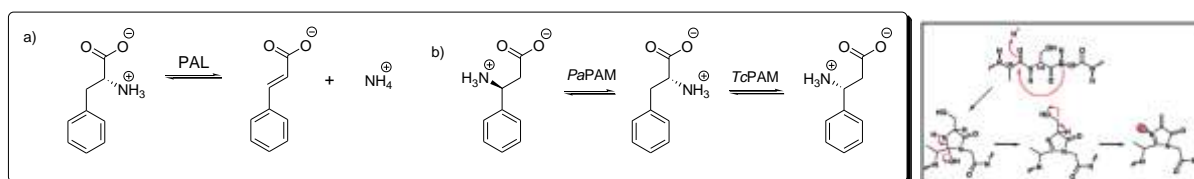


**AMONIAC LIAZE SI AMONIAC MUTAZE NATIVE SI MUTANTE IMOBILIZATE
PENTRU OBTINEREA ANALOGILOR DE ALFA- SI BETA-FENILALANINA**

1.PAL si PAM native si mutante

Fenilalanin amoniac liazele (PAL; EC 4.1.3.24) catalizează deaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei în acid (*E*)-cinamic, iar fenilalanin 2,3-aminomutazele (EC 5.4.3.x) catalizează izomerizarea L-fenilalaninei la L- sau D-β-fenilalanine, în funcție de originea enzimei (Schema 1.1.). În timp ce PAL sunt frecvente în plante, unde au un rol esențial în formarea fenilpropanoidelor, au fost identificate până în prezent doar câteva PAL bacteriene. PAL și PAM sunt folosite ca biocatalizatori pentru sinteza L-α-amino acizilor din acrilaiți (PAL), în procese de rezoluție cinetică cu formarea D-α-aminoacizilor din racemați (PAL), sau pentru sinteza L- sau D-β-arilalaninelor (PAM).



Schema 1.1. Reacții catalizate de PAL și PAM. Formarea posttranslațională a grupării puternic electofile MIO.

PAL este un homotetramer alcătuit din subunități monomerice care pot fi împărțite în trei domenii. Primul este domeniul MIO catalitic, în care se află gruparea prostetică. Secvența de aminoacizi care codifică această grupare prostetică este strict conservată. Al doilea domeniu este domeniul central, iar al treilea domeniu este domeniul cunoscut sub numele de “shielding-domain” care se presupune a avea un rol de apărare și/sau regulator (**Figura 5.**). Domeniile sunt conectate cu bucle mobile. Gruparea MIO se formează în urma ciclizării posttranslaționale, autocatalitice a unei tripeptide interne Ala-Ser-Gly, prin eliminarea a două molecule de apă.

Inițial am exprimat în *E. coli* PAL din pătrunjel PcPAL(eucariotic) și PAL dintr-o bacterie termofilă *Rubrobacter xylanophilus* RxPAL radiotolerantă (NCBI cod: YP_644511.1, Uniprot cod: Q1AV79, care codifică 540 AA) cu creștere optimă la 65°C și am investigat proprietățile acestora.

Aceasta din urmă a fost găsită prin folosirea programului/algorithmului BLASTp din baza de date non-redundantă pentru proteine NCBI utilizând secvența de la PAL provenită de la *Photobacterium luminescens* (PIPAL) (Duchaud et al. 2003, Williams et al. 2005) (Uniprot cod: Q7N4T3). În urma rezultatelor favorabile (cod: YP_644511.1, care codifică 540 AA) se presupune faptul ca aceasta poate fi fenilalanina/ histidin amoniac liaza care provine de la bacteria termofilă *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941.

Gena care codifică PAL provenită de la *Rubrobacter xylanophilus* a fost optimizată la nivelul codonului pentru a putea fi exprimată în *Escherichia coli*. Folosind tehnica PCR, gena nou sintetizată – formată din 1632 perechi de baze – aflată în vectorul de clonare pMK și clonată în vectorul de expresie pBAD-HisB, are o etichetă de 6 histidine la capătul N-terminal, astfel încât poate fi purificată cu ușurință din lizat cu cromatografie Ni-NTA. Alte avantaje oferite de noul vector sunt reglarea exprimării și inducția dependentă de concentrație, care permite modularea nivelelor de exprimare. Primul pas în purificarea plasmidelor a constat în obținerea celulelor competente de XL1Blue care au fost transformate și selectate prin însămânțare pe mediu LB solid cu tetraciclină, rezistență corespunzătoare tulpinei, respectiv carbenicilină, pe baza genelor de rezistență la antibiotic codate în plasmide. Vectorul rezultat a fost confirmat prin secvențiere folosind promotorul pBAD și amorsele (primerii) “forward” și “reverse” (5’-CCTGACGCTTTTTATCGCAACTC-3’ și respectiv 5’-GAGGCATCCTGGTACCCAG-3’).

După optimizarea expresiei, RxPAL a fost supraexprimată în *E. coli* TOP 10 într-o formă solubilă cu capătul N-terminal care conține His6-tag (RxPAL). Proteina recombinată RxPAL a fost purificată prin cromatografie de afinitate folosind Ni-NTA. Pentru a analiza exprimarea (probele: înainte de inducție, înainte de lizare, resturile celulare și supernatantul după sonicare) și purificarea s-a folosit electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE). După cum se poate vedea și în imaginile gelurilor (**Figura 1.1.**), enzima RxPAL, cu masă moleculară de 58.4 kDa, a fost produsă și purificată cu succes.

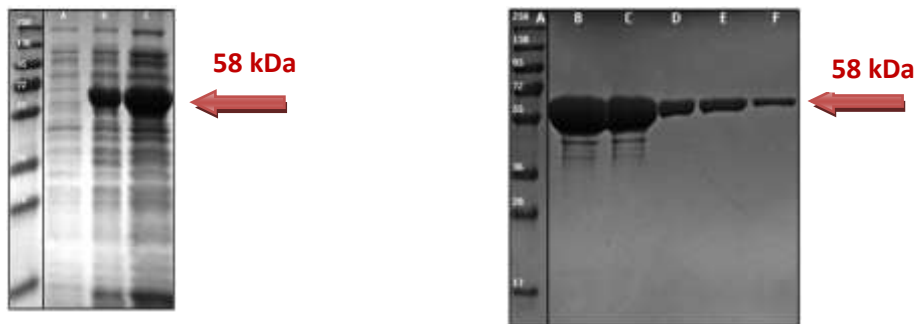


Figura 1.1. Verificarea exprimării (a) și purificării (b) proteinei fenilalanin amoniac-liaza *Rubrobacter xylophilus* (RxPAL) în tulpina *E. coli* TOP10a. ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 17 kDa – 250 kDa; **A**- cultură de celule înainte de inducție **B**- lizat bacterian; **C**-supernatant cu proteina recombinată. **A**- ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 17 kDa–250 kDa; **B - F** -fracțiile după eluarea proteinei de pe coloană

Activitatea enzimei a fost urmărită prin spectrofotometrie, la lungimea de undă de 290 nm, prin monitorizarea formării produsului ((*E*)-acid cinamic) din substratul natural, fenilalanina. În primul rând s-a pus accent pe determinarea pH-ului optim al enzimei, măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon păstrând tăria ionică și temperatura constantă, în domeniul de pH 6.5-12, timp de 7 minute. S-a ajuns la profilul de pH din **Figura 1.2**. În reprezentarea pantelor în funcție de pH (graficul din partea dreaptă) se observă două valori de pH optim, primul la 8.5, al doilea la 11,2. Datele găsite în literatura de specialitate sunt similare cu primul pH optim, 8.5, însă în cazul acesta cea mai mare activitate a fost înregistrată la pH 11.2.

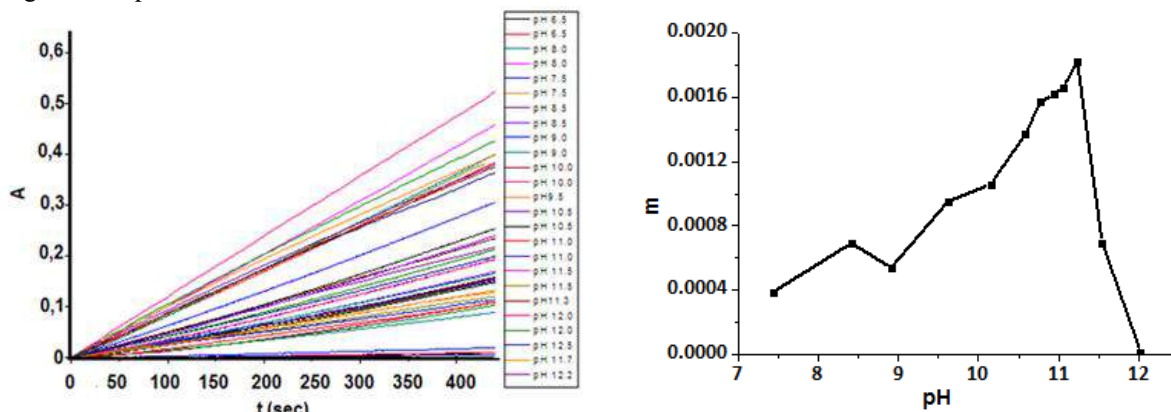


Figura 1.2. Profilul de activitate al RxPAL în condiții diferite de pH

Stabilitatea termică a enzimei s-a determinat prin măsurători termofluorometrice la o concentrație de 2 mg/mL RxPAL. La început, pentru a determina pH-ul optim în privința temperaturii de topire (T_m), măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon 100 mM, în domeniul de pH 6-12. Din profilul de pH (**Figura 1.3.a**) se observă că temperatura de topire maximă se atinge în domeniul pH 8- 8.5 și este aproximativ 63°C.

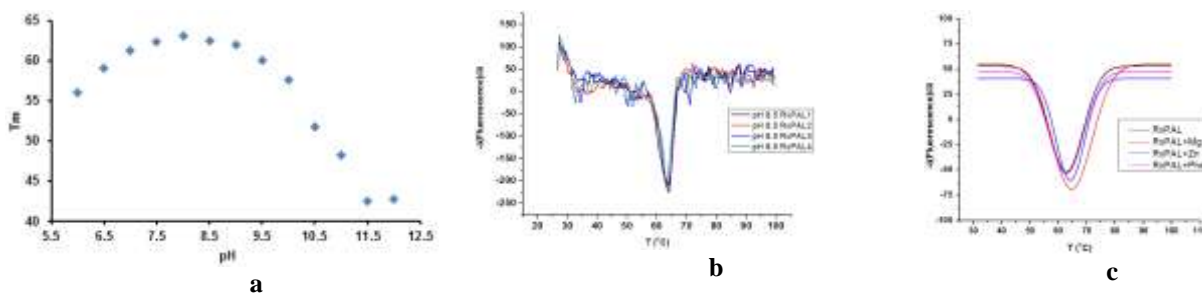


Figura 1.3. Profilul de temperatură de topire al RxPAL în condiții diferite de pH

Următoarele măsurători s-au făcut în soluție tampon Tris-HCl, pH 8.5 la diferite concentrații de substrat (**Figura 1.3.b**), apoi în prezența unor ioni metalici (Mg^{2+} , Zn^{2+}) sau fenilalanină (**Figura 1.3.c**). Temperatura de topire a fost citită din curba negativă a derivatei de gradul întâi a curbei experimentale. Comparând rezultatele măsurătorilor în prezența substratului cu cele în absența acestuia se observă că temperatura de topire (63°C) nu este modificată deprezența fenilalaninei, în schimb, ionul de Mg^{2+} în concentrație de 0.3 mM mărește cu 1.9°C iar ionul de Zn^{2+} în concentrație de 0.2μM mărește cu 1,4°C temperatura de topire a proteinei.

În scopul de a analiza **stabilitatea structurii enzimei** s-au efectuat măsurători de spectroscopie de dicroism circular DC în prezența produsului natural al reacției enzimatice, acidul cinamic, deoarece spectrul fenilalaninei se suprapune peste cel al

proteinei. Măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon păstrând temperatura constantă (20°C), în domeniul de pH 6.5-12, la o concentrație RxPAL de 2 mg/mL.

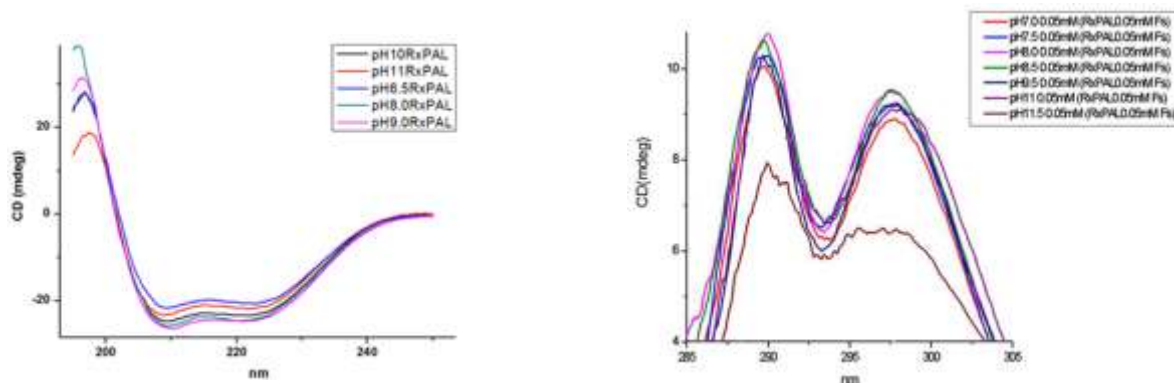


Figura 1.4. Spectrele de DC ale RxPAL în UV îndepărtat și UV apropiat la diferite valori ale pH-ului

Spectrele de DC (Figura 1.4) indică faptul că enzima nu prezintă modificări semnificative în ceea ce privește structura secundară, terțiară și cuaternară a enzimei în intervalul de pH 6.5-11.2, ceea ce înseamnă că structura este foarte bine păstrată în acest interval de pH. De asemenea se poate observa că, la valori mai mari de 11.5 ale pH-ului, o parte a structurii enzimei se deteriorează.

Activitatea enzimatică a fost determinată prin monitorizarea formării acidului (*E*)-cinamic din fenilalanină în UV la 290 de nm, la diferite concentrații ale substratului (10-40 mM). Măsurătorile au fost efectuate în soluție CAPS de concentrație 100 mM cu pH 11.4 concentrația enzimei fiind 2 μM. Constantele Michaelis-Menten rezultate au fost $K_m = 1$ mM iar $k_{cat} = 10^{-4} s^{-1}$. O posibilă explicație pentru aceste valori ar putea fi faptul că nucleofilul 2-sulfaniletanol folosit la purificare reacționează cu gruparea prostetică MIO puternic electrofilă formând un aduct ce inhibă ireversibil enzima. În lipsa agentului reductiv grupările tiolice interacționează intermolecular formând agregate enzimice (cross-linked enzyme aggregates-CLEA), ceea ce duce la precipitare [1].

Parcurgând etapele mai sus menționate s-a caracterizat și PAL-ul eucariotic din *Petroselinum crispum* (pătrunjel, PcPAL). În contrast cu RxPAL, activitatea PcPAL e maximă la 37°C și pH 8.8. Mai mult, valorile K_m 30mM și $k_{cat} = 34 s^{-1}$, secondat de faptul că PcPAL s-a dovedit un biocatalizator util în biotransformarea analogilor nenaturali ai fenilalaninei, califică această enzimă cu un potențial superior față de RxPAL. Totuși a fost evidențiată, prin măsurătorile de activitate enzimatică, DC și termofluorometrie, o inactivare relativ rapidă a PcPAL.

Comparând omologii eucariotic cu cei procariotici se poate afirma că aceștia din urmă conțin cu aproximativ 20% mai puțini aminoacizi în structura lor. Bucla multihelix C-terminal de aproximativ 200 de aminoacizi, existentă în PAL-uri eucariote, se situează în jurul situsului catalitic restricționând atașarea substratului, respectiv decuplarea produsului de reacție de enzimă (Figura 1.5). Mai mult, se presupune ca aceste bucle destabilizează structural enzimele.

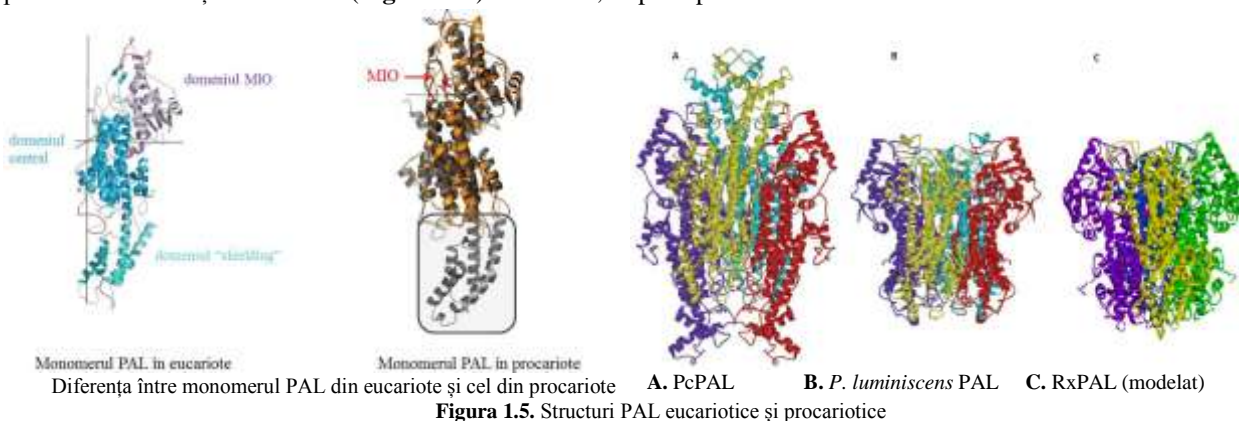


Figura 1.5. Structuri PAL eucariotice și procariotice

În privința termostabilității RxPAL au fost luați în considerare 2 factori: posibilitatea de formare de punți disulfurice și respectiv ionice. Au fost detectate 3 posibilități de formare de punți disulfurice într-un monomer (Figura 6a): Cys₃₅-Cys₁₁₆, Cys₃₂₁-Cys₄₇₈, Cys₂₃₁-Cys₂₂₈, ultimul fiind cel intrahelical, cu cea mai mică importanță. Cys₃₅ și Cys₁₁₆ sunt plasate la suprafață, în consecință aceste cisteine au fost mutate la serine, pentru a împiedica formarea de agregate interproteice. Celelalte cisteine sunt defavorizate în forma agregate nu numai datorită numărului mare de aminoacizi superficiali ionizabili (Glu 8.5%, Arg 8.32% raportate la întreaga secvență), dar și datorită distribuției lor omogene pe suprafață (Figura 1.6).

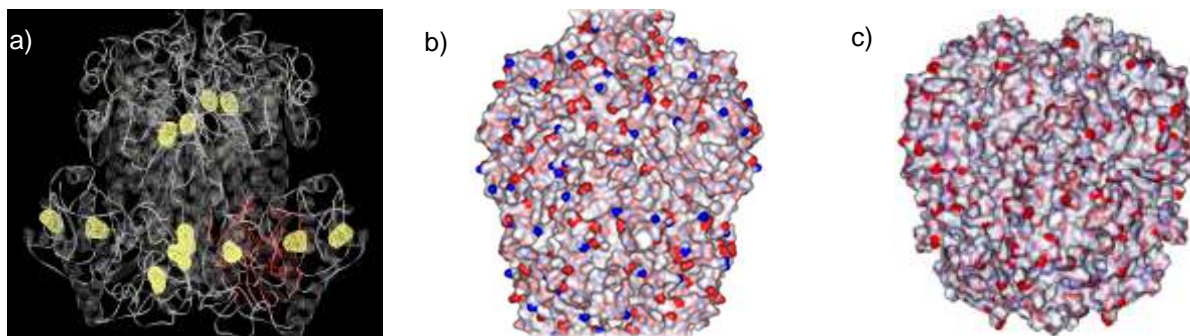


Figura 1.6. (a) Cisteinele proximale în structura RxPAL (domeni galbene) unul din cei patru situsuri catalitice marcat cu roșu. Modelul suprafețelor (b) PcPAL și (c) RxPAL. Resturi acide (roșu) cele bazice (albastru). Sarcini izolate pentru PcPAL și distribuție omogenă de sarcini, dar acidă pe suprafața RxPAL.

Deși posibilitatea de agregare a RxPAL a fost înlăturată, parametri catalitici ai enzimei nu au fost îmbunătățiți. Acest fapt ne-a condus la concluzia că, cel puțin în cazul RxPAL, formarea punților disulfurice în procesul de expresie proteică este esențială. De vreme ce expresia în vector pBAD și *E. coli* TOP 10 nu permite acest lucru, ne-am focusat la proiectarea genelor native exprimabile în vector pET19, compatibile cu celule competente *E. coli* RosettaGami care asistă posttranslațional la formarea punților disulfurice. Pe lângă genele PcPAL și RxPAL au fost comandate în vectorii de expresi pT19 o serie de fenilalanin amoniac liaze native ca cea din *Anabaena variabilis* (wt-AvPAL), *Streptomyces maritimus* (wt-SmPAL) și *Rhodospiridium toruloides* (wt-RtPAL), dar și fenilalanin amoniac mutaze native ca cea din *Taxus canadensis* (wt-TcPAM) și *Pantoea agglomerans* (wt-PaPAM). Este de menționat faptul că, după caz, codonii cisteinelor singulare din domeniul shielding (care nu sunt implicate în punți disulfurice) au fost schimbate cu codon serinic. Redăm în continuare secvența aminoacizilor din monomerul wt-PAL (cisteină schimbată cu serină marcat cu galben):

```
MENGN GATTNGHVNGNGMDFCMKTEDPLYWGIAAEAMTGSHLDEVKKMV AEYRKPVVKLGGETLTISQVAAISARDGSGVTVELSEAAARAG
VKASSDWVMDSMNKGTD SYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGSDNTLPHSATRAAMLVRINTLQGYSGIRFEILEAITKFLN
QNTTPCLPLRGTTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGVILSPEEAFKLAGVEGGFFELQPKLALVNGTAVGSGMASMVLFEANILAVLA
EVMSAIFAEMVQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAIMEHILDGSA YVKAQKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKMIEREI
NSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLA
NPVTNHVQS AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEA VEILKLMSTTFVGLCQ AIDLRLHLEENLKSTVKNTVSSVAKRVLTMGVNGLHPSRFCEKDLLR
VVDREYIFAYIDDPCSATYPLMQKLRQTLVEHALKNGDNERNLSTSIQFKIA TFEDELKALLPKEVESARA ALESNGPAIPNRIIECRSYPLYKFVR
KELGTEYLTGEKVTSPGEEFEKVFIA SKGEIIDPLESLESWNGAPLPI S
```

Plasmidele pET 19 conțin o secvență His6-tag N-terminală cu un site de clivare cu enterokinază, o genă rezistentă la ampicilină, un promotor T7lac și genele PAL, respectiv PAM. Expresiile induse cu IPTG în *E. coli* RosettaGami au decurs cu randamente bune, la purificarea proteinelor prin cromatografie Ni-NTA eluția decurgând cu o soluție de histidină 50 mM. În Figura 1.7 sunt redată harta genetică a plasmidelor și electroforegrama din diversele fracții obținute după ruperea peretelui celular, respectiv elfunții de la purificarea cromatografică.

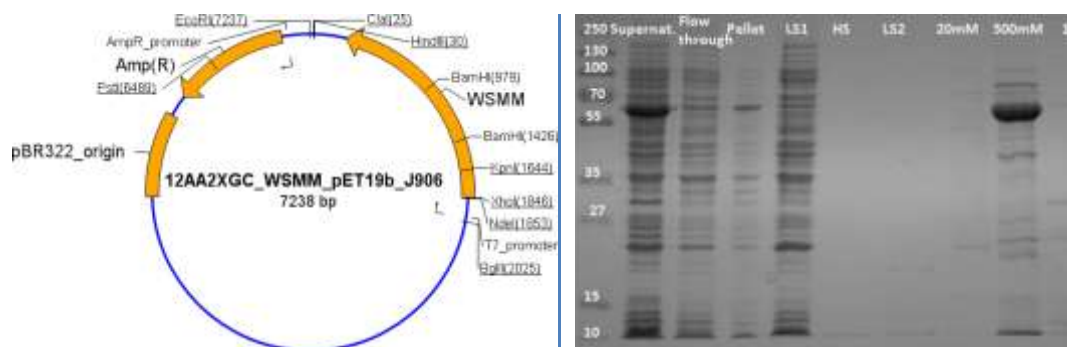


Figura 1.7. Harta genetică a plasmidei pentru producerea wt-PaPAM și electroforegrama ce certifică expresia și puritatea enzimei în diversele stadii de purificare.

Analiza SDS-PAGE a enzimei PaPAM purificate

Puritatea PaPAM s-a verificat prin analiză SDS-PAGE. Probele s-au fiert timp de 5 minute în soluție tampon Laemmli și s-au încărcat pe SDS-PAGE de 12% (Fig. 1.8).

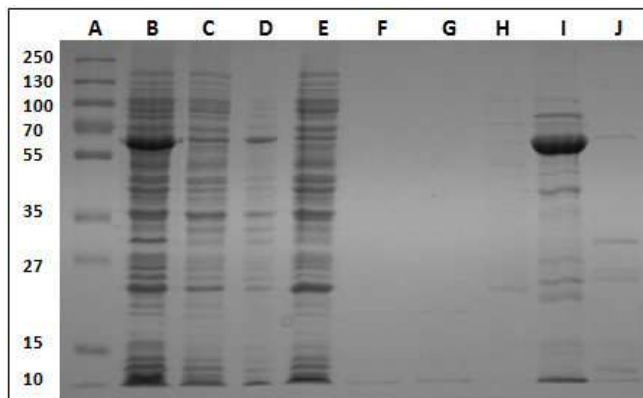


Figura 1.8. Purificarea PaPAM cu Ni-NTA. Banda **A**: marker de masa, Banda **B**: supernatant, Banda **C**:efluent, Banda **D**: pelet, Banda **E**: LS1, Banda **F**: HS, Banda **G**:LS2, Banda **H**: 20 mM Imidazol, Banda **I**: 350 mM Imidazol, Banda **J**: 1 mM Imidazol.

Liazele și mutazele astfel obținute au prezentat parametri catalitici asemănătoare celor obținuți de noi anterior (pentru PcPAL) sau prezentate în literatură pentru restul de proteine. Cum era de așteptat, activitatea RxPAL s-a îmbunătățit, K_m 5mM și k_{cat} $0.5s^{-1}$, dar din păcate aceste valori nu sunt suficient de promițătoare pentru a califica această enzimă în rândul biocatalizatorilor utili la scară preparativă. Stabilitatea enzimelor eucariotice a crescut cu aproximativ 10-15%, efectul destabilizator al helixurilor din domeniul shielding persistând în continuare.

În concluzie, s-a demonstrat că enzimele procariote sunt stabile, dar ineficiente catalitic, pe când enzimele eucariote sunt instabile structural, dar cu o capacitate biocatalitică însemnată.

2. Sinteza chimică a α - și β -arilalaninelor nenaturale racemice și a acizilor acrilici corespunzători

În vederea investigării activității enzimelor fenilalanin amoniac-liaza (PAL), respectiv fenilalanin aminomutaza (PAM), au fost sintetizate prin procese chimice convenționale (Figura 1.) o serie de α - și β -aril- și heteroarilalanine racemice, analogi nenaturali ai α - și β -fenilalaninei.

Sinteza compușilor pornește de la (hetero)aril-aldehidele corespunzătoare. În prima fază, pentru obținerea acizilor 2-amino-3-((hetero)aril-2-il)propionici aldehidele au fost supuse unei etape de reducere cu $NaBH_4$ în MeOH fa alcoolii corespunzători. Halogenarea alcoolilor cu clorura de tionil în CH_2Cl_2 și în prezență de benzotriazol conduce la formarea cloroderivațiilor, care printr-o etapă de cuplare cu dietil-2-acetamido-malonat produc dietil-2-acetamido-2-(aril-metil)-malonați. Prin hidroliză bazică în soluție de 10% NaOH, urmată de decarboxilare în toluen la reflux se obțin acizii 2-acetamido-3-(hetero)aril-propionici. Deprotejarea grupării amino are loc în soluție de 18% HCl la reflux (Figura 2.1, Calea 1.).

Acizii 3-amino-3-((hetero)aril-2-il)propionici au fost obținuți prin reacție Rodionov modificat. Cuplarea aldehidelor cu acetat de amoniu și acid malonic are loc în prezență de acetat de sodiu și o cantitate catalitică de apă. Drept solvent se folosește 2-propanol (Figura 2.1, Calea 2.).

Sinteza acizilor (*E*)-3-(hetero)aril acrilici constă în 2 etape (Figura 2.1, Calea 3.). Aldehidele corespunzătoare se transformă în acizi acrilici etil esteri printr-o reacție de cuplare cu esterul etilic ai acidului trifenil- λ^5 -fosfaniliden acetic. Esterii astfel obținuți sunt hidrolizați într-o următoare etapă în soluție de 10% KOH, obținând acizii acrilici corespunzători.

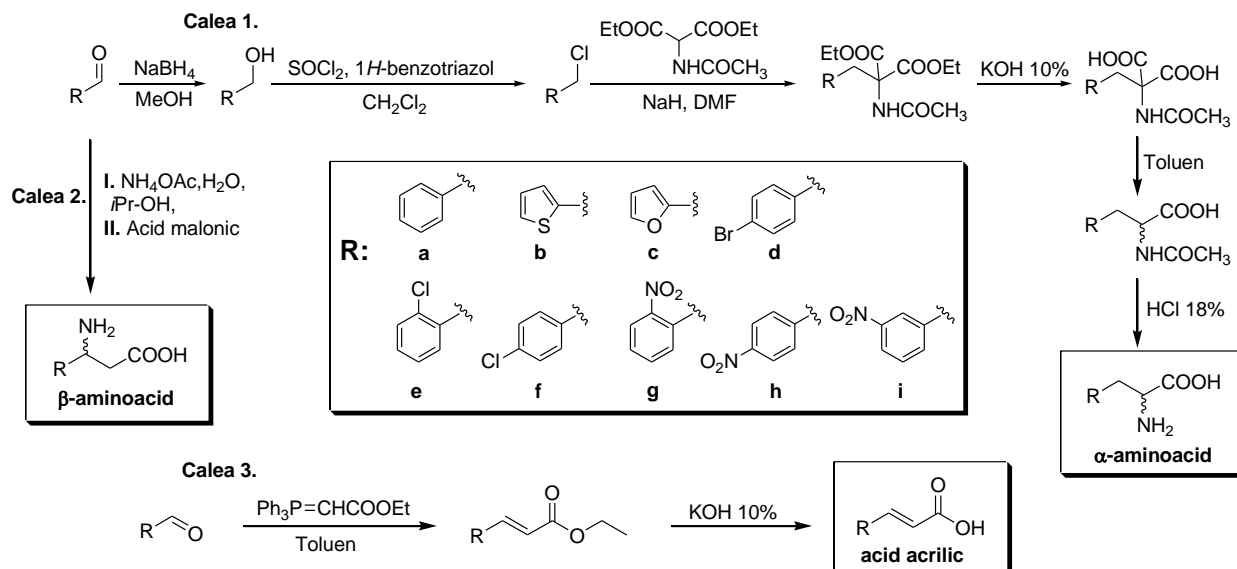
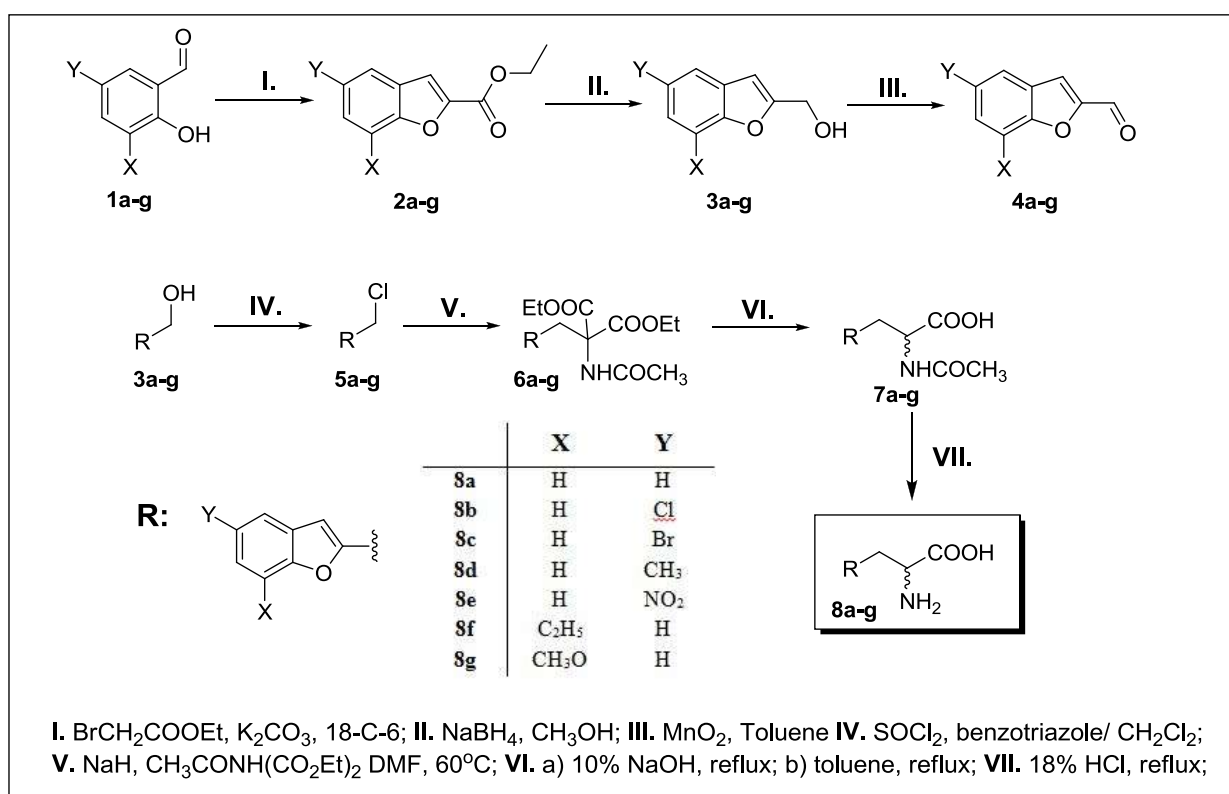


Figura 2.1. Sinteza substraturilor racemice

Sinteza chimica a acizilor 2-amino-3-(benzofuran-2-il) propionici

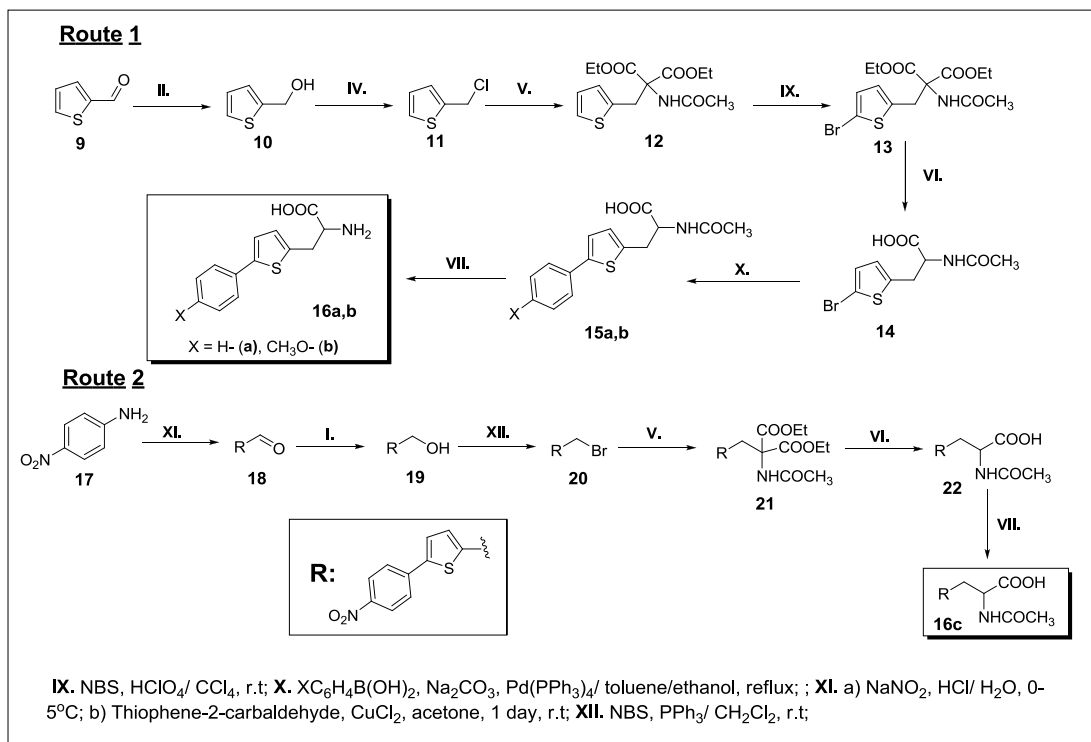
s-a realizat printr-o metoda dezvoltata anterior (Schema 2.1).



Schema 2.1. Sinteza benzofuran-alaninelor

Sinteza chimica a acizilor 2-amino-3-(feniltiofen-2-il) propionici

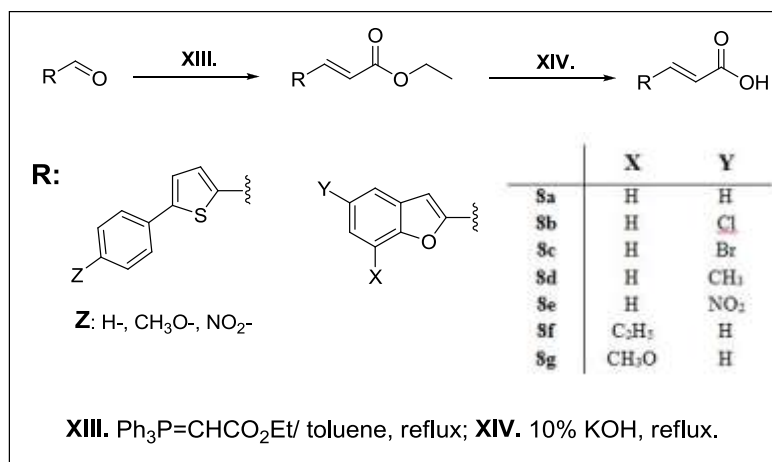
Sinteza feniltiofenalaninelor depinde de natura substituentilor prezenti pe inelul furanic, in conformitate cu reactiile prezentate in Schema 2.2.



Schema 2.2. Sintetza chimica a feniltiofenalaninelor

Sinteza chimica a (*E*)-5-feniltiofen-2-il- si (*E*)-5,7-benzofuran-2-il-acrilatilor

s-a realizat pornind de la aldehydele corespunzatoare, prin reactiile prezentate in Schema 2.3.



Schema 2.3. Sintetza chimica a acizilor acrilici

Sinteza compușilor nearomatici, potențiali substraturi pentru reacții catalizate de PAL

Rezultatele preliminare arată că enzima *PcPAL* acceptă o gamă largă de substraturi noi care conțin legături π -conjugate. Printre acestea propargil glicina are importanță deosebită, deoarece este un aminoacid nearomatic, dar cu legături conjugate și cu aplicație largă în chimia peptidelor. Astfel a fost elaborată sinteza enantioselectivă a propargil glicinei prin intermediul afenilalanin amoniaciazei.

Conform strategiei de sinteză a fost realizată sinteza acidului acrilic **2** și a aminoacidului racemic *rac-1* (Fig.2.4). Acidul acrilic **2** a fost sintetizat din alcoolul propargilic (Fig. 2.4a), printr-o reacție one-pot: oxidare cu PDC și reacție Wittig cu trifenilfosfinilidă a aldehidei produsă *in-situ*, obținându-se esterul corespunzător. Hidroliza esterului a fost optimizată, optându-se pentru hidroliza enzimatică catalizată de PLE (pig liver esterase), din cauza condițiilor blânde de reacție necesare și a cauza stabilității scăzute a acrilatului.

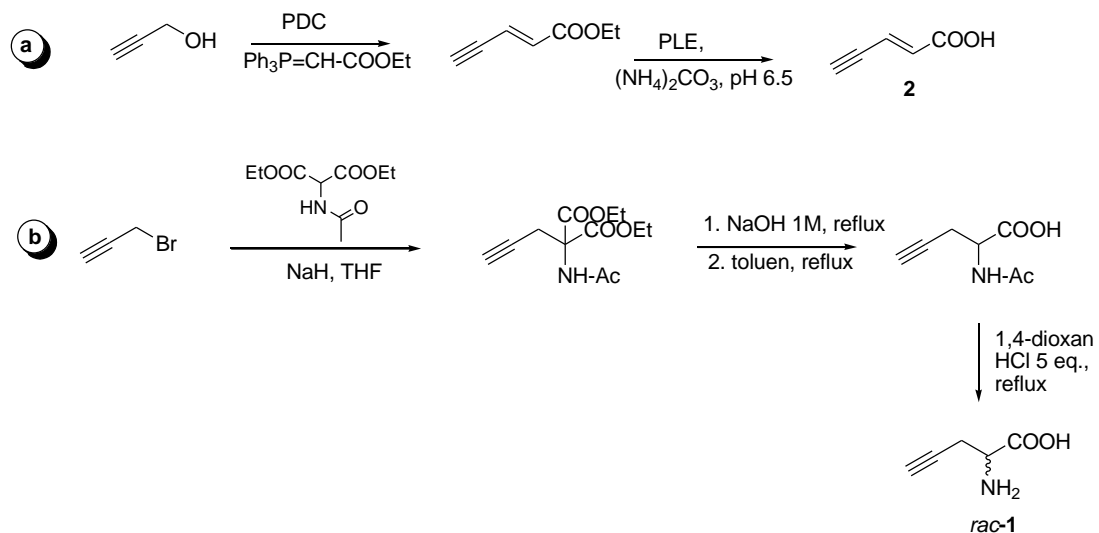


Figura.2.4. Strategia de sinteză a noilor potențiale substraturi nearomatice ale enzimei *PcPAL*

Toti compusii sintetizati au fost purificati si caracterizati complet din punct de vedere spectral.

3. INTERACTIA UNOR HETEROARILALANINE CU ENZIMELE PAL

Sinteza aminoacizilor naturali si nenaturali in forma homochirala constituie o provocare a chimiei preparative. Spre exemplu, farmacoforii inhibitorilor proteazei, o clasa importanta de compusi farmaceutici care actioneaza impotriva virusului HIV, influenza, a citomegalovirusului, contin in structura lor o entitate analoga fenilalaninei.

In principiu, amoniaciazele pot fi folosite in acest sens in doua moduri distincte:

1. Utilizarea reactiei inverse stereoconstructive, adica aditia amoniacului la un precursor nesaturat achiral cu formarea L-amino acidului
2. Utilizarea reactiei stereodistructive de eliminare a amoniacului dintr-un amestec racemic al aminoacidului, cu obtinerea D-enantiomerilor datorita transformarii selective a enantiomerilor L din racemat. (Fig. 1.2).

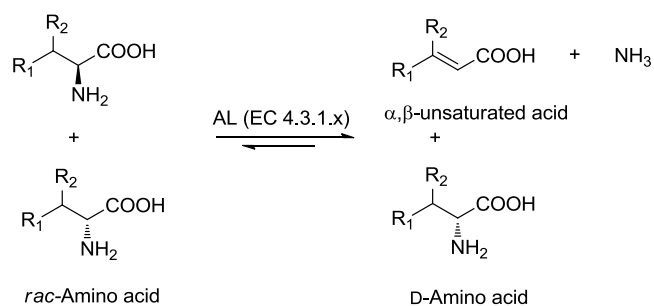


Fig. 3.1. Natura stereoconstructiva si stereodistructiva a amoniaciazelor

Determinarea constantelor cinetice pentru reactia enzimatica a heteroarilalaninelor

Determinarile cinetice au fost efectuate cu un spectrofotometru Agilent 8453 in cuve de 1 mL la 30 °C prin inregistrarea absorbantelor specific timp de 5 minute la interval de 1 minut pentru enzima PAL nativa (wt-PAL). In prealabil s-au determinat coeficientii de extinctie (ϵ) ai acrilatilor in tampon 0.1 M Tris (pH 8.8) la lungimi de unda

(λ) la care aminoacidul corespunzator nu prezinta absorbtie (Tabelul 1). Datele calculate, viteza maxima (V_{max}) relativ la cea a derivatului nesubstituit si constanta Michaelis sunt prezentate in Tabelul 3.1.

Tabel 3.1. Datele cinetice ale wt-PAL (din *Petroselinum crispum*) la 30°C in prezenta unor benzofuran-2-il-alanine

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WPCL} (μg)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M/s/ } \mu\text{g}$)	V_{max}/V_{maxBF}
1	8a H-BF	19226	310	6.85	248	1.61E-02	1.000
2	8b 7Et-BF	21821	311	6.9	8000	2.90E-03	0.181
3	8c 7MeO-BF	32267	305	16.9	1770	2.96E-04	0.018
4	8d 5Me-BF	6318	311	28.68	133	1.48E-04	0.009
5	8f 5Br-BF	2180	310	9.64	882	2.92E-03	0.182
6	8e 5Cl-BF	15038	310	6.85	903	1.74E-04	0.011
7	8g 5NO ₂ -BF	405	400	14.5	3240	5.19E-03	0.323

Se observa viteze scazute in cazul *rac*-8b-f, respectiv afinitatea acestor substraturi pentru wt-PAL (K_m) intre 123-8000 mM. Cea mai redusa afinitate s-a determinat pentru *rac*-8b-c, g. Valoarea mare a K_m in cazul *rac*-1b-c substituit in pozitia 7 a inelului benzofuranic demonstreaza ca apare un impediment steric la atasarea substratului in situsul catalytic al enzimei. Afinitatea enzimei pentru *rac*-8d-g care contin substitueni in pozitia 5, depinde de natura acestora, respective de efectele lor electronice.

Comparativ cu PAL din patrunjel, PALurile din *Rhodosporidium toruloides* si *Anabaena variabilis* prezinta o toleranta mai redusa la alte substraturi, conform datelor din Tabelele 3.2 si 3.3.

Tabel 3.2. Datele cinetice ale PAL din *Rhodosporidium toruloides* la 30°C in prezenta benzofuran-2-il-alaninelor

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WRTL} (μg)	K_m (μM)	V_{max}	V_{max}/V_{maxBF}
1	H-BF	19226	310	6.85	2670	8.0E-03	1.000
2	5Br-BF	21821	311	6.9	123	8.9E-04	0.111
3	7Et-BF	32267	305	16.9	22200	8.0E-04	0.100

Tabel 3.3. Datele cinetice ale PAL din *Anabaena variabilis* la 30°C in prezenta benzofuran-2-il-alaninelor

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WAVL} (μg)	K_m (μM)	V_{max}	V_{max}/V_{maxBF}
1	H-BF	19226	310	6.85	101	7.6E-03	1.000
2	5Br-BF	21821	311	6.9	389	3.0E-02	3.947

A fost studiata influenta temperaturii asupra interactiunii fenil-tiofen-2-il-alaninelor cu PAL din patrunjel si s-au obtinut rezultate neasteptate, prezentate in diagrama 3.1 .

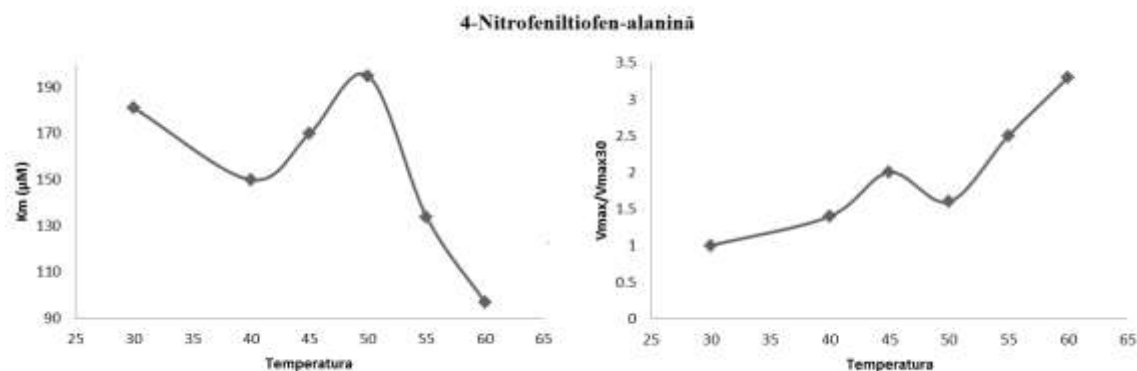
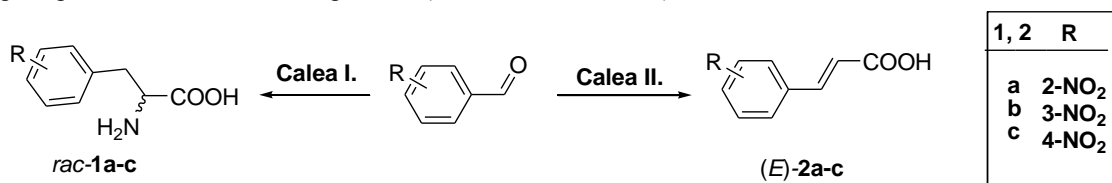


Diagrama 3.1. Variația K_m și V_{max}/V_{max30} cu temperatura

În paralel s-a realizat un șir de experimente utilizând substraturi nenaturale nitrofenilalaninice cu wt-PcPAL cu stabilitate crescută în care cele 2 cisteine singulare (care nu sunt implicate în punți disulfurice) din domeniul shielding au fost schimbate cu serinie. Mai mult, prin mutarea Ser143→Ala143, s-a creat un mutant în care formarea posttranslațională a grupării prostetice MIO devine imposibilă (PcPAL MIO deficitar). Sinteza substraturilor este redată în **Schema 2**.



Calea I. a. NaBH₄ / CH₃OH; b. SOCl₂/CH₂Cl₂, 0-5°C- r.t.; c. NaH, CH₃CONH(COOEt)₂ / DMF, 60°C; d. 18% HCl-dioxan 1:1 (V/V), reflux, 12h; **Calea II.** a. Ph₃P=CHCOOEt / toluen, reflux, 2 h; b. 10% KOH, reflux.

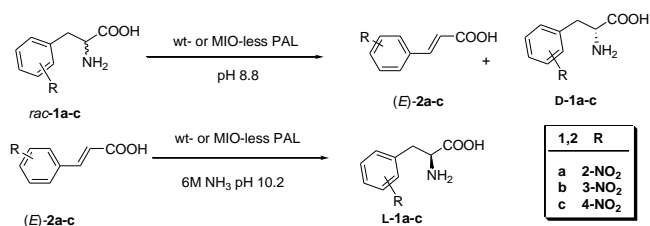
Figura 3.2. Sinteza nitrofenilalaninelor și a acriaiilor corespunzători

Măsurătorile cinetice cu wt-PcPAL și PcPAL-MIO deficitar au evidențiat pe de o parte faptul că wt-PcPAL poate media cu succes deaminarea tuturor nitrofenilalaninelor investigate, pe de altă parte faptul că lipsa grupării prostetice puternic electrofile în PcPAL MIO deficitar este contrabalansată de caracterul puternic electronatrăgător al grupării nitro, astfel deaminarea acestor substraturi decurge cu parametri cinetici acceptabili dacă este mediată de PAL cu capacitate catalitică quasi inexistentă în raport cu substratul său natural (**Schema 3.1**, Tabel 3.1).

Table 3.1. Constante cinetice pentru wt-PAL

Substrat	K_m (mM)	$\frac{V_{max}}{V_{max}^{Phe}}$	$\lambda_{\mu a \xi}$ (nm)	Viteze relative $\frac{V_{max} \text{ wt-PAL}}{V_{max} \text{ PAL MIO-deficitar}}$
l-Phe	33.3	1	290	413
<i>rac</i> -1a	268.1	0.57	243	244
<i>rac</i> -1b	64.6	0.21	260	52
<i>rac</i> -1c	295.5	0.86	340	411

0.53 mg PAL/ml soluție; 26.5 mg PAL/probă



Schema 3.1 Sinteza la scară preparativă ai ambilor enantiomer ai nitrofenilalanini

PcPAL stabilizat prin înlocuirea cisteinelor singulare cu serine, respectiv prin formarea punților disulfurice (expresie în RosettaTagami *E. coli*), a permis investigarea interacțiunii substraturilor nitate cu mutantul MIO-deficitar, care pe lângă utilitatea practică a reacțiilor enzimatică a folosit și la elucidarea mecanismului de interacțiune PAL-substrat [2].

4. INTERACȚIA UNOR HETEROARILALANINE CU ENZIMELE PAM

Specificitatea de substrat a PaPAM (Fig.4.1a) s-a testat cu o gamă largă de (*S*)- α -arilalanine aromatice și heteroaromatice. Efectele sterice și electronice ale substituenților inelului aromatic au avut o influență semnificativă atât asupra eficienței catalitice cât și asupra formării arilacriaiilor, produși secundari. S-a observat că (*S*)- α -

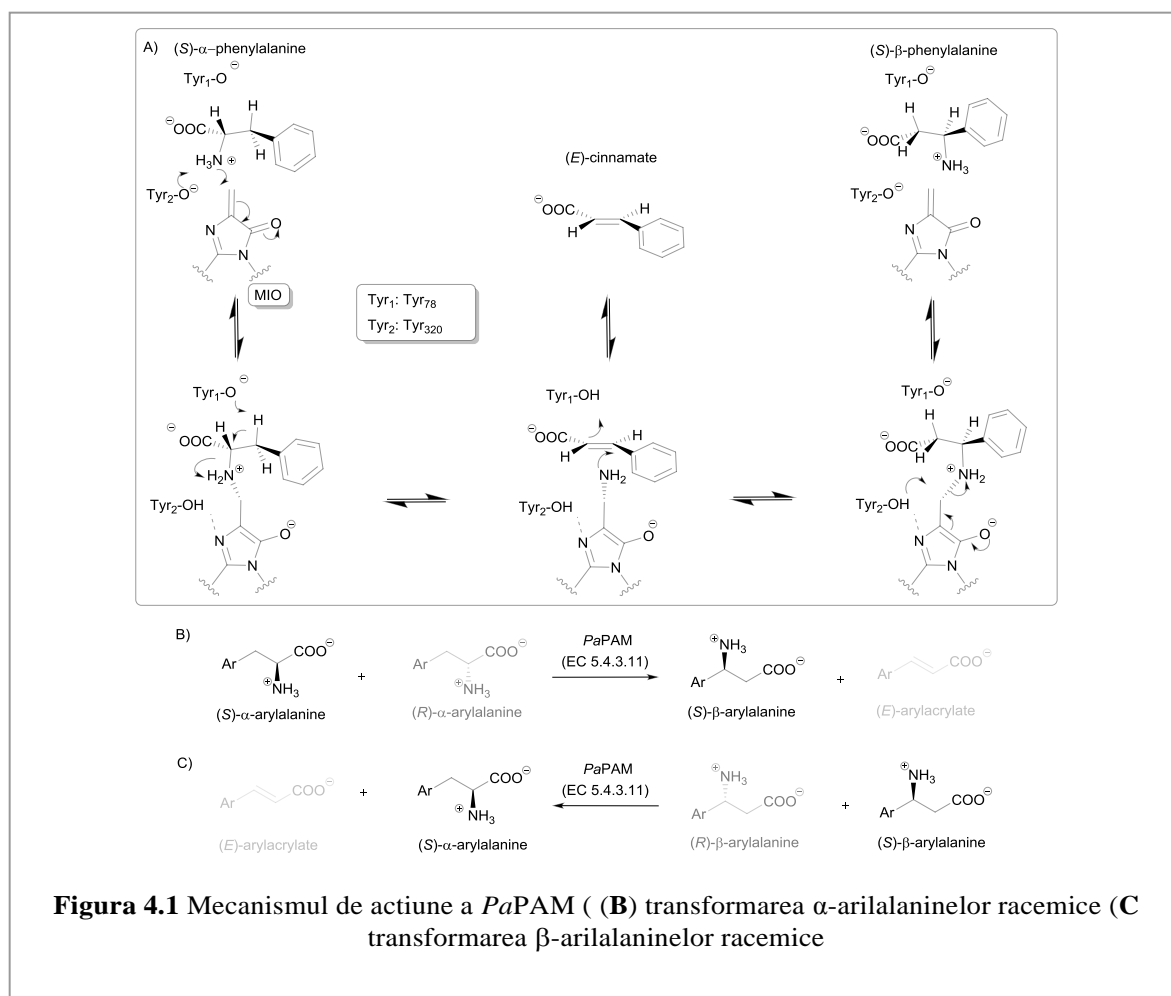
fenilalaninele 3-substituiți s-au transformat mai rapid decât izomerii 2- sau 4 substituiți. Pentru explicarea acestor observații s-au efectuat analize computaționale ale interacțiunilor substrat – PaPAM prin studii de docking de substrat. Recent s-a arătat că celulele întregi recombinante de *E. coli* din care se exprimă PaPAM pot de asemenea produce (*S*)-β-arilalanine enantiopure din (*S*)-α-arilalanine. Însă PaPAM nu a catalizat transformarea mai multor (*S*)-α-fenilalanine 2-substituiți studiați.

Profilul de timp al reacțiilor a arătat că după un timp relativ scurt (2-6 ore) o stare de echilibru se atinge în cazul ambilor reacții enzimatică, folosind *rac*-β-fenilalanine (Fig. 4.1C) sau *rac*-α-fenilalanine (Fig. 4.1B) ca și substrat.

Prin urmare, rezultate obținute după 20 de ore arată distribuția finală de produs aproape de starea de echilibru, după timpi de reacție mai lungi formarea de produs nu s-a mai observat.

Transformarea (±)-α-arilalaninelor (*rac*-1a-l) cu PaPAM

În conformitate cu rezultatele anterioare PaPAM nu a catalizat transformarea (*S*)-α-fenilalaninelor 2-substituiți cu grupări atrăgătoare de electroni. Studiul nostru, pornind de la (±)-α-arilalanine *rac*-1a-l (Fig. 4.2A) a confirmat validitatea acestor observații și pentru amestecuri racemice (Tabel 4.1).



În prezența de PaPAM produsul nu a putut fi detectat cu (±)-α-(2-clorofenil)alanine (*rac*-1g) sau (±)-α-(2-nitrofenil)alanine (*rac*-1j), în timp ce cu (±)-α-(2-fluorofenil)alaninele (*rac*-1d) substituie cu cel mai mic atom de halogen, s-a observat activitate moderată de mutază în formarea (*S*)-β-(2-fluorofenil)alanine (*S*-2d) enantiopure.

Conversia (±) α-fenilalaninelor 3 substituiți (*rac*-1e,h,k) cu PaPAM după 20 de ore a fost moderat mai rapid decât substraturilor 2-substituiți *rac*-1d, dar totuși mai lent decât cu (±)-α-fenilalanine (*rac*-1a).

Comparația conversiile (±)-α-fenilalaninelor 4-substituiți (*rac*-1c,f,i,l) cu PaPAM după 20 de ore au indicat faptul că folosind (±)-4-fluoro- (*rac*-1f) și (±)-4-bromo-α-fenilalanine (*rac*-1c) s-au atins conversii cu aproximativ 1.2 mai mari decât cu (±)-4-cloro-(*rac*-1i) sau (±)-4-nitro-α-fenilalanine (*rac*-1l).

De asemenea s-au investigat și reacțiile (±) α-arilalaninelor suportând grupări tiofen-2-il (*rac*-1b) catalizate de PaPAM. Conversia (±)-α-(tiofen-2-il)alaninelor (*rac*-1b) a fost similar cu cele ale (±)-α-fenilalaninelor (*rac*-1a).

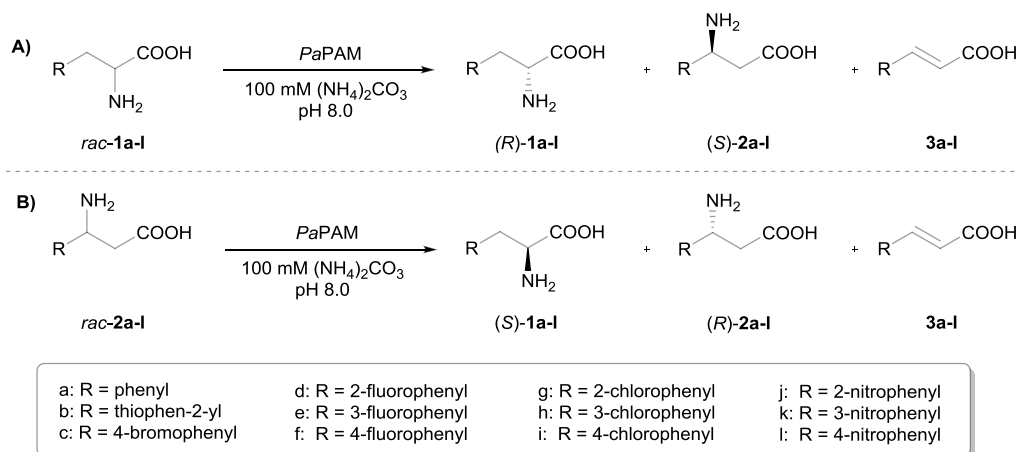


Figura 4.2 Transformarea (\pm)- α -arilalaninelor *rac-1a-l*(A) și (\pm)- β -arilalaninelor *rac-2a-l* (B) catalizate de *PaPAM*

Într-un studiu anterior s-a observat o activitate neglijabilă de amoniac lizază cu (*S*)-1a la temperaturi reduse (sub 30 °C). Totuși, într-un alt studiu, ca și în cel prezent, s-a observat formarea unei cantități substanțiale de (*E*)-arilacrilati în mai multe cazuri (**3a,b,d,e,f,h,i** Tabel 1), indicând o activitate substanțială de *PaPAM*. Folosind (\pm)-4-bromo- (*rac-1c*), (\pm)-4-cloro (*rac-1i*) și (\pm)-3-nitro- α -fenilalanină (*rac-1k*) ca și substrat nu s-a observat astfel de activitate. O cantitate relativă mare de arilacrilati s-au format în reacțiile folosind substraturi cu grupări aromatice mai mici, cum ar fi (\pm)- α -fenilalanine (*rac-1a*), (\pm)- α -(tiofen-2-il)alanine (*rac-1b*) și (\pm)-2-fluoro- α -fenilalanine (*rac-1d*).

Rezultatele cu (\pm)- α -arilalanine (*rac-1a-l*) au demonstrat că activitatea de mutază și/sau mutază a *PaPAM* a fost afectată de natura componentei aromatice a substratului. Enantiopuritatea ridicată a produsilor [*ee* >98% pentru (*S*)-**2a-f,h,i,k,l**] a indicat enantioselectivitate ridicată a izomerizării catalizate de *PaPAM* în direcția $\alpha \rightarrow \beta$. Stereoselectivitatea mare a izomerizării catalizate de *PaPAM* a arilalaninelor (*S*)- α - și (*S*)- β a fost un avantaj major în comparație cu stereoselectivitatea izomerizării catalizate de *SmPAM*.

Transformarea (\pm)- β -arilalaninelor (*rac-2a-l*) cu *PaPAM*

Pentru a explora potențialul rezoluțiilor cinetice enzimatică a (\pm)- α - și β -arilalaninelor pentru prepararea produsilor antipodali, am extins acest studiu spre reacții ale (\pm)- β -arilalaninelor *rac-2a-l* (Fig. 4.2B și Tabel 4.2). Profilul de timp similar a formării de produs în reacțiile catalizate de *PaPAM* din (*S*)- β -fenilalanine și *rac*- β -fenilalanine a arătat că (*R*)- β -fenilalaninele nu acționează ca și inhibitor semnificativ.

Spre deosebire de (\pm)- α -fenilalaninele 2-substituiți su substituenți largi (*rac-1g,j*), care aparent nu sunt acceptați ca și substrat de *PaPAM*, toate (\pm)- β -fenilalaninele 2 substituiți din acest studiu (*rac-1d,g,j*) au fost ușor transformați. Pe de altă parte nu s-a observat conversii cu *PaPAM* folosind β -fenilalaninele (\pm)-3- și (\pm)-4 substituiți cu substituenți cu grupări voluminoase de atrăgători de electroni ca și substrat (*rac-2c,h,i,k,l*).

Conversia (\pm)- β -(tiofen-2-il)alaninelor (*rac-2b*) și a (\pm)-3-fluoro- β -fenilalaninelor (*rac-2e*) catalizate de *PaPAM* au fost superioare celor de (\pm)- β -fenilalaninelor (*rac-2a*). (\pm)-4-fluoro- β -fenilalaninele (*rac-2f*) au fost convertite similar cu (\pm)- β -fenilalanine (*rac-2a*), pe când (\pm)-4-bromo- β -fenilalaninele (*rac-2c*) au fost transformate la izomerul α (*S*)-**1c** și p cantitate redusă de 4-bromocinnamat (3c) la o conversie inferioară decât *rac-2a*. În toate cazurile, cu excepția (\pm)-2-nitro- β -fenilalaninei (*rac-2j*), reacțiile catalizate de *PaPAM* s-a observat formația izomerului (*S*)- α enantiomer [(*S*)-**3a-g**] și a unor arilacrilati (**3a-g**).

Transformarea (\pm)-2-nitro- β -fenilalaninelor (*rac-2j*) a prezentat o excepție datorată absenței produsului secundar (3) și a unei stereoselectivități incomplete (*ee*_{(*S*)-1j} = 92%).

Efectul pH-ului și al concentrației amoniacului asupra izomerizării catalizate de PaPAM a (±)- α - și β -(tiofen-2-il)alaninelor racemice (*rac-1b* și *rac-2b*)^c

Deoarece conversiile (±)- α - și (±)- β -(tiofen-2-il)alanine (*rac-1b* și *rac-2b*) au fost similare cu cele obținute din substraturile naturale, dar s-a format mai mult produs secundar, (Tabel 4.1 și 4.2), transformarea acestor substraturi s-a studiat mai detaliat prin varierea pH-ului sau a concentrației de amoniac. Modificarea pH-ului soluției tampon în intervalul 7-9 (at 100 mM (NH₄)₂CO₃) nu a dus la modificarea conversiilor, spre deosebire de varierea concentrației de (NH₄)₂CO₃ în intervalul 50–1000 mM (la pH 8), care a influențat semnificativ compoziția de produși (Tabel 4.3). Analiza reacțiilor (±)- α -(tiofen-2-il)alaninelor (*rac-1b*) mediate de PaPAM la diferite concentrații de (NH₄)₂CO₃ (timp de incubare 20 h) a arătat că (NH₄)₂CO₃ peste 100 mM concentrație rezultă în descreșterea conversiei atât a (*S*)- β -(tiofen-2-il)alaninei (*S*)-**2b** cât și a produsului de eliminare **3b**. La concentrația de 1000 mM (NH₄)₂CO₃ atât formarea de (*S*)- β -(tiofen-2-il)alanina (*S*)-**2b** cât și de arilacrilat **3b** a scăzut la 12%. Pornind din (±)- β -(tiofen-2-il)alanină (*rac-2b*), cea mai bună conversia s-a obținut la concentrația soluției tampon de 100 mM. La concentrații mai mici de (NH₄)₂CO₃ s-au obținut conversii mai mici. Studiul dependenței de concentrația (NH₄)₂CO₃ a reacțiilor catalizate de PaPAM a (±)- α - and β -(tiofen-2-il)alaninei (*rac-1b* și *rac-2b*) a indicat faptul că la concentrații ridicate de amoniac atât rata de izomerizare cât și eliminarea de amoniac au scăzut.

Tabel 4.2 Compoziția amestecului obținut din (±)- β -arilalanine *rac-2a-l* cu PaPAM (după 20 de ore)

<i>Substrat</i> (Ar)	x_2	$x_{(S)-1}$ ^a	x_3
<i>rac-2a</i> (fenil)	0.70	0.29	0.01
<i>rac-2b</i> (tiofen-2-il)	0.73	0.22	0.04
<i>rac-2c</i> (4-bromofenil)	0.91	0.08	0.01
<i>rac-2d</i> (2-fluorofenil)	0.63	0.35	0.02
<i>rac-2e</i> (3-fluorofenil)	0.67	0.25	0.08
<i>rac-2f</i> (4-fluorofenil)	0.76	0.23	0.01
<i>rac-2g</i> (2-clorofenil)	0.54	0.40	0.06
<i>rac-2h</i> (3-clorofenil)	1.00 ^b	^b	^b
<i>rac-2i</i> (4-clorofenil)	1.00 ^b	^b	^b
<i>rac-2j</i> (2-nitrophenyl)	0.85	0.15 ^c	^d
<i>rac-2k</i> (3-nitrophenyl)	1.00 ^b	^b	^b
<i>rac-2l</i> (4-nitrophenyl)	1.00 ^b	^b	^b

^aee >98% dacă nu se statuează altfel în tabel; ^b nu decurge reacția; ^cee = 92% ^d nu s-a observat

Tabel 4.3 Compoziția amestecului de reacție obținut din (\pm)- α - sau (\pm)- β -(tiophen-2-il)alanine (*rac-1b* sau *rac-2b*) catalizate de PaPAM la concentrații diferite de carbonat de amoniu (după 20h)

Substrate	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3}$ (mM)	x_{1b}	x_{2b}	x_{3b}
<i>rac-1b</i>	50	0.68	0.17	0.15
<i>rac-1b</i>	100	0.68	0.17	0.15
<i>rac-1b</i>	200	0.72	0.16	0.12
<i>rac-1b</i>	1000	0.76	0.12	0.12
<i>rac-2b</i>	50	0.19	0.76	0.05
<i>rac-2b</i>	100	0.27	0.69	0.04
<i>rac-2b</i>	200	0.23	0.75	0.02
<i>rac-2b</i>	1000	0.13	0.84	0.03

x_{1b} , x_{2b} și x_{3b} reprezintă fracția molară a compnenților de reacție determinate cu $^1\text{H-RMN}$

5. BIOTRANSFORMAREA SUBSTRATURILOR CU PAL SI PAM NATURALE SI MUTANTE

Fenilalanin amoniac liazele (PAL; EC 4.1.3.24) catalizează deaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei în acid (*E*)-cinamic, iar fenilalanin 2,3-aminomutazele (EC 5.4.3.x) catalizează izomerizarea L-fenilalaninei la L- sau D- β -fenilalanine, în funcție de originea enzimei (**Fig.5.1**). PAL și PAM sunt folosite ca biocatalizatori pentru sinteza L- α -amino acizilor din acilați (PAL), în procese de rezoluție cinetică cu formarea D- α -aminoacizilor din racemați (PAL), sau pentru sinteza L- sau D- β -arilalaninelor (PAM).

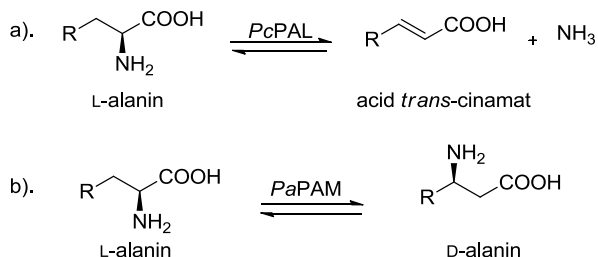


Fig.5.1. Reacții catalizate de PAL (a.) și PAM (b.).

Enzimele PcPAL și PaPAM purificate au fost utilizate pentru obținerea ambilor enantiomeri ai unor analogi nenaturali ai α - și β -arilalaninei.

Inițial am monitorizat efectul inhibitor al concentrației substratului, fenilalanina, și al acidului cinamic asupra activității enzimei PaPAM (**Fig.5.2**).

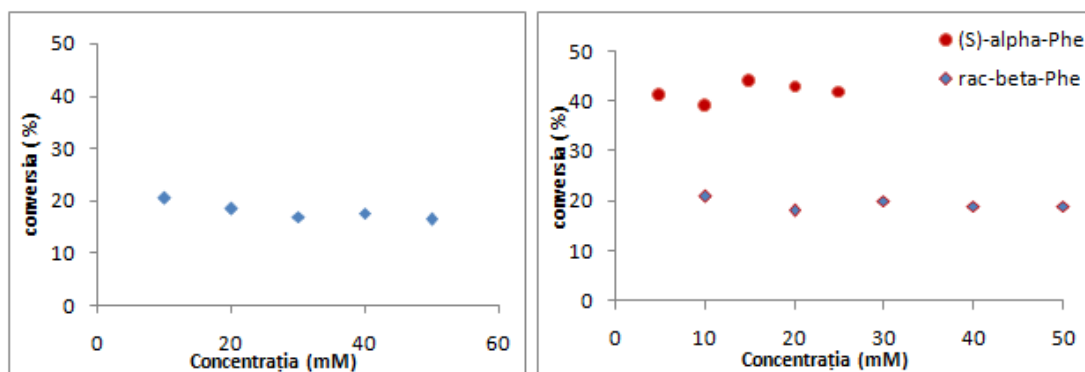


Fig.5.2. a) Efectul concentrației de substrat asupra conversiei. **b)** Efectul concentrației de acid cinamic asupra conversiei

Rezultatele obținute au scos în evidență faptul că nici concentrația substratului, nici prezența acidul cinamic nu influențează semnificativ mersul reacției.

Pentru obținerea celor doi enantiomeri (*R*) și (*S*) ai β-arilalaninei am propus două metode. Astfel, (*R*)-β-fenilalanina a fost obținută pornind de la β-fenilalanina racemică, folosind *PaPAM* și *PcPAL* în tandem. Enzima *PaPAM* transformă (*S*)-β-fenilalanina în (*S*)-α-fenilalanina, care în prezență de *PcPAL* este convertită în acid cinamic (**Fig.5.3.b.**).

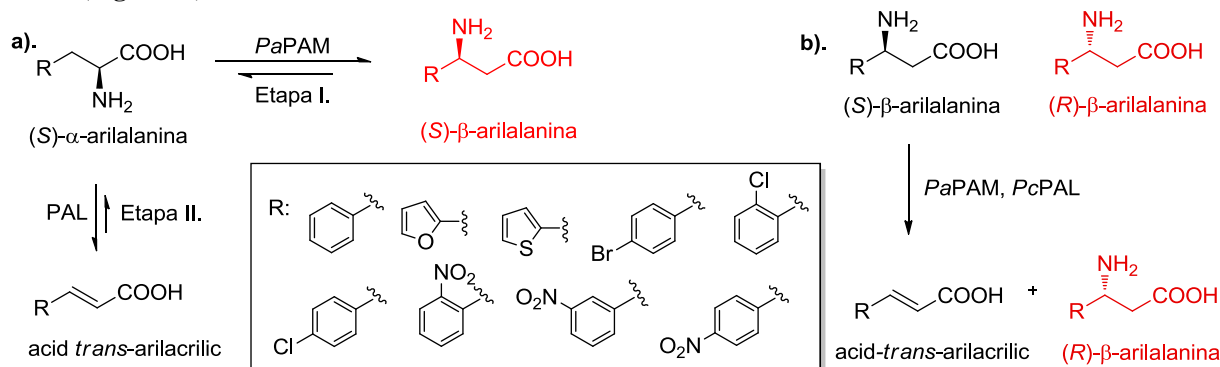


Fig.5.3. Sinteza de (*S*)-β-arilalanina (a.) și sinteza de (*R*)-β-arilalanina (b.).

(*R*)-β-fenilalanina enantiopură a fost izolată prin cromatografie, folosind schimbători de ioni cationic. Monitorizarea reacțiilor a avut loc cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) folosind, coloana CHIRALPACK ZWIX(+), respectiv MeOH(50mM FA+ 100mM DEA):ACN:H₂O în raport de 49:49:2 drept solvent (**Fig.5.4.**).

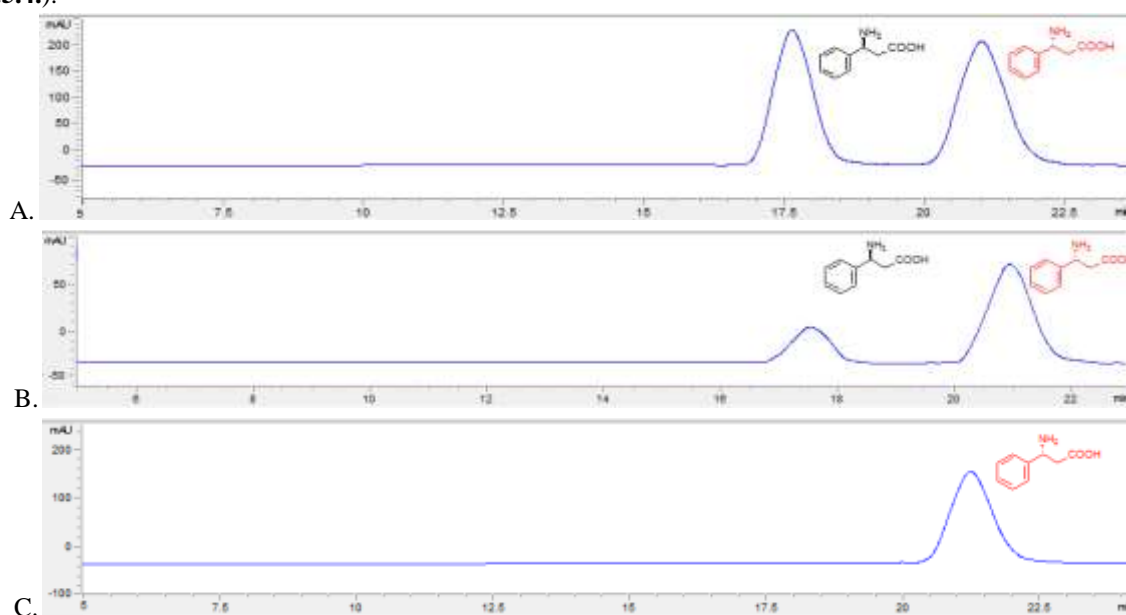


Fig.5.4. *Rac*-β-fenilalanina transformată de *PaPAM*. A.după 2h, B.după 24h, C.după 48h

În vederea extinderii metodei la alanine nenaturale, am considerat necesară în prealabil analizarea reacțiilor catalizate de *PaPAM* (**Fig.5.5.**). Am constatat faptul că natura și poziția substituenților modifică semnificativ activitatea enzimei. Comparând cu *rac*-β-fenilalanina nesubstituită, fenilalaninele *orto*-substituite respectiv heteroaril-alaninele sunt substraturi bune pentru *PaPAM*, spre deosebire de fenilalanine *para*-substituite asupra cărora enzima nu prezintă activitate.

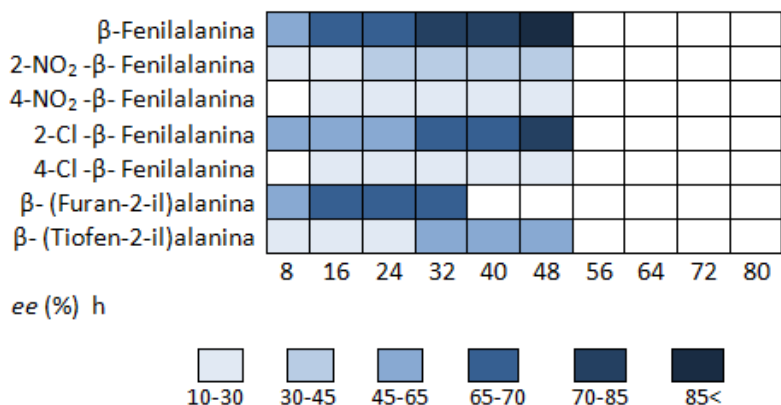


Fig.5.5. *Rac*- β -arilalanine transformate de *PaPAM*

Aplicând metoda descrisă mai sus la diferiți analogi nenaturali ai *rac*- β -arilalaninei, s-a observat faptul că viteza de transformare a (*S*)- β -fenilalaninei în acid acrilic depinde de comportarea enzimei *PaPAM* discutată mai sus (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1. Analogi nenaturali transformați cu *PaPAM-PcPAL* în tandem

Substraturi	T(h)	ee_{β} (%)
β - (Tiofen-2-il)alanina	35	86
β - (Furan-2-il)alanina	48	66
2-Cl- β -Fenilalanina	16	99
4-Cl- β -Fenilalanina	48	-
2-NO ₂ - β -Fenilalanina	98	77
3-NO ₂ - β -Fenilalanina	98	51
4-NO ₂ - β -Fenilalanina	48	-
4-Br- β -Fenilalanina	98	10

Obținerea (*S*)- β -arilalaninei pornește de la (*S*)- α -arilalanină, care a fost preparată prin adăugarea amoniacului (6M NH₃ soluție apoasă) la acidul acrilic corespunzător catalizată de către *PcPAL*.

Metoda presupune două etape. În prima etapă, *PaPAM* catalizează transformarea (*S*)- α -arilalaninei în (*S*)- β -arilalanină, însă reacția se oprește la concentrațiile de echilibru ale acestora. Din această cauză enzima *PaPAM* a fost inactivată, îndepărtată din mediul de reacție și *PcPAL* a fost adăugat pentru a transforma (*S*)- α -arilalanina nereacționată în acidul acrilic (**Fig.5.3**). Au fost utilizați și în acest caz schimbători de ioni pentru a izola (*S*)- β -fenilalanina sub formă optic pură.

În ceea ce privește reacțiile catalizate de *PaPAM* (**Fig.5.6**), numai tiofen- respectiv *para*-Cl-fenilalanină au fost transformate cu excese enantiomerice acceptabile. Alaninele *meta*- și *para*-substituie au dat rezultate moderate, în timp ce compușii *orto*-substituiți nu au prezentat activitate. În cazul furil-2-alaninei *PaPAM* prezintă activitate liazică semnificativă, astfel transformarea α -alaninei decurge cu o viteză mai mare spre formarea acidului furil-2-acrilic.

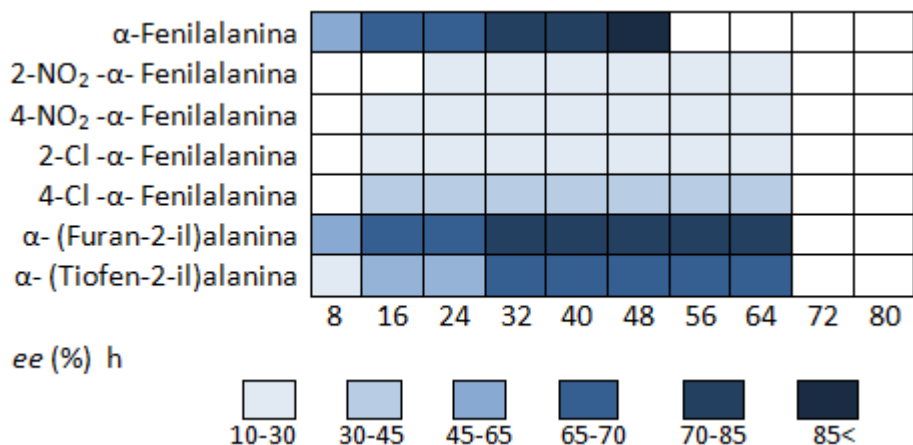


Fig.5.6. *Rac*- α -arilalanine transformate de PaPAM

Monitorizarea reacțiilor a avut loc cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC), folosind, coloana CHIRALPACK ZWIX(+), respectiv MeOH(50mM FA+ 100mM DEA):ACN:H₂O în raport de 49:49:2 drept solvent (**Fig.5.7.**).

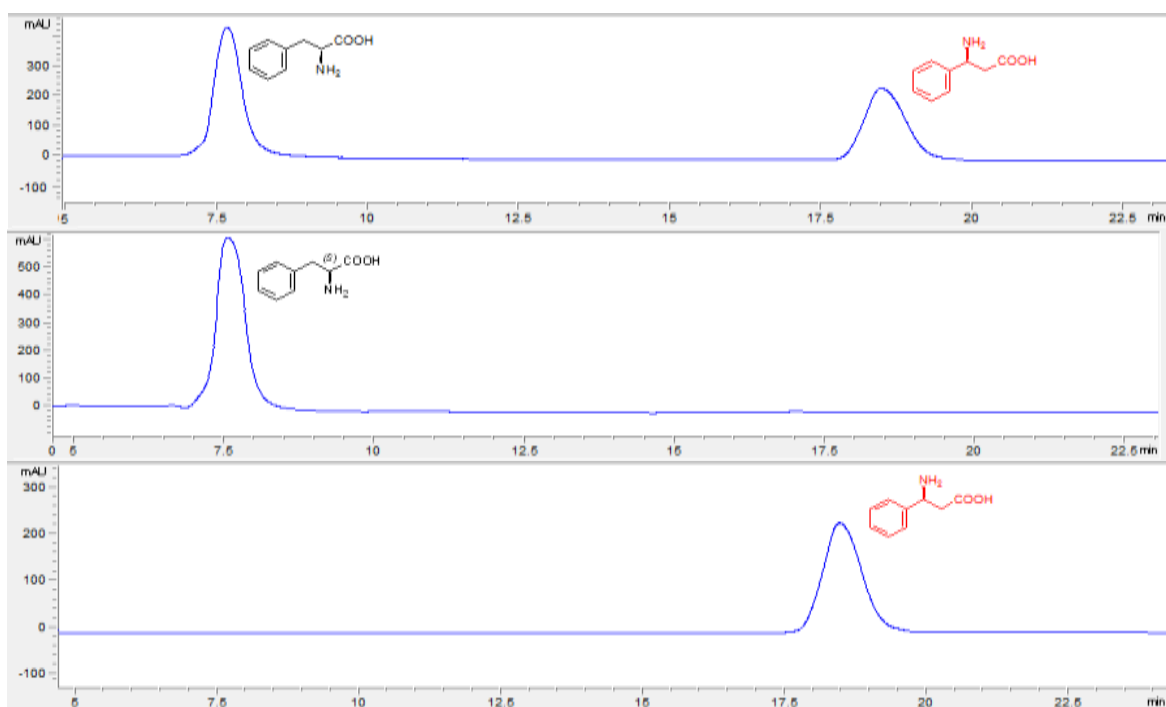


Fig.5.7. (*S*)- α -fenilalanina transformată de PaPAM. A. după 2h, B. după 24h, C. după 48h

6. Imobilizarea covalentă a PAL și PAM pe nanoparticule magnetice funcționalizate (MNP) cu grupări epoxi pe SwCNT_{COOH} prin linker de tip GDE

Imobilizarea 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 °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 × 4 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.

Imobilizarea PcPAL pe pe SwCNT_{COOH} prin linker de tip GDE

SwCNT_{COOH} (carboxi nanotuburi de carbon cu un sigur perete) s-a incubat cu carbonildiimidazol (CDI) sub agitare la 1350 rpm timp de 12 ore, cu ultrasonare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotub (Figura 11 b etapa i). După activarea cu CDI proba a fost filtrată. La suspensia apoasă a nanotubului activat s-a adăugat propan-1,3-diamină (etapa ii). După cuplarea cu propan-1,3-diamină proba a fost filtrată și spălată cu apă. Glicerol diglicidil eterul (GDE) s-a adăugat peste suspensia nanotubul cuplat cu diamină în diclorometan(etapa iii). După incubare proba a fost filtrată și spălată cu CH₂Cl₂. La nanotubul activat s-a adăugat PcPAL în soluție tampon TRIS (iv). După imobilizare biocatalizatorul rezultat (SwCNT_{COOH}-PAL) a fost filtrată și spălată cu apă. Cantitatea de PcPAL imobilizat s-a estimat din diferența concentrației enzimei înainte și după imobilizare, care a fost măsurat spectrofotometric prin metoda Bradford.

a. Imobilizarea PaPAM 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 PaPAM (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 °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 × 4 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.

b. Imobilizarea covalentă a PaPAM pe SwCNT_{COOH} prin linker de tip GDE

SwCNT_{COOH} (carboxi nanotuburi de carbon cu un sigur perete) s-a incubat cu carbonildiimidazol (CDI) sub agitare la 1350 rpm timp de 12 ore, cu ultrasonare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotub (Figura 11 b etapa i). După activarea cu CDI proba a fost filtrată. La suspensia apoasă a nanotubului activat s-a adăugat propan-1,3-diamină (etapa ii). După cuplarea cu propan-1,3-diamină proba a fost filtrată și spălată cu apă. Glicerol diglicidil eterul (GDE) s-a adăugat peste suspensia nanotubul cuplat cu diamină în diclorometan(etapa iii). După incubare proba a fost filtrată și spălată cu CH₂Cl₂. La nanotubul activat s-a adăugat PaPAM în soluție tampon TRIS (iv). După imobilizare biocatalizatorul rezultat (SwCNT_{COOH}-PAL) a fost filtrată și spălată cu apă. Cantitatea de PaPAM imobilizat s-a estimat din diferența concentrației enzimei înainte și după imobilizare, care a fost măsurat spectrofotometric prin metoda Bradford.

Folosind ambele tipuri de PaPAM imobilizate s-a trecut la determinarea activitatii lor. Folosind tehnicile analitice prezentate în continuare, s-a demonstrat ca activitatea enzimatica (raportata la masa proteica) este similara cu cea a enzimei native.

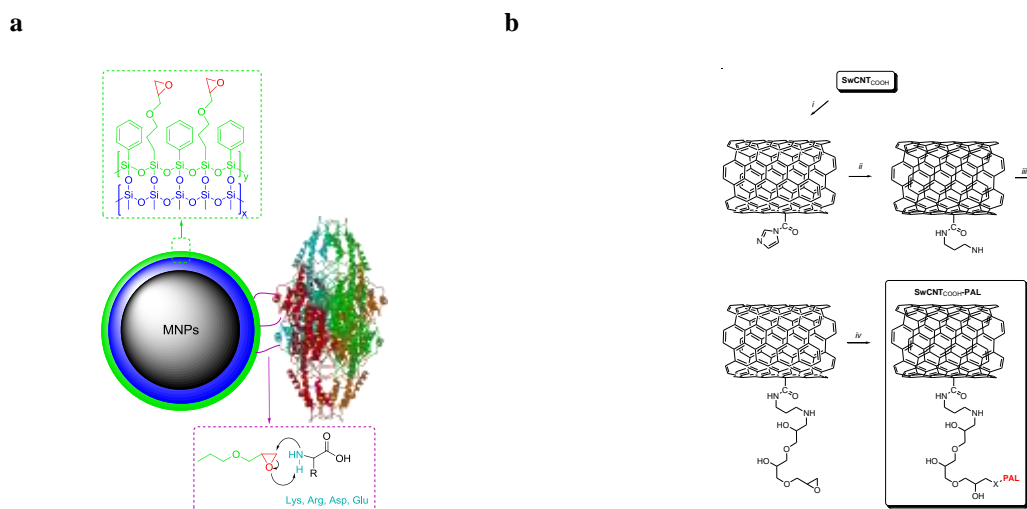
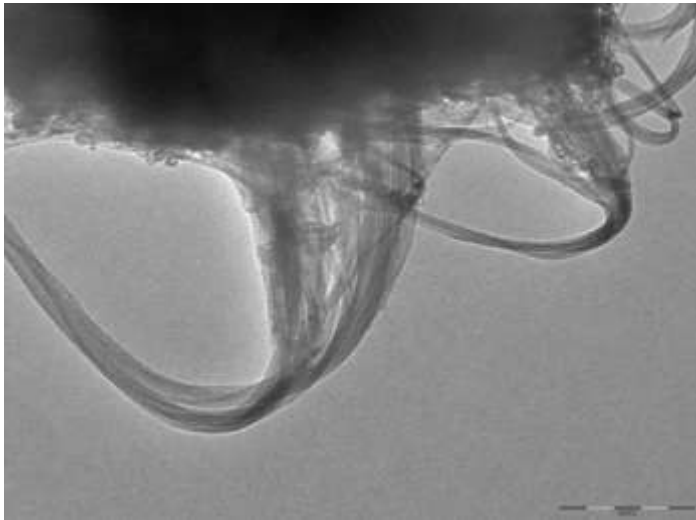
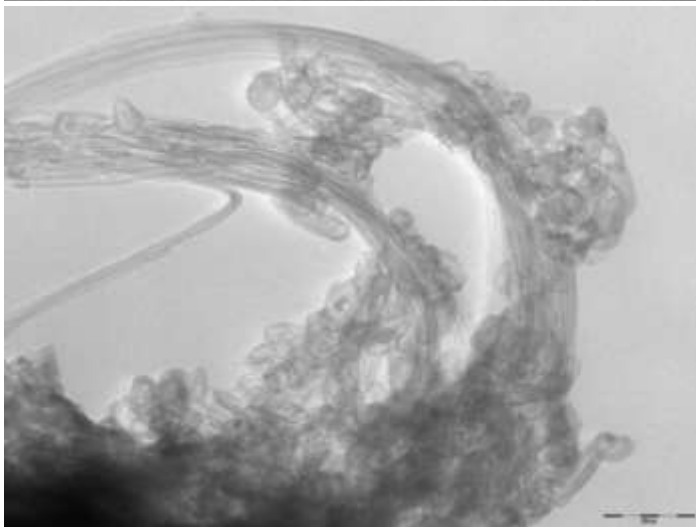


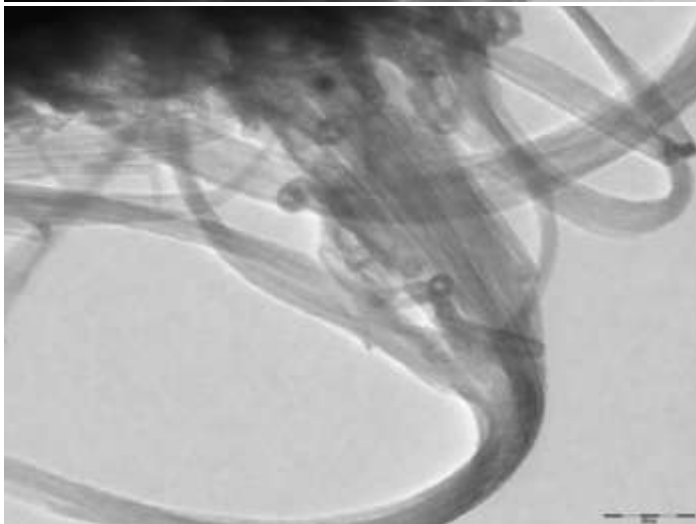
Figura 6.1. a. Imobilizarea enzimei PcPAL pe nanoparticule magnetice funcționalizate cu grupări epoxi. **b.** Imobilizarea PcPAL pe SwCNT_{COOH} prin linker. Reactanți și solvenți: *i)* CDI în CH₂Cl₂; *ii)* H₂N(CH₂)₃NH₂ în apă; *iii)* glicerol diglicidil eter în CH₂Cl₂; *iv)* PcPAL în Tris (0.1M, pH 8.8)



Imagine TEM dupa activarea nanotubului functionalizat



Imagine TEM dupa imobilizarea enzimei



Imagine TEM dupa reactie

Fig. 6.2. Imagini TEM utilizate in observarea procesului de imobilizare a PAL pe SWNT

OBTINEREA UNOR NOI BIOCATALIZATORI SELECTIVI: AGREGATE RETICULATE DE TIP BIS-EPOXIDIC

Agregatele de enzime reticulate (Cross-linked enzyme aggregates=CLEAs) se formeaza prin precipitarea lor dintr-un solvent in absenta oricarui suport, dar in prezenta unui agent de reticulare cum ar fi glutaraldehida (GA).

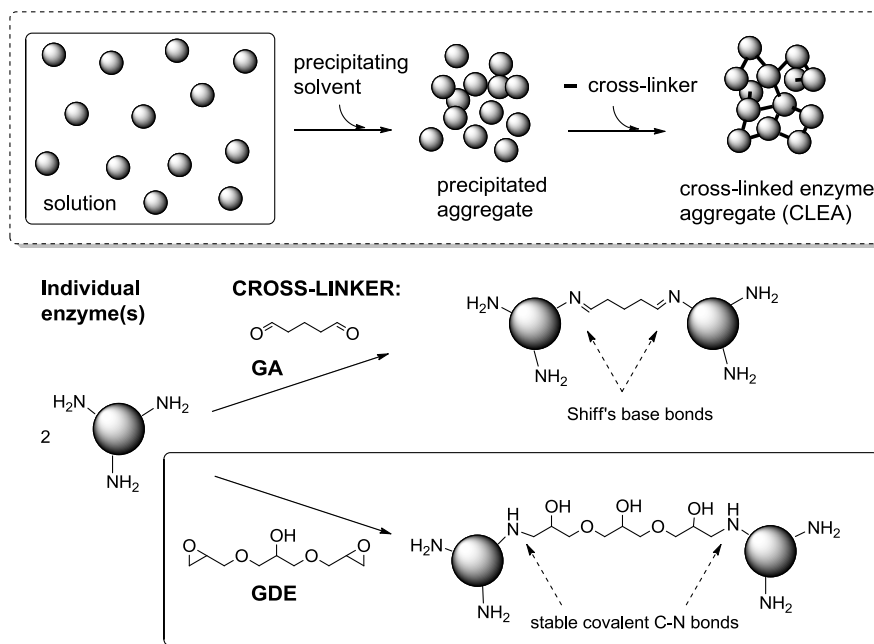
Optimizarea metodei de obtinere presupune modificarea solventului sau a cantitatii de GA (cel mai adesea), dar si folosirea altor aldehide reticulante sau coimobilizarea cu o alta proteina ca de exemplu BSA.

Pe de alta parte, poliglicidileterii ca si glicerol-diglicidileterul (GDE) sau polietilenglicol-diglicidileterul (PEGDGE) sunt utilizati pe scara larga ca si aditivi pentru reticularea unor polimeri cu grupari aminice, hidroxilice sau carboxilice. Cu toate acestea ei nu au fost inca utilizati la obtinerea CLEAs.

Studiul efectuat de noi a demonstrat pentru prima data posibilitatea de utilizare a GDE ca si reticulant ieftin de tip bisepoxidic pentru obtinerea CLEAs si a unor co-CLEAs a unor enzime in scopul utilizarii lor ca si biocatalizatori cu proprietati catalitice superioare.

Prepararea si morfologia unor CLEAs din lipase si PAL

Au fost preparate agregate de enzime reticulate ale fenilalaninamoniac-liazelor (Schema 6.1).



Schema 6.1. Prepararea CLEAs

A fost comparata stabilitatea mecanica a diferitelor agregate. In figura 6.2. este prezentata distributia dimensiunii particulelor agregatelor de PAL dupa ultrasonare timp de 300 si 600 secunde.

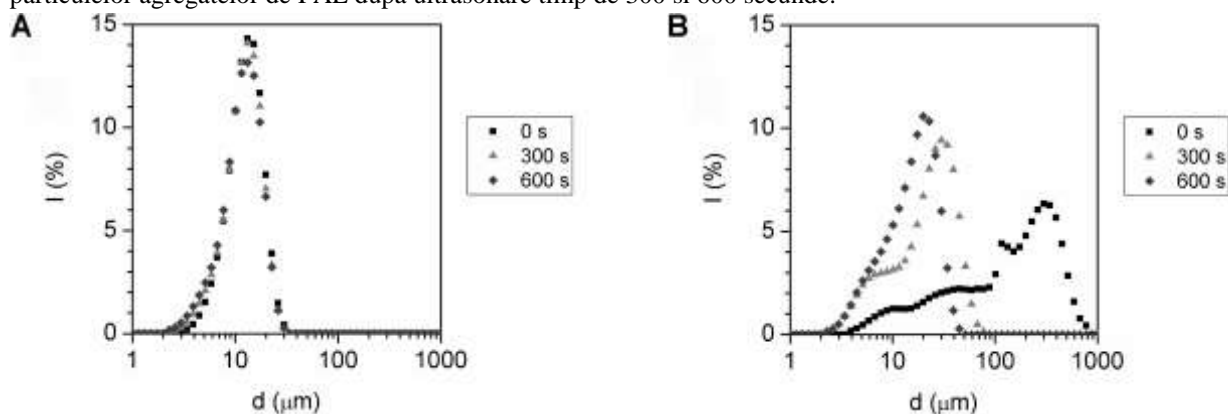


Figura 6.3. Modificarea distributiei dimensiunii particulelor agregatului de PAL obtinut prin reticulare cu GDE (A) si GA (B) dupa ultrasonare timp de 300 si 600 s

Se observa ca CLEAs obtinute cu GDE prezinta o distributie mai uniforma (cca 16 μm) si o rezistenta superioara la ultrasonare decat cele obtinute cu GA (cu o dimensiune de cca 19 μm). Prin compararea imaginilor SEM ale coagregatelor nereticulate PAL-BSA cu cele reticulate cu GDE si GA, se observa de asemenea diferente remarcabile (Figura 6.4).

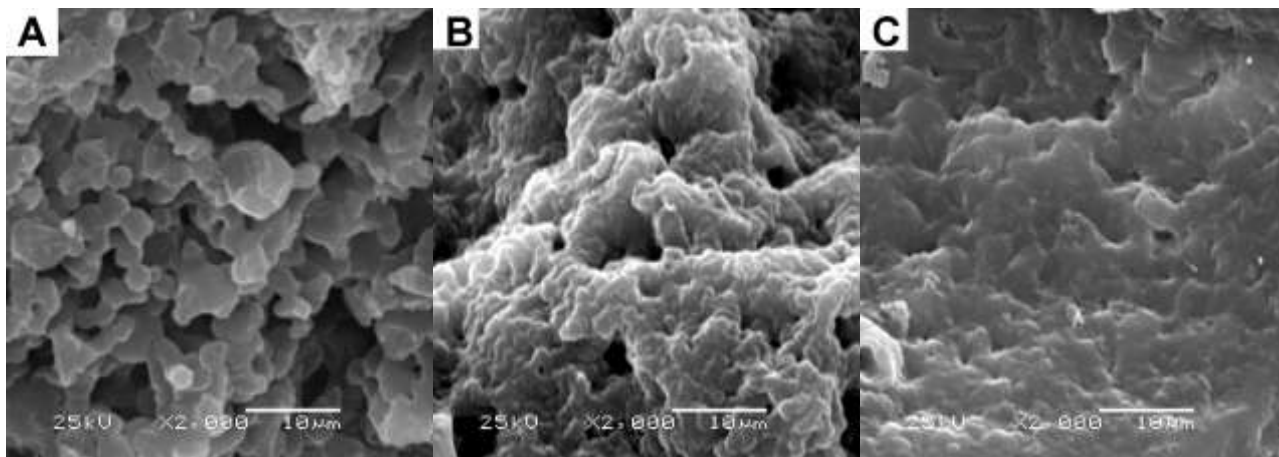
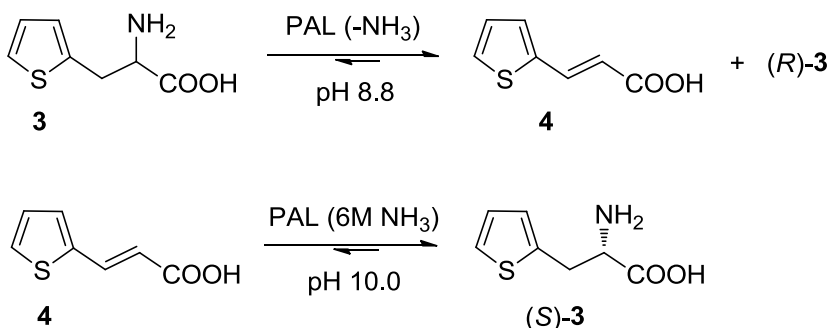


Figura 6.4. Imaginile SEM ale coprecipitatului PAL- BSA (A), PALsi BSA co-agregat si reticulat cu GDE (B) respectiv GA (C)

Pentru fiecare tip de enzima a fost studiata eficienta catalitica (Schema 6.2) si s-a incercat corelarea acestuia cu morfologia preparatului enzimatic.



Schema 6.2. Biotransformari realizate cu biocatalizatorii preparati

Agregatele preparate cu PAL pur recombinant din *P. crispum* au fost testate in reactia de eliminare a amoniacului din tiofen-2-il-alanina racemic *rac*-3, reactia de eliminare fiind mai rapida decat pentru substratul natural, L-Phe.

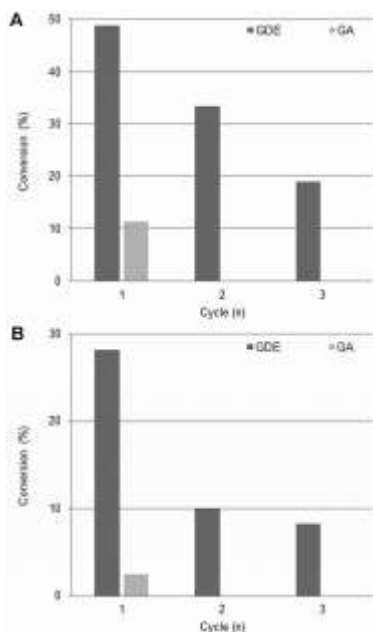


Figura 6.5. Recircularea coagregatului PAL-BSA reticulat cu GDE si GA in reactia de eliminare din *rac*-3 (A) si in reactia de aditie la 4 (B) a amoniacului

Desi ambele tipuri de agregate s-au dovedit active pentru reactia de eliminarea amoniacului din L-Phe sau acid 2-amino-3-(tiofen-2-il)propionic *rac*-3, in reactia inversa de aditie toate au fost lipsite de activitate. In schimb coagregatele cu BSA reticulate atat cu GA cat si cu GDE au fost active atat in reactia de eliminare din 3 (Figura 6.5A) cat si in cea de aditie la 4 (Figura 3.3B). In ceea ce priveste recircularea s-a observat o diferenta mare intre stabilitatea coagregatelor reticulate (Figura 6.5). Produsele obtinute cu GDE ca agent de reticulare isi mentin activitatea aproape nealterata chiar si dupa 3 recirculari, chiar si in mediu puternic bazic (Figura 6.5B; 6 M NH₃, pH 10.0), in timp ce cele preparate cu GDE sunt complet inactivate deja dupa prima utilizare.

Astfel putem afirma ca reticularea cu GDE maresc nu doar stabilitatea mecanica, ci si cea operationala.

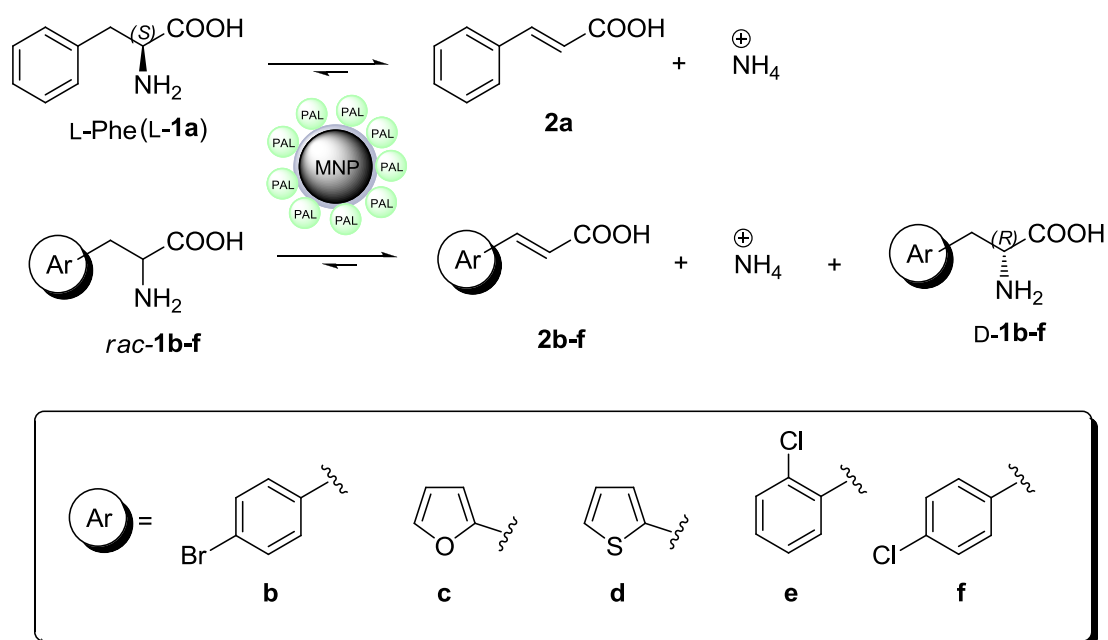
7. Platforma Magne-Chip pentru biotransformarea analogilor de fenilalanină utilizând PAL/PAM imobilizată covalent pe nanoparticule magnetice

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-bromofenil)propanoic (**rac-1b**), care nu a mai fost testat ca și substrat pentru PcPAL neimobilizat.

A fost analizată experimental fiabilitatea și reproductibilitatea experimentelor 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 substraturi nenaturale (**rac-1b-f**, în Schema 7.1). 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 7.1—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 recordul 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 (Figura 7.1, pozițiile S-A, S-B, ...S-F) cu substratul adecvat din stocurile de substrat A-F. Odată ce siringa 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

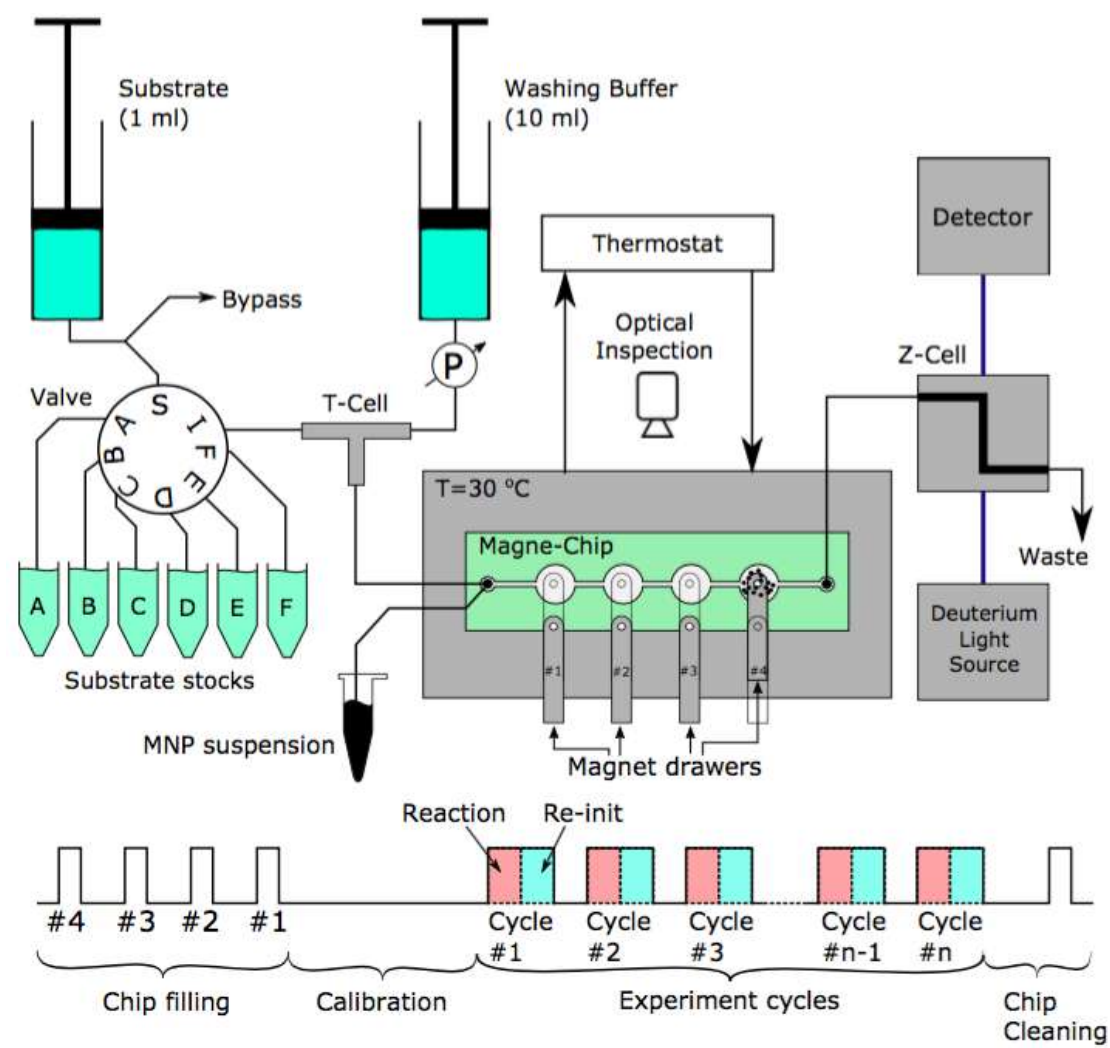


Figura 7.1. Diagrama schematică a sistemului de control a fluidelor

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

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.

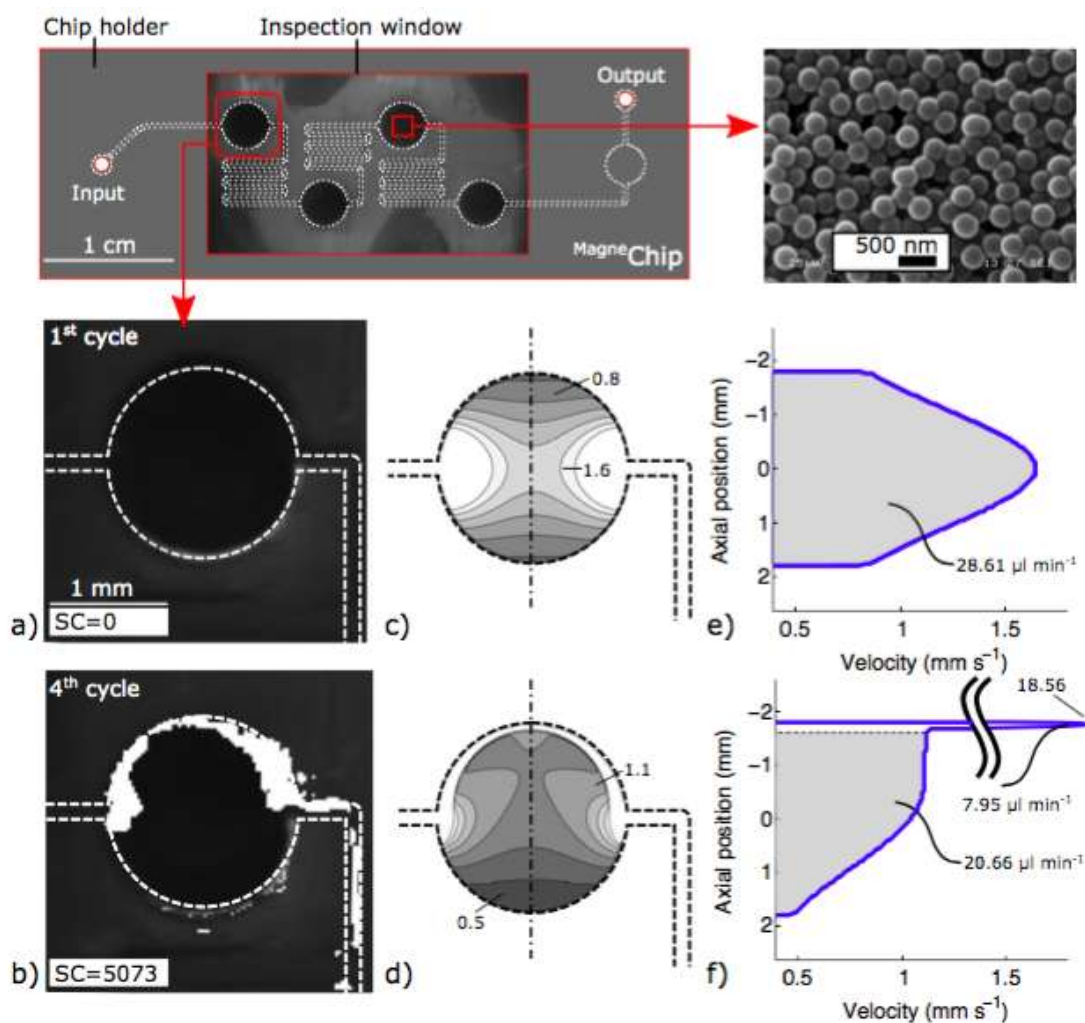


Figura 7.2 Dispozitiv Magne-Chip cu patru microcamere încărcate cu MNPs. Imagini SEM al stratului de MNP (dreapta). a)-f): Efectul bulelor de aer a) fotografie înainte de trecere b) imaginea diferențială (scor de diferență $SC=5073$), după trecere c) viteza calculată a debitului înainte și d) după trecere, e) profilul vitezei în secțiunea de mijloc al camerei înainte și f) după trecere

Tabel 7.1 – 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

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. $3.13 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

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 enzimatice.

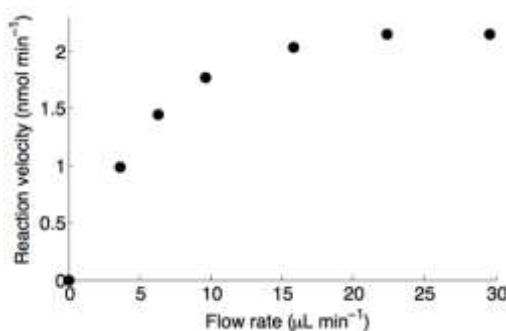


Figura 7.3 Dependența de debit a vitezei de reacție în Magne-Chip la transformarea L-Phe în acid (*E*)-cinamic acid mediată de MNP-PAL.

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 7.4). S-a constatat că reacția urmează o cinetică de ordinul întâi până la $[S] = 3 \text{ mM}$, și se saturează la $[S] = 20 \text{ mM}$.

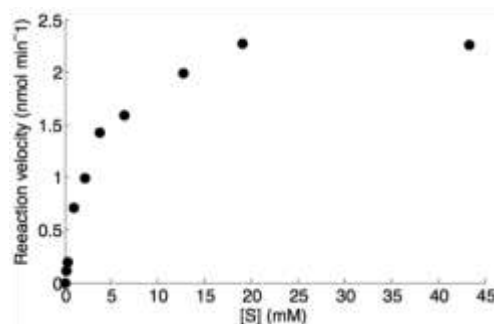


Figura 7.4 Dependența vitezei de reacție de concentrația de substrat în Magne-Chip la transformarea L-1a la 2a catalizată de MNPs. Valoarea saturației s-a atins la 20 mM

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 7.1). În primul rând s-au determinat coeficienții de extincție pentru produșii de eliminare (2a-f, Schema 7.1), la lungimile de undă selectate (Figura 7.5).

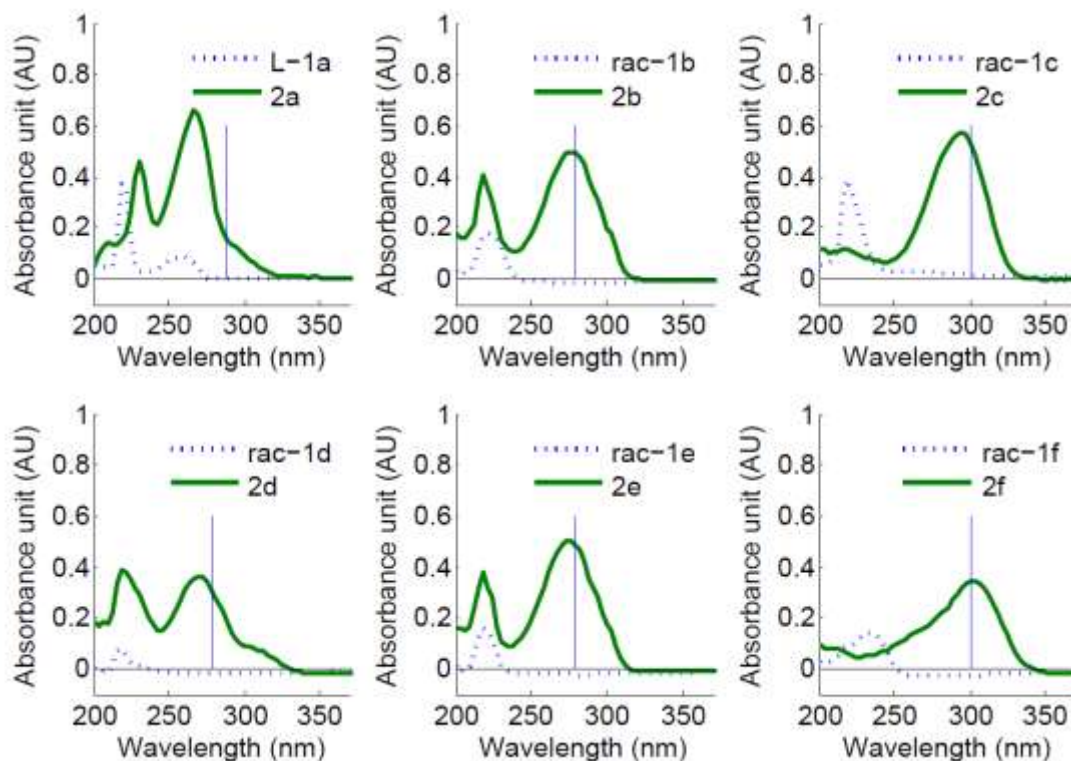
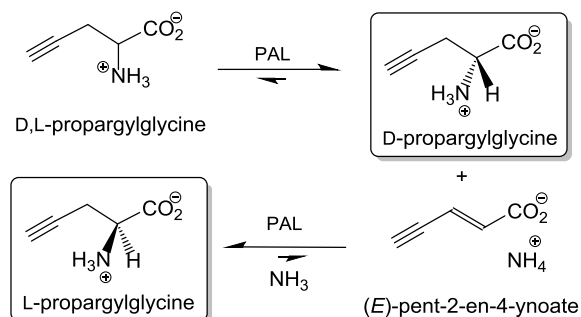


Figura 7.5 Spectrele de absorbție ale L-1a și *rac*-1b-f (linii verzi) și ale acizilor acrilici corespunzătorii 2a-f (linii mov punctate). Coeficienții de extincție s-au determinat la lungimile de undă indicate de liniile albastre.

8. 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 8.1.) cu randamente bune.



Schema 8.1. Sinteza D și L-propargilglicinei cu PAL-MNPs.

Schema dispozitivului este redată în Figura 8.1.

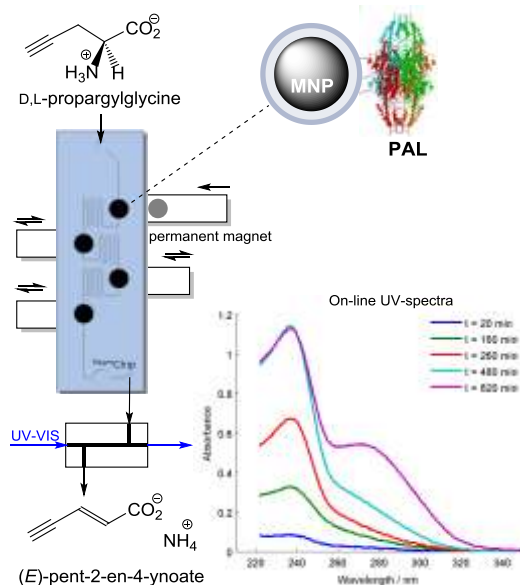
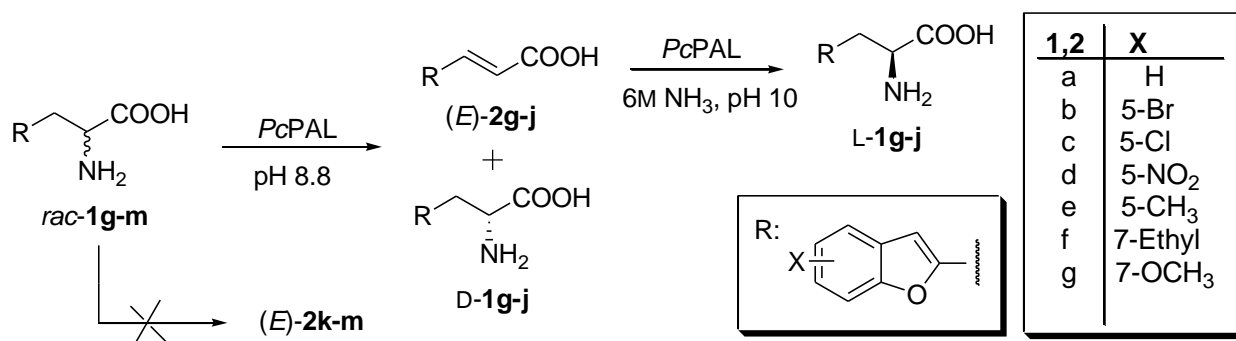


Figura 8.1. Conversia D,L-propargilglicinei în reactor microfluidic cu celule magnetice multiple umplute cu PAL imobilizat pe nanoparticule magnetice.

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

9. Sinteza preparativă biocatalitică a derivaților L, D 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 9.1). S-a constatat că analogul nesubstituit, respectiv cei substituiți cu grupări electronatrăgătoare s-au dovedit a fi substraturi ai fenilalanin amoniac liazei (Tabel 9.1), în timp ce structurile care posedă grupări electron respingătoare s-au dovedit a fi inhibitori ai enzimei.



Schema 9.1. Biotransformări catalizate de PAL imobilizat covalent pe nanotuburi de carbon.

Tabel 9.1. 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</i> - 8g	D- 8g	>98	+14,4
<i>rac</i> - 8h	D- 8h	>99	+31,0
<i>rac</i> - 8i	D- 8i	>99	+29,3
<i>rac</i> - 8j	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

10. Biotransformarea substraturilor cu PAL și PAM imobilizate pentru sinteza ambilor enantiomeri ai α- și β-arilalaninelor

Fenilalanin amoniac liazele (PAL; EC 4.1.3.24) catalizează deaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei în acid (*E*)-cinamic, iar fenilalanin 2,3-aminomutazele (EC 5.4.3.x) catalizează izomerizarea L-fenilalaninei la L- sau D-β-fenilalanine, în funcție de originea enzimei (Fig. 10. 1). PAL a fost folosit ca biocatalizatori pentru sinteza L-α-amino acizilor din acriilați și în procese de rezoluție cinetică cu formarea D-α-aminoacizilor din racemați, iar tandemul PAL-PAM pentru sinteza L- sau D-β-arilalaninelor (PAM).

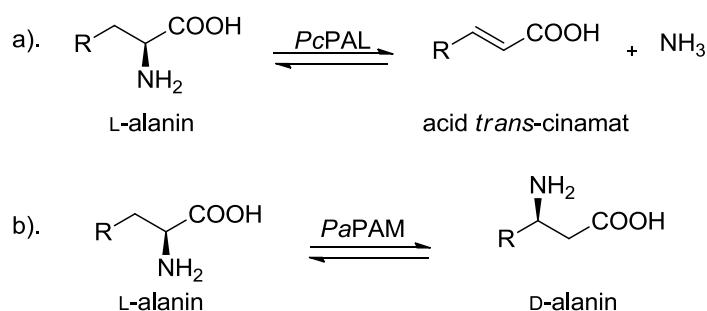


Figura. 10.1. Reacții catalizate de PAL (a.) și PAM (b.).

Enzimele *PcPAL* și *PaPAM* cele mai active, stabile și selective enzime în forma lor purificate și imobilizate cu cele două forme menționate au fost utilizate atât în reactoare cu amestecare perfectă, dar și în reactoare tubulare cu deplasare totală, pentru obținerea ambilor enantiomeri ai unor analogi nenaturali ai α- și β-arilalaninei. Astfel, am propus două metode. (*R*)-β-fenilalanina a fost obținută pornind de la β-fenilalanina racemică, folosind *PaPAM* și *PcPAL* în tandem. Enzima *PaPAM* transformă (*S*)-β-fenilalanina în (*S*)-α-fenilalanina, care în prezență de *PcPAL* este convertită în acid cinamic (**Fig. 10.2.b.**). Obținerea (*S*)-β-arilalaninei presupune două etape. În prima etapă, *PaPAM* catalizează transformarea (*S*)-α-arilalaninei, obținută prin reacția de adiție de amoniac la acidul cinamic corespunzător, în (*S*)-β-arilalanină, însă reacția se oprește la concentrațiile de echilibru ale acestora. Din această cauză enzima *PaPAM* imobilizată a fost îndepărtată din mediul de reacție și *PcPAL* a fost adăugat pentru a transforma (*S*)-α-arilalanina nereacționată în acidul acrilic (**Fig. 10.2.a.**). Aminoacizii enantiopuri au fost purificați pe schimbători de ioni.

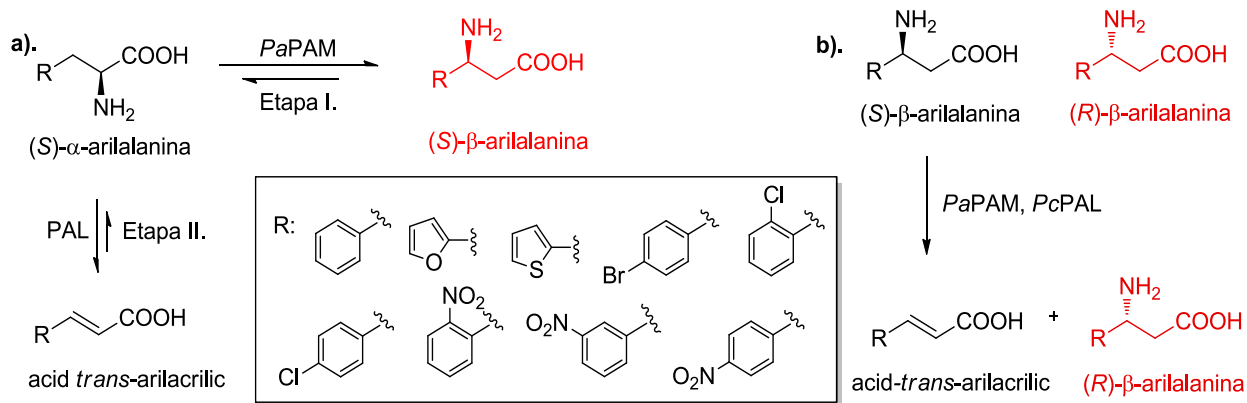


Fig. 10.2 Sinteza de (*S*)-β-arylalanina (a.) și sinteza de (*R*)-β-arylalanina (b).

Monitorizarea reacțiilor și determinarea conversiilor a avut loc cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) folosind coloana achirală GEMINI NX-C-18 (150 × 4.6 mm × 5 μm), respectiv soluție de NH₄OH (0.1 M, pH 9.3) și metanol drept fază mobilă, debit 1 mL min⁻¹. Condițiile de separare, respectiv coeficienții de extincție sunt prezentate în tabel 1. Enantiopuritatea compușilor a fost determinată în condiții chirale, folosind coloana chirală Crownpak CR-I(+) (150 × 3.0 mm × 5 μm) și soluție de HClO₄ (pH 1.5):acetonitrilul 70:30 drept fază mobilă, debit: 0.4 mL min⁻¹.

Tabel 10.1. Condițiile de separare și coeficienții de extincție ai compușilor

Compuși	Eluent* [% B]	λ [nm]	Coeficient de extincție**		
			2 vs 1	3 vs 1	3 vs 2
Phenil	de la 10 la 39 in 12 min	220	1.988	0.161	0.084
Tiofen-2-il	de la 10 la 39 in 12 min	250	1.146	0.413	0.387
2-Fluorofenil	de la 10 la 39 in 12 min	220	1.249	0.139	0.119
3-Fluorofenil	de la 10 la 39 in 12 min	220	3.039	0.156	0.05
4-Fluorofenil	de la 10 la 39 in 12 min	220	1.388	0.123	0.095
2-Clorofenil	de la 10 la 39 in 12 min	220	–	–	0.386
3-Clorofenil	de la 15 la 50 in 15 min	220	0.817	0.265	–
4-Clorofenil	de la 15 la 50 in 15 min	220	0.948	0.679	–
2-Nitrofenil	de la 10 la 50 in 15 min	260	–	–	0.019
3-Nitrofenil	de la 10 la 50 in 15 min	260	2.238	0.144	–
4-Nitrofenil	de la 10 la 50 in 15 min	220	1.138	1.228	–

*Eluent **A**: NH₄OH (0.1 M, pH 9.0); **B**: MeOH

** **1**– *rac*-α-arylalanine; **2**– *rac*-β-arylalanine; **3** – acizi arilacrilici

Sinteza (*R*)-β-arylalaninelor

β-Aminoacidul racemic (2 mg) se dizolvă în (NH₄)₂CO₃ (0.1M, pH 8.8, 1 mL), se adaugă enzimele PaPAM (0.6 mg) și PcPAL (0.4 mg) ambele imobilizate iar amestecul astfel format se incubează la 30°C sub agitare continuă. În diferite intervale de timp se ia 70 μL de probă din reacție, se adaugă 70 μL de metanol în vederea precipitării enzimei. Soluția se filtrează, se diluează cu fază mobilă (160 μL) și se injectează la HPLC. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 10.2.

Tabel 10.2. *Rac*- β -arilalanine transformate de *PaPAM* și *PcPAL*

Substrat	timp (h)	Conv. (%)
(\pm)- β -fenilalanină	4	15.56
	19	22.41
(\pm)- β -tiofen-2-il alanină	4	4.78
	19	5.69
(\pm)-2-fluoro- β -fenilalanină	4	18.22
	19	23.55
(\pm)-3-fluoro- β -fenilalanină	4	13.68
	19	14.35
(\pm)-4-fluoro- β -fenilalanină	4	7.28
	19	10.34
(\pm)-2-cloro- β -fenilalanină	4	18.81
	19	24.65

Rezultatele obținute indică faptul că natura și poziția substituenților modifică semnificativ activitatea enzimei *PaPAM*, și în consecință, viteza și eficiența reacției în tandem. Astfel, β -fenilalaninele *orto*-substituite respectiv heteroaril-alaninele sunt substraturi bune pentru *PaPAM*, spre deosebire de β -fenilalanine *meta*- și *para*-substituite (cu excepția fluoroderivaților) în cazul cărora nu am obținut conversii multumitoare.

Sinteza (*S*)- β -arilalaninelor

Obținerea (*S*)- β -arilalaninei pornește de la (*S*)- α -arilalanină, care se prepară prin adiția amoniacului (6M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ soluție apoasă) la acidul acrilic corespunzător catalizată de către *PcPAL*.

Acidul cinamic corespunzător (2 mg) se dizolvă în soluție de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (6M, pH 10, 1 mL, se adaugă *PcPAL* (0.4 mg) iar amestecul se incubează la 30°C sub agitare continuă. După terminarea reacției, enzima se inactivează prin încălzirea soluției la 95°C timp de 5 minute, după care enzima denaturată se îndepărtează prin filtrare. Soluția obținută se îngheață la -80°C (30 min) și se pune la liofilizat peste noapte. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 10.3.

Tabel 10.3. Sinteza (*S*)- α -alaninelor prin reacția de adiție de amoniac catalizată de *PcPAL*

Substrat	timp (h)	ee _p (%)	Conv. (%)
acid cinamic	48	99	91
acid tiofen-2-il acrilic	48	99	97
acid 2-fluoro acrilic	48	99	98
acid 3-fluoro acrilic	48	99	95
acid 4-fluoro acrilic	48	99	92
acid 3-cloro acrilic	48	99	95
acid 4-cloro acrilic	48	99	91
acid 3-nitro acrilic	48	93	96
acid 4-nitro acrilic	48	85	99

În a doua etapă (*S*)- α -arilalanina obținută anterior se dizolvă în soluție de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0.1M, pH 8.8, 1 mL, se adaugă PaPAM (0.6 mg) iar amestecul se incubează la 30°C sub agitare continuă. După atingerea echilibrului, PaPAM se îndepărtează prin filtrare și apoi PcPAL (0.4 mg) se adaugă în masa de reacție. Amestecul format se incubează la 30°C. Progresul reacției se monitorizează cu ajutorul cromatografiei.

Trebuie menționat faptul că în acest caz enzima PaPAM nu transformă α -alaninele substituie în poziția *orto* cu Cl-, respectiv cu NO₂-, dar alaninele *meta*- și *para*-substituie sunt acceptate drept substrat.

Tabel 10.4. Sinteza (*S*)- β -alaninelor pornind de la (*S*)- α -alanine catalizată de PaPAM și PcPAL

Substrat	timp (h)	ee _{β} (%)	Conv. ¹ (%)	Conv. ² (%)
<i>(S)</i> - α -fenilalanină	17	99	47.74	2.52
	48	99	57.95	5.48
<i>(S)</i> -tiofen-2-il α -alanină	17	99	24.52	13.5
	48	99	26.42	14.51
<i>(S)</i> -2-fluoro- α -alanină	17	99	2.77	32.30
	48	99	2.92	43.65
<i>(S)</i> -3-fluoro- α -alanină	17	99	6.68	65.54
	48	99	7.06	69.94
<i>(S)</i> -4-fluoro- α -alanină	17	99	28.68	11.94
	48	99	34.46	14.50
<i>(S)</i> -3-cloro- α -alanină	17	99	9.71	6.47
	48	99	9.81	6.56
<i>(S)</i> -4-cloro- α -alanină	17	99	13.16	10.87
	48	99	13.32	10.87
<i>(S)</i> -3-nitro- α -alanină	17	-	-	-
<i>(S)</i> -4-nitro- α -alanină	17	-	-	-

¹Conversia transformării (*S*)- α în (*S*)- β ;

²Conversia transformării (*S*)- α în acid acrilic

Folosind sistemul de reacție MagneChip s-au optimizat procedurile în flux continuu pentru sintezele ambilor enantiomeri ai α - și β -arilalaninelor; concentrația substraturilor a fost reglată astfel încât să se atingă conversiile maxime admisibile.

Realizări științifice:

Au fost realizate următoarele activități principale, fiind obținute rezultatele aferente:

- o bibliotecă de 10 gene PAL și PAM native și mutante
- protocoale de exprimare și caracterizare a enzimelor
- sinteza diverselor substraturi potențiale nenaturale ale enzimelor
- protocoale de imobilizare a enzimelor

- investigarea interacțiunii potențialelor substraturi cu toate enzimele
- alegerea celor mai eficiente PAL și PAM
- elaborarea proceselor biocatalitice cu enzime solubile, respectiv biotransformări celulare
- testarea eficienței enzimelor imobilizate
- procese continue cu PAL și PAM imobilizate covalent pe nanoparticule magnetice și nanotuburi de carbon divers funcționalizate
- sinteza eficientă în regim discontinuu și continuu a enantiomerilor α - și β -aminoacizilor cu structuri diverse

Diseminarea rezultatelor cercetării:

Au fost publicate 8 articole științifice în reviste cotate ISI și rezultatele au fost diseminate prin 16 participări la conferințe internaționale de specialitate.

Dezvoltarea resursei umane:

Tinerii cercetători membri ai echipei de realizare a proiectului care au finalizat teza de doctorat în tematica proiectului: Alexandra Mantu, Andrea Varga.

Cercetătorul postdoctoral Brem Jurgen a obținut, inclusiv pe baza experienței acumulate în perioada în care a fost activ în cadrul proiectului, o bursa de cercetare postdoctorală la Universitatea din Oxford.