspensie dar nici în formă imobilizată în sinteze la scară preparativă.

Bibliografie selectivă

1. Poppe, L.; Paizs, C.; Kovács, K.; Irimie, F. D.; Vértessy, B. G. *Meth. Mol. Biol.* **2012**, 794, 3–19.
2. Hodgins, D.S. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 2977–2985.
3. Sarkissian, C. N.; Gámez, A. *Mol. Gen. Metab.* **2005**, 86, 22–26.
4. Hughes, A. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry Volume 1. Weinheim Germany: Wiley VCH.* **2009**, p. 94. ISBN 9783527320967.
5. Sheng, J.; Zhang, L.; Lei, J.; Ju, H. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 709, 41–46.
6. Wang, M. S.; Black, J. C.; Knowles, M. K.; Reed, S. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 1309–1318.
7. Song, Y. S.; Shin, H. Y.; Lee, J. Y.; Park, C.; Kim, S. W. *Food Chem.* **2012**, 133, 611–617.
8. He, P.; Greenway, G.; Haswell, S. J. *Microfluid. Nanofluid.* **2010**, 8, 565–573.
9. Gijs, M. A. M.; Lacharme, F.; Lehmann, U. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 1518–1563.
10. Weiser, D.; Bencze, L. C.; Bánóczy, G.; Ender, F.; Kókai, E.; Szilágyi, A.; Vértessy, B. G.; Farkas, Ö.; Paizs, C.; Poppe, L. *ChemBioChem* **2015**, doi:10.1002/cbic.201500444
11. Paizs, C.; Katona, A.; Rétey, J. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2739–2744.
12. Paizs, C.; Katona, A.; Rétey, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1113–1116.
13. Gloge, A.; Zoń J.; Kővári, Á.; Poppe, L.; Rétey, J. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3386–3390.
14. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
15. Bartha-Vati, J. H.; Tosa, M.I.; Irimie, F.D.; Weiser, D.; Boros, Z.; Vértessy, B.; Poppe, L.; Paizs, C. *ChemCatChem* **2015**, 7, 1122–1128.
16. Ender, F.; Weiser, D.; Nagy, B.; Bencze, L.C.; Banoczy, G.; Ender, F.; Kiss, R.; Kokai, E.; Szilagy A.; Vértessy, B.; Farkas, O.; Paizs, C.; Poppe, L. *ChemBioChem* **2015**, 16, 22983–2288