

Raport științific sintetic al proiectului
AMONIAC LIAZE SI AMONIAC MUTAZE NATIVE SI MUTANTE IMOBILIZATE
PENTRU OBTINEREA ANALOGLOR DE ALFA- SI BETA-FENILALANINA
pentru anul 2014

OBIECTIVUL 1: SINTEZA SI CARACTERIZAREA SUBSTRATURILOR PENTRU ENZIMELE OBTINUTE

1. 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 aldehydele 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 cloroderivaților, 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 1, Calea 1.).

Acizii 3-amino-3-((hetero)aril-2-il)propionici au fost obținuți prin reacție Rodionov modificat. Cuplarea aldehydelor 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 1, Calea 2.).

Sinteza acizilor (*E*)-3-(hetero)aril acrilici constă în 2 etape (Figura 1, Calea 3.). Aldehydele 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.

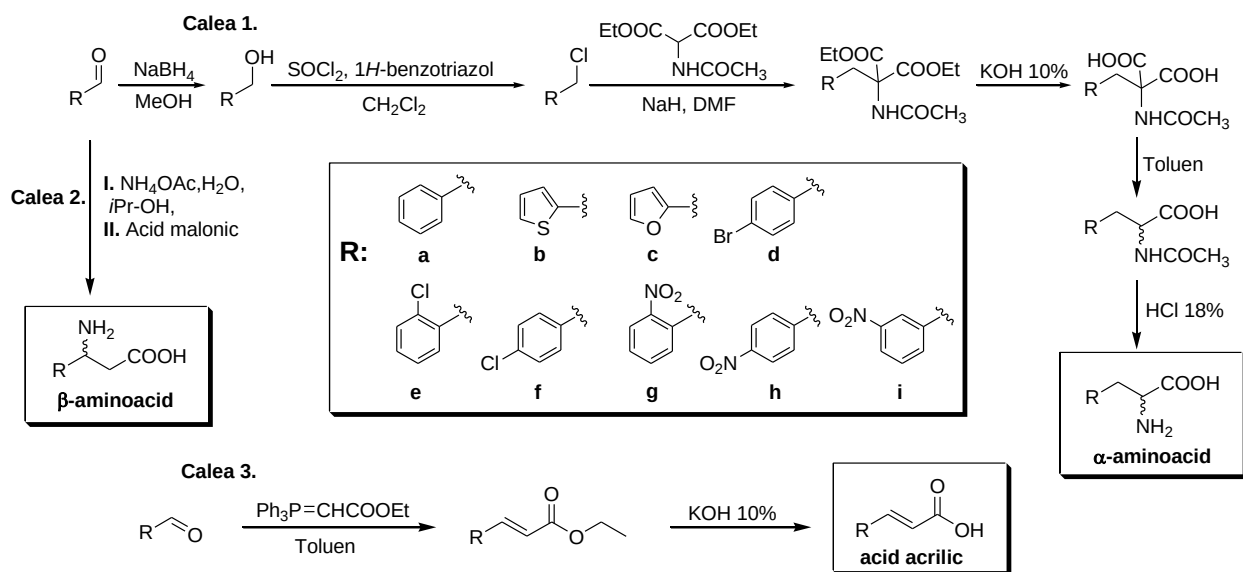


Figura 1. Sinteza substraturilor racemice

2. Sinteza acizilor 2-amino-3-((hetero)aril-2-il)propionici.

Într-o soluție metanolică a (hetero)aril-aldehidei corespunzătoare (0.04 mol) s-a adăugat NaBH_4 (0.075 mol) în porțiuni mici până la transformarea completă a materiei prime (verificare cu TLC). Solventul a fost evaporat la presiune scăzută, produsul a fost tratat cu soluție de HCl 10% (10 mL) și extras cu CH_2Cl_2 . Faza organică a fost separată, uscată pe Na_2SO_4 anhidru și concentrată la vid, obținând produsul pur.

Peste o soluție de alcool în CH_2Cl_2 uscat (30 mL) s-a adăugat benzotriazol (0.075 mol) și SOCl_2 (0.075 mol) în picături. Înainte de a adăuga întreaga cantitate de clorură de tionil, se observă precipitarea clorohidratului benzotriazolului. Amestecul de reacție a fost lăsat sub agitare încă 15 minute apoi solidul a fost îndepărtat prin filtrare și spălat cu CH_2Cl_2 uscat. Filtratul a fost spălat cu o soluție de HCl 10%, apoi cu apă și cu o soluție de NaOH 5%. Faza organică separată a fost anhidrificată cu Na_2SO_4 anhidru. Produsul brut a fost uscat la presiune scăzută prin liofilizare și folosit imediat în următoarea etapă.

O suspensie uleioasă de NaH 55% (19.5 mmol) a fost adăugată în dimetilformamidă uscată (20 mL), amestecul fiind agitat energic timp de 30 de minute sub argon, la temperatura camerei. În continuare, la amestecul de reacție s-a adăugat dietil esterul acidului 2-acetilamino malonic (20 mmol), menținându-se astfel sub agitare încă 30 de minute. S-a adăugat apoi derivatul clorometilenic, amestecul menținându-se sub agitare la temperatura camerei 3 ore și încă 4 ore la 60°C. La final, acesta a fost turnat pe gheață. Precipitatul obținut a fost filtrat, uscat la vid, spălat cu eter dietilic și folosit imediat în următoarea etapă.

Dietil esterul acidului *N*-acetil-malonic substituit (0.75 g) dizolvat în metanol a fost adăugat la o soluție de NaOH 10%, amestecul de reacție astfel obținut fiind refluxat timp de câteva ore. Metanolul a fost îndepărtat prin evaporare la vid, amestecul de reacție a fost extras cu CH_2Cl_2 iar pH-ul a fost ajustat la 1 cu o soluție concentrată de HCl la -10°C. Precipitatul rezultat a fost filtrat și uscat la vid. Acidul dicarboxilic astfel format a fost suspendat în toluen și refluxat timp de 2 ore. După îndepărtarea solventului prin evaporare la vid s-a obținut produsul pur.

Aminoacidul *N*-protejat a fost suspendat într-o soluție de HCl 18% iar amestecul a fost refluxat timp de 6 ore, ulterior răcit la temperatura camerei, obținându-se astfel produsul dorit sub forma unui precipitat care a fost apoi filtrat, uscat și în final spălat cu eter dietilic. În continuare, precipitatul a fost resuspendat în apă, s-a ajustat pH-ul soluției formate la 5-6, s-a menținut astfel sub agitare timp de 30 de minute iar apoi s-a filtrat și s-a uscat la temperatura camerei.

acid 2-amino-3-fenilpropionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.44 – 7.40 (m, 2H), 7.32 – 7.24 (m, 3H), 3.69 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.25 (dd, J = 12.4, 7.1 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 12.3, 7.1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 174.27, 135.46, 130.11, 128.78, 127.00, 56.13, 36.72. HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (M^+)⁻ 165.0794. Found 165.0802.

acid 2-amino-3-(tiofen-2-il)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3.38-3.49 (m, 2H), 4.05-4.08 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.17 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 35.7, 58.0, 125.4, 127.2, 128.0, 141.2, 181.6; HRMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$ (M^+)⁻ 171.0354. Found 171.0349.

acid 2-amino-3-(furan-2-il)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 3.56-3.71 (m, 2H), 4.14-4.17 (m, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 8.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 34.1, 56.0, 107.9, 111.3, 142.8, 153.6, 181.8; HRMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_3$ (M^+)⁻ 155.0582. Found 155.0571.

acid 2-amino-3-(2-clorofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.53 – 7.46 (m, 1H), 7.39 – 7.30 (m, 3H), 4.34 (dd, J = 8.4, 6.4 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 14.4, 6.4 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 14.4, 8.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 171.55, 133.92, 131.97, 131.76, 129.87, 129.67, 127.60, 53.03, 33.82; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClNO}_2$ (M-H)⁻ 198.0316. Found 198.0331.

acid 2-amino-3-(4-clorofenil)propionic: ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 7.01 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.14 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 2.62 (dd, J = 13.4, 5.6 Hz, 1H), 2.47 (dd, J = 13.4, 7.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (76 MHz, D_2O) δ 181.99, 136.66, 131.34, 130.63, 128.16, 57.09, 40.00; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClNO}_2$ (M-H)⁻ 198.0316. Found 198.0328.

acid 2-amino-3-(2-nitrofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.11 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.70 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.55 (ddd, J = 8.5, 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 4.11 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.53

(dd, $J = 14.0, 6.9$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 14.0, 7.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 173.24, 148.71, 134.32, 133.17, 130.64, 129.05, 125.52, 55.26, 33.99; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ (M-H) $^-$ 209.0557 Found 209.0571.

acid 2-amino-3-(3-nitrofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.19 (dd, $J = 6.7, 1.3$ Hz, 2H), 7.72 (dt, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.64 – 7.59 (m, 1H), 4.39 (dd, $J = 7.4, 6.0$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 14.7, 6.0$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 14.7, 7.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 171.18, 148.06, 136.19, 136.11, 130.24, 124.23, 122.99, 53.87, 35.18; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ (M-H) $^-$ 209.0557 Found 209.0567.

acid 2-amino-3-(4-nitrofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.36 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 14.6, 6.0$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 171.22, 147.17, 142.23, 130.46, 124.12, 53.81, 35.44; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ (M-H) $^-$ 209.0557 Found 209.0571.

acid 2-amino-3-(4-bromofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.91 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.64 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.62 (dd, $J = 7.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.71 (dd, $J = 14.6, 5.5$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 14.6, 7.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 180.58, 135.25, 133.45, 132.88, 122.78, 56.49, 36.90. HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrNO}_2$ (M-H) $^-$ 242.9895 Found 242.9901.

3. Sinteza acizilor 3-amino-3-((hetero)aril-2-il)propionici.

Amestecul benzaldehidei substituie (20 mmol) cu acetat de amoniu (35.7 mmol) și o cantitate catalitică de H_2O a fost agitat în alcool izopropilic timp de 30 min la 50°C , apoi a fost adăugat acid malonic (15.7 mmol) și amestecul de reacție a fost lăsat la reflux timp de 8 ore. Aminoacidul format a fost filtrat la cald, spălat cu alcool izopropilic și uscat la temperatură scăzută.

acid 3-amino-3-fenilpropionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.39 (dd, $J = 8.2, 6.6$ Hz, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 1H), 4.58 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 12.3, 7.0$ Hz, 1H), 2.70 (dd, $J = 12.4, 7.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 173.10, 141.51, 128.28, 127.67, 126.82, 53.03, 42.27. HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (M+) $^+$ 165.0794. Found 165.0802.

acid 3-amino-3-(furan-2-il)propionic: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.71 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.47 (dd, $J = 3.3, 1.8$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J = 9.5, 5.1$ Hz, 1H), 3.10 (dd, $J = 16.6, 5.2$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 16.6, 9.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.43, 149.75, 143.43, 110.91, 109.22, 44.38, 36.06; HRMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3$ (M-H) $^-$ 154.0499. Found 154.0511.

acid 3-amino-3-(tiofen-2-il)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.50 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 4.96 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 15.4, 6.4$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 15.4, 5.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 176.78, 138.15, 127.44, 127.08, 47.99, 40.77; HRMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_2\text{S}$ (M-H) $^-$ 170.0270. Found 170.0283.

acid 3-amino-3-(2-clorofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.40 – 7.34 (m, 2H), 7.30 – 7.22 (m, 2H), 5.08 (dd, $J = 8.0, 6.3$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 17.4, 7.9$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 17.4, 6.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 173.06, 132.89, 132.22, 131.01, 130.30, 128.02, 127.55, 47.90, 36.49; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClNO}_2$ (M-H) $^-$ 198.0316. Found 198.0328.

acid 3-amino-3-(4-clorofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.50 – 7.40 (m, 4H), 4.82 – 4.73 (m, 1H and solvent peak), 3.16 (dd, $J = 17.2, 7.7$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 17.2, 6.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 173.21, 134.91, 133.72, 129.35, 128.66, 50.84, 37.49; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClNO}_2$ (M-H) $^-$ 198.0316. Found 198.0331.

acid 3-amino-3-(2-nitrofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.32 (dd, $J = 7.9, 6.2$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 17.6, 7.9$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J = 17.6, 6.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 172.94, 148.28, 134.94, 130.90, 129.53, 128.21, 125.76, 46.47, 36.97; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ (M-H) $^-$ 209.0557 Found 209.0568.

acid 3-amino-3-(3-nitrofenil)propionic: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.32 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.79 (s, 78H), 2.88 (dd, $J = 15.9, 7.7$ Hz, 1H), 2.80

(dd, $J = 15.9, 6.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 177.21, 148.14, 139.52, 133.65, 130.38, 123.83, 122.00, 52.12, 41.54; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ (M-H) $^-$ 209.0557 Found 209.0570.

acid 3-amino-3-(4-nitrofenil)propionic: ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 8.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.86 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 17.5, 7.6$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 17.5, 6.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 172.82, 148.04, 142.20, 128.46, 124.40, 50.75, 37.43; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$ (M-H) $^-$ 209.0557 Found 209.0568.

acid 3-amino-3-(4-bromofenil)propionic: ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.08 (dd, $J = 17.2, 7.6$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 17.2, 6.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 178.23, 154.14, 138.72, 131.65, 129.41, 118.63, 121.00, 52.12, 41.54. HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrNO}_2$ (M-H) $^-$ 242.9895 Found 242.9907.

4. Sinteza acizilor (E)-3-(hetero)aril acrilici.

La o soluție a aldehidei (10 mmol) în 20 mL toluen uscat, s-a adăugat esterul etilic al acidului trifenil- λ^5 -fosfaniliden acetic (12.5 mmol). Amestecul de reacție a fost refluxat timp de 2 ore, iar apoi toluenul a fost îndepărtat la vid. Precipitatul a fost dizolvat într-o cantitate minimă de CH_2Cl_2 , iar produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană folosind ca și eluent CH_2Cl_2 . În fiecare caz s-a format 2-5% izomer (Z).

Esterul acidului (E)-acrilic (10 mmol) a fost suspendat în 10% KOH (10 mL) și refluxat timp de 4 ore. După răcirea amestecului de reacție la 0°C și ajustarea pH-ului la 1 folosind HCl conc., precipitatul format a fost filtrat, spălat cu apă, uscat și purificat prin recristalizare.

acid (E)-3-fenilacrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.70 – 7.60 (m, 3H), 7.56 – 7.41 (m, 3H), 6.35 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.43, 146.21, 134.27, 129.77, 128.99, 128.86, 118.01. HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$ (M+) $^+$ 148.0528. Found 148.0534.

acid (E)-3-(furan-2-il)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6.96 (d, 1H), 7.22-7.23 (m, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.81 (d, 1H), 8.25 (d, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ 113.0, 113.6, 123.4, 128.1, 145.1, 152.1, 175.3. HRMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ (M+) $^+$ 138.0316. Found 138.0319.

acid (E)-3-(tiofen-2-il)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.72 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.29 (dt, $J = 5.1, 1.0$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 3.8, 1.1$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 6.18 (d, $J = 15.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ 124.7, 128.3, 129.1, 130.5, 133.7, 141.0, 175.1. HRMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$ (M+) $^+$ 154.0088. Found 154.0080.

acid (E)-3-(2-clorofenil)acrilic: ^1H NMR (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 8.07 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J = 7.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H), 7.36 (dtd, $J = 17.8, 7.4, 1.6$ Hz, 2H), 6.51 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 169.72, 141.47, 135.72, 133.79, 132.46, 131.13, 128.95, 128.56, 122.27; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClO}_2$ (M-H) $^-$ 181.0051. Found 181.0065.

acid (E)-3-(4-clorofenil)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.48 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.55 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.46, 142.55, 134.74, 133.23, 129.96, 128.95, 120.09; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClO}_2$ (M-H) $^-$ 181.0051. Found 181.0065.

acid (E)-3-(2-nitrofenil)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.06 (dd, $J = 8.1, 1.3$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.76 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.65 (ddd, $J = 8.7, 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.33, 148.69, 139.29, 134.30, 131.24, 129.79, 129.68, 125.10, 124.25; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_4$ (M-H) $^-$ 192.0291. Found 192.0301.

acid (E)-3-(3-nitrofenil)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 8.46 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.25 (ddd, $J = 8.3, 2.3, 1.0$ Hz, 1H), 8.02 (dt, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.07, 148.74, 142.04, 136.35, 133.36, 129.88, 124.05, 122.23, 121.27; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_4$ (M-H) $^-$ 192.0291. Found 192.0303.

acid (E)-3-(4-nitrofenil)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.51, 148.39, 141.76, 141.19, 129.75, 124.40, 124.11; HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_4$ (M-H) $^-$ 192.0291. Found 192.0303.

acid (E)-3-(4-bromofenil)acrilic: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.49 (s, 1H), 7.68 – 7.51 (m, 5H), 6.57 (d, J = 16.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.87, 143.06, 133.99, 132.30, 130.61, 123.98, 120.59. HRMS Calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrO}_2$ (M-H) $^-$ 225.9629. Found 225.0652.

5. 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). Acidul acrilic **2** a fost sintetizat din alcoolul propargilic (Fig. 2a), 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.

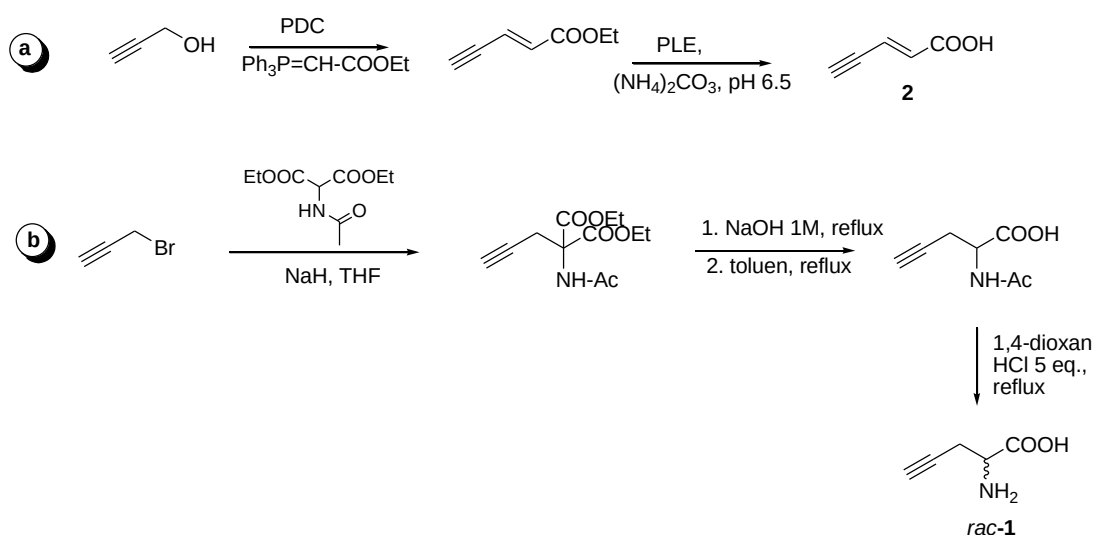


Figura.2. Strategia de sinteză a noilor potențiale substraturi nearomate ale enzimei PcPAL

Pentru obținerea aminoacidului racemic *rac*-**1** s-a pornit de la bromura de propargil care a fost cuplată cu acetamidomalonatul de dietil activat în prealabil cu NaH. Produsul obținut a fost hidrolizat în mediu bazic, diacidul format a fost decarboxilat și în final gruparea amidică a fost hidrolizată în mediu acid. Randamentul global a fost de 35%.

Structura substanțelor sintetizate a fost confirmată prin săpectrele ^1H , ^{13}C -RMN, și apoi utilizate ca și substraturi în reacțiile catalizate de PcPAL, cu scopul obținerii aminoacizilor enantiopuri.

6. Sinteza acidului (E)-pent-2-en-4-inoic 6

9,5 g (56 mmol) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCOOEt}$ și 10,5 g (56 mmol) piridinium-dicromat (PDC) au fost suspendate în 100 ml diclormetan uscat. Peste suspensie, sub agitare, a fost adăugată 1,5 g (53 mmol) alcool propargilic **4** dizolvat în 10 mL de diclormetan. Reacția a fost perfectată sub agitare (aprox. 16 h), urmată de evaporarea solventului la vid și de purificarea produsului prin cromatografie pe coloană, folosind diclormetan ca și eluent.

Derivatul esteric **5** (200 mg) obținut anterior a fost suspendat în 10 ml soluție tampon de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (100 mM, pH 7.5) conținând 20 mg de PLE (pig liver esterase), iar reacția a fost perfectată sub agitare (200 rpm) la 37 °C. pH-ul soluției a fost menținută pe parcursul reacției prin adăugarea unei soluții de 2M NH_3 . Reacția a fost oprită odată

când nu s-a mai observat modificarea pH-ului. pH-ul a fost ajustat la valoarea 10, urmată de extracție cu etilacetat. Fazele organice reunite au fost uscate cu sulfat de sodiu, solventul a fost evaporat la vid și produsul a fost purificat prin recristalizare din hexan.

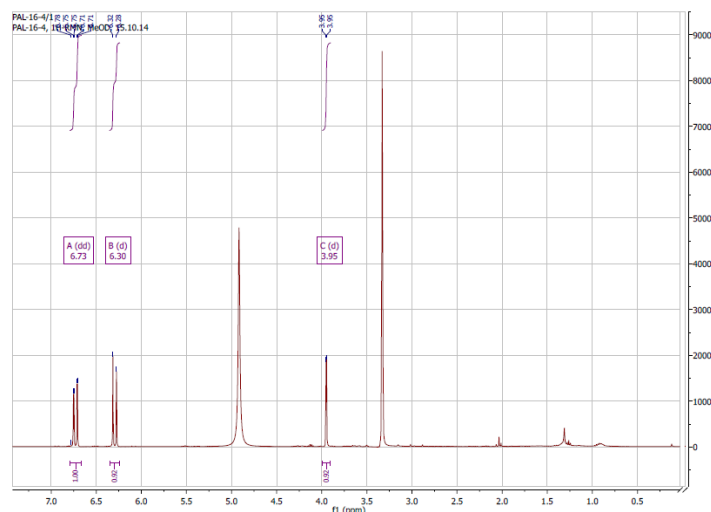


Figura 3. Spectrul ^1H -NMR al produsului 2.

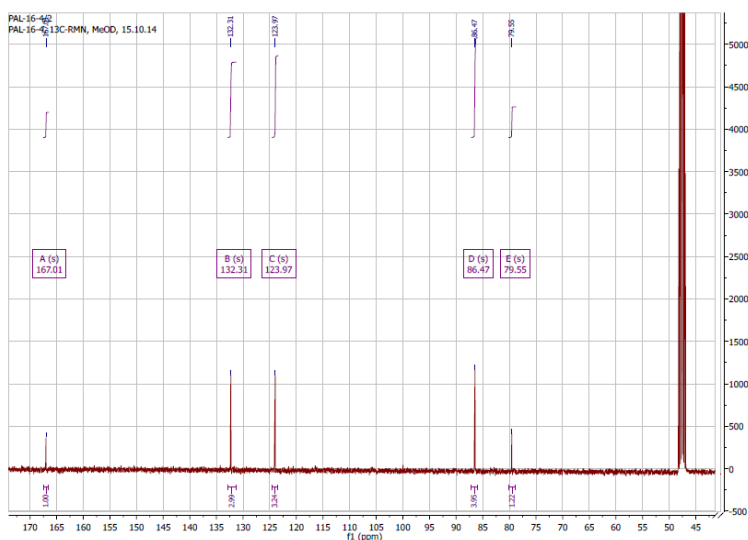


Figura 4. Spectrul ^{13}C -NMR al derivatului acrilic 2.

7. Sinteza propargil glicinei racemice *rac*-1

În amestecul obținut din 0,85 g (20 mmol) suspensie de 55% NaH și 20 ml DMF uscată, după agitare timp de 30 min sub argon s-au adăugat 19,5 mmol dietilacetamido-malonat și reacția a fost perfectată sub agitare timp de 30 min, urmată de adăugarea a 19 mmol bromură de propargil. Reacția a fost perfectată sub agitare timp de 3 ore la temperatura camerei, apoi 4 ore la 60 °C. După răcire masa de reacție a fost turnată pe un amestec gheață-apă (100 g). Precipitatul a fost filtrat, uscat la vid iar produsul dietilacetamidomalononic a fost purificat prin recristalizare din hexan.

Derivatul dietilacetamidomalononic obținut (0,5 g) a fost dizolvat în 5 ml MeOH, s-au adăugat 3 ml de NaOH 10%. Amestecul de reacție a fost agitat la 60 °C peste noapte (aprox. 12 h). După evaporarea solventului, lichidul vâcos a fost extras cu acetat de etil. pH-ul fazei apoase a fost ajustat la 1 cu HCl (37%), apoi precipitatul

format a fost extras în acetat de etil. Fazele organice reunite au fost uscate pe sulfat de sodiu. Solventul a fost evaporat iar produsul brut a fost dizolvat în toluen și refluxat timp de 4 h, obținându-se *N*-acetilpropargilglicina pură.

La soluția a 100 mg de *N*-acetilpropargilglicină în 15 ml 1,4-dioxan a fost adăugat 1 ml de HCl conc. Amestecul a fost refluxat timp de 4h, solventul evaporat la vid iar din lichidul vâscos s-a obținut după spălare cu acetonă un precipitat alb care a fost filtrat, uscat și identificat ca fiind clorhidratul propargilglicinei racemice *rac*-1.

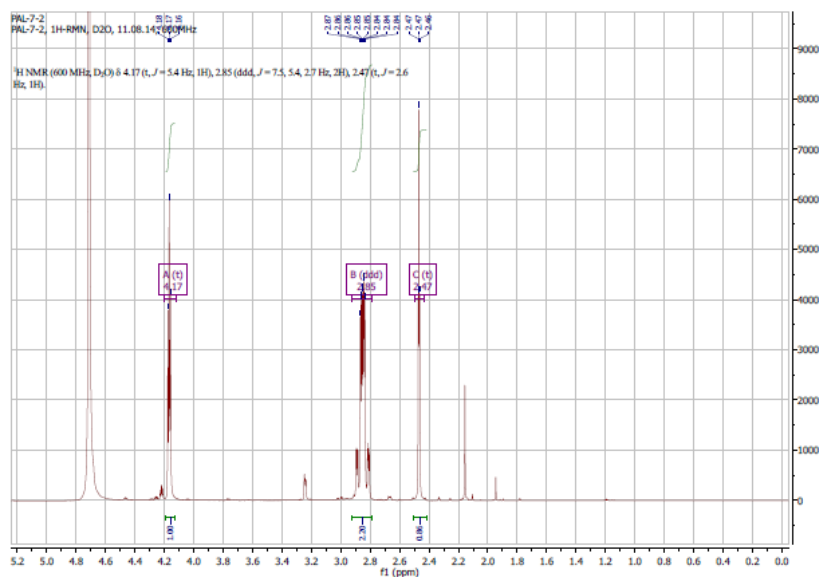


Figura 5. Spectrul ^1H -NMR a propargilglicinei racemice *rac*-1.

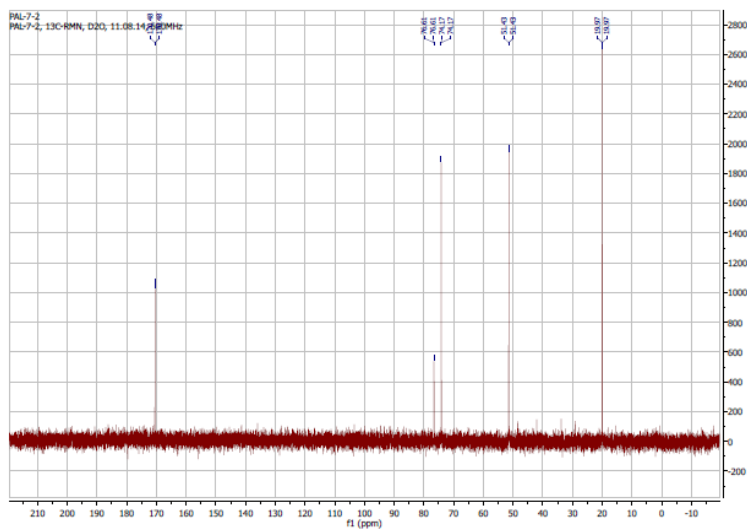


Figura 6. Spectrul ^{13}C -NMR a propargilglicinei racemice *rac*-1.

Transformările enzimatiche

Noile substraturi **2**, *rac*-1 sintetizate au fost testate în reacția de adiție (Figura 7a) și eliminare (Figura 7b) a amoniacului catalizată de PcPAL.

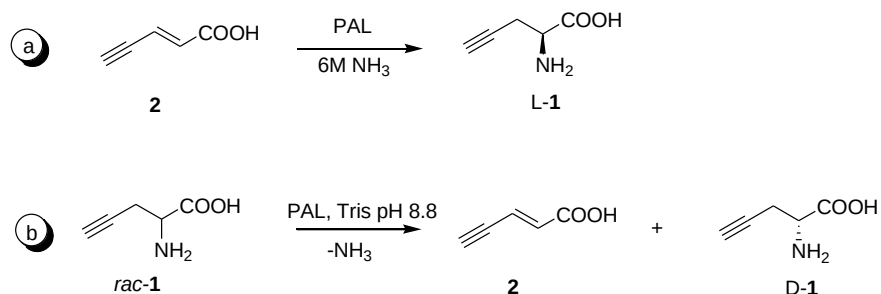


Figura 7. a) reacția de adiție a amoniacului la substratul de tip acrilic **2** și b) reacția de eliminare a amoniacului din *rac-1* catalizată de PcPAL

Prin măsurarea spectrului UV-VIS a compușilor **1,2** a fost selectată lungimea de undă 242 nm pentru urmărirea în timp a producerii sau transformării acrilatului **2** în reacția de eliminare, respectiv de adiție a amoniacului catalizată de PAL. La această lungime de undă acrilatul **2** are un maxim de absorbție, iar aminoacidul racemic **1** are o absorbanță minimă, neglijabilă față de absorbanta acidului acrilic **2**.

Pentru a determina enantioselectivitatea proceselor enzimactice și excesul enantiomeric a aminoacizilor D- și L, obținute din reacția de eliminare, respectiv adiție, a fost dezvoltat o metodă de separare cromatografică chirală a enantiomerilor aminoacidului racemic *rac-1* (Fig. 8). Condițiile optime dezvoltate pe instrumentul de HPLC sunt: coloana chirală Chiralpak ZwiX+, eluent: 50 mM DEA și 6% CH₃COOH în MeOH/ MeCN/H₂O, 49/49/2 (v/v), detecție prin ELSD:

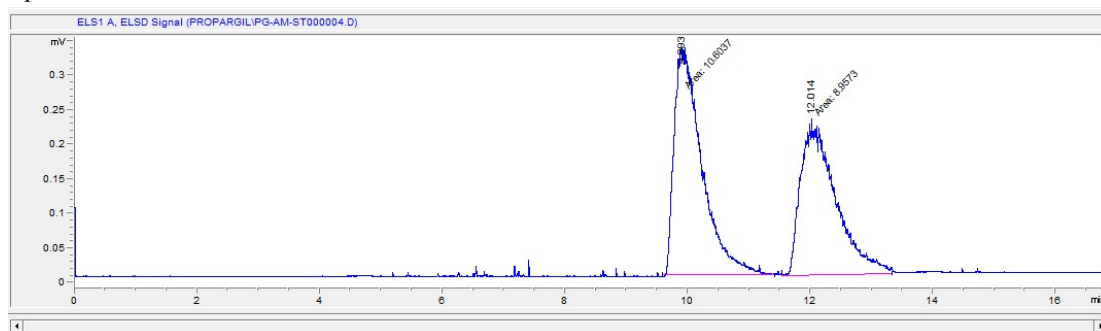


Figura 8. Cromatograma propargilglicinei racemice *rac-1*.

Reacția de eliminare a amoniacului (Figura 7b) a fost optimizată la scară analitică la diferite concentrații ale substratului (10-100 mM), respectiv enzimă (1-10 mg/mL). A fost folosită atât enzima nativă, cât și enzima imobilizată pe nanoparticulele magnetice funcționalizate cu grupări epoxi, imobilizate prin reticulare sau legate covalent de nanotuburi de carbon. Reacțiile au fost monitorizate prin metoda UV și HPLC. Condițiile optime determinate au fost apoi folosite pentru reacțiile la scară preparativă: 100 mg de aminoacid racemic **1** a fost dizolvat în 20 ml soluție tampon (40 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 8.8) după care a fost adăugată 3 ml de soluție cu PcPAL (4 mg/ml), iar reacția a fost incubată timp de 80 h la temperatura de 30 °C. În cazul enzimei imobilizate pe nanoparticule magnetice enzima a fost reținută din soluție cu ajutorul unui magnet, în cazul enzimei reticulate și imobilizate covalent prin filtrare, în timp ce pentru îndepărtarea enzimei native prin adsorbție pe cărbune activ urmată de încălzirea și filtrare. Din soluția obținută acrilatul **2** produs a fost izolat prin extracție la pH 1 iar D-aminoacidul **1** rezultat a fost purificat pe o coloană de schimbători cationic Amberlyst 15. Excesul enantiomeric al aminoacidului determinat prin metoda chirală de HPLC a fost > 98% (Fig. 9).

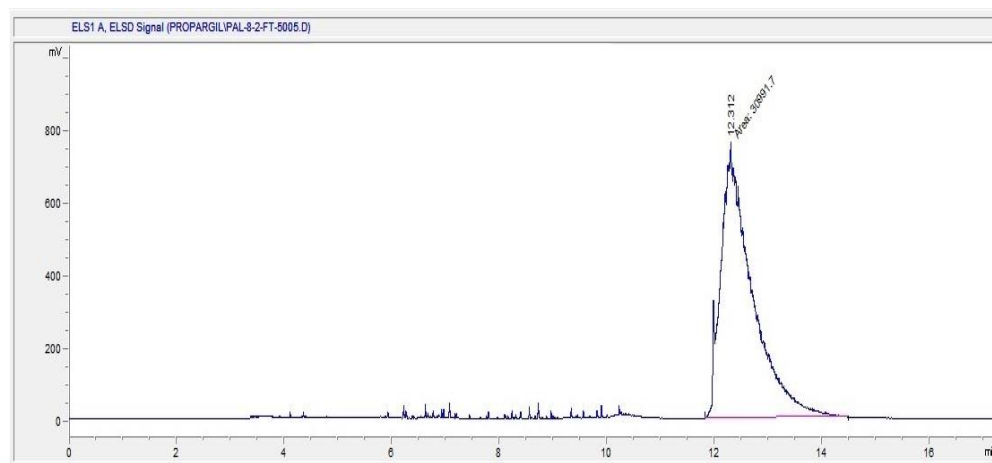


Figura 9. Cromatograma D-propargilglicinei preparată prin reacție de eliminare catalizată de PcPAL

Reacția de adiție a amoniacului (Fig. 7a) a fost optimizată, testând mai multe concentrații de substrat (2.5-20 mM), respectiv enzimă (0.5-10 mg/ml). A fost testată atât enzima nativă cât și enzimele imobilizate. Condițiile optime pentru reacțiile la scară preparativă au fost: concentrație de substrat 5 mM, și concentrația de enzimă 1 mg/ml. Astfel reacția enzimatică a fost realizată pornind de la 50 de mg de acrilat **1** într-o soluție de 6 M NH_3 , conversia fiind unul de 90%. L-aminoacidul **1** a fost purificat asemenea reacției de eliminare prin coloană de schimbători ionici, obținându-se cu un randament de 68%. Enantiopuritatea produsului a fost determinată prin cromatografia chirală ca fiind unul de 99% (Fig. 10).

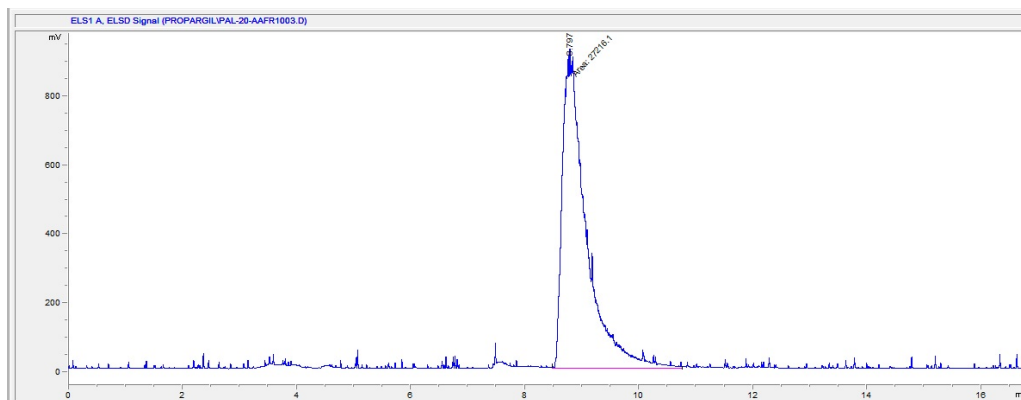


Figura 10. Cromatograma L-propargilglicinei preparată din reacția de adiție a amoniacului catalizată de PcPAL

Astfel a fost realizată sinteza chemoenzimatică a L- și D- propargilglicinei prin intermediul amoniac lazei PcPAL atât în forma nativă cât și sub formă imobilizată. Acest rezultat este deosebit datorită faptului că până în momentul de față domeniul de specificitate a enzimei PcPAL consta din substraturi aromatice și heteroaromatice, propargilglicină, respectiv acrilatul corespunzător fiind primul compus nearomatic acceptat ca și substrat de către enzimă.

3. Imobilizarea enzimei PcPAL

a. pe nanoparticule funcționalizate

Nanoparticulele magnetice MagneCat-GP14 funcționalizate cu grupări epoxi (108 mg) au fost suspendate în soluție tampon Tris (3 ml, 0.1 M, pH 8.8), urmată de ultrasonare (35 kHz, 20 min) pentru obținerea unei suspensii stabile. O soluție de PcPAL (4 ml, 3mg/ml în soluție Tris 0.1 M, pH 8.8) a fost adăugată suspensiei de nanoparticule magnetice și amestecul a fost agitat (450 rpm, temperatura camerei) timp de 24 h. Proteina imobilizată a fost

colectată cu un magnet de N48 neodiniu, supernatantul a fost decantat și particulele magnetice au fost spălate de 3 ori cu soluția tampon Tris și o dată cu etanol. Enzima imobilizată a fost uscată la temperatura camerei timp de 2h. Concentrația în proteină ale supernatanturilor a fost determinată prin metoda Bradford, astfel a fost calculată cantitatea de proteină nelegată de suport. Aceste determinări au arătat ca întreaga cantitate de proteină a fost legată de nanoparticulele magnetice (Fig. 11).

b. Imobilizarea covalentă a PAL pe $\text{SwCNT}_{\text{COOH}}$ prin linker de tip GDE

$\text{SwCNT}_{\text{COOH}}$ (carboxi nanotuburi de carbon cu un singur 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 CH_2Cl_2 . La nanotubul activat s-a adăugat *PcPAL* în soluție tampon TRIS (iv). După imobilizare biocatalizatorul rezultat ($\text{SwCNT}_{\text{COOH}}\text{-PAL}$) 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.

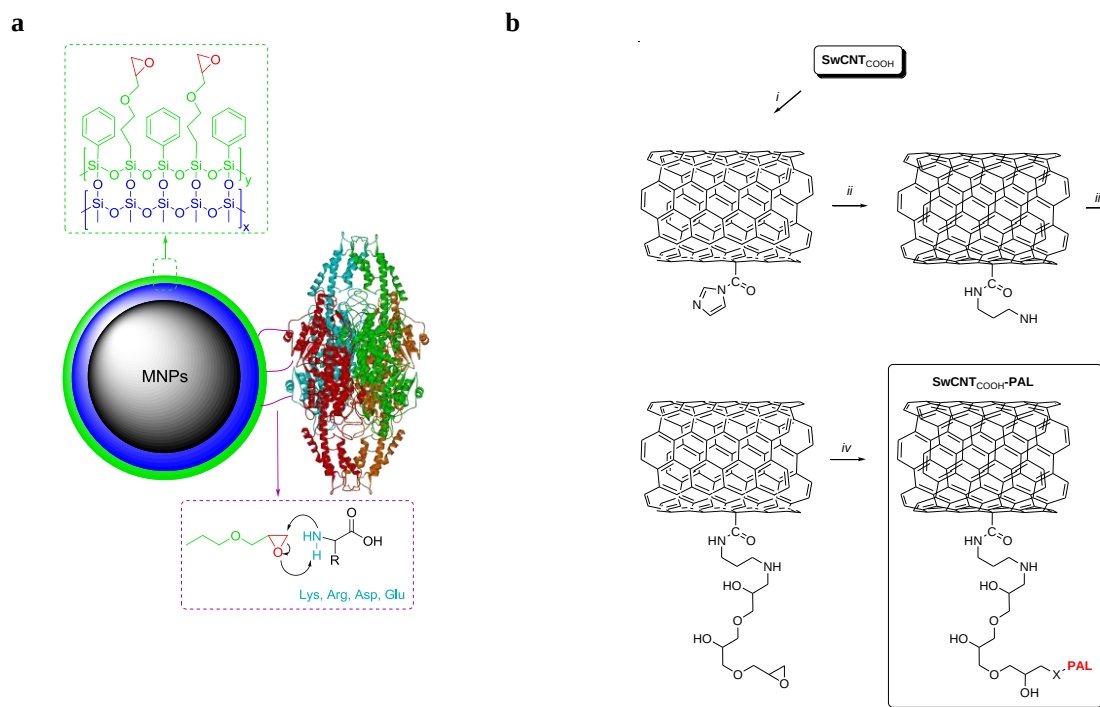


Figura 11. a. Imobilizarea enzimei *PcPAL* pe nanoparticule magnetice funcționalizate cu grupări epoxi. **b.** Imobilizarea *PcPAL* pe $\text{SwCNT}_{\text{COOH}}$ prin linker. Reactanți și solvenți: i) CDI în CH_2Cl_2 ; ii) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ în apă; iii) glicerol diglicidil eter în CH_2Cl_2 ; iv) *PcPAL* în Tris (0.1M, pH 8.8)

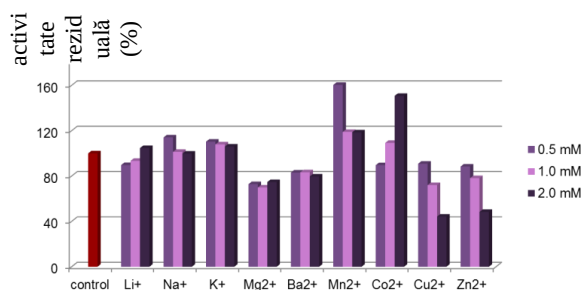
4. Influența unor aditivi asupra activității liazice a enzimei PcPAL

Pentru a stabili dacă prezența unor aditivi poate duce la o creștere a performanțelor enzimei, au fost efectuate mai multe studii experimentale. Efectul unor solvenți organici, precum și a unei serii de ioni metalici mono- și divalenți a fost studiat în cadrul reacției de eliminare a amoniacului din L-fenilalanina cu formare de acid cinamic în prezența enzimei PcPAL.

4.1. Efectul ionilor metalici asupra activității liazice a enzimei PcPAL

Pentru a studia efectul pe care ionii metalici îl au asupra activității enzimice au fost testați următorii ioni metalici: Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , la trei concentrații diferite 0.5 mM, 1.0 mM și respectiv 2.0 mM. Aceștia au fost incubati la 30 °C în prezența substratului natural. După 5 min de incubare a fost adăugată enzima, iar transformarea L-fenilalaninei în acid cinamic a fost monitorizată cu ajutorul spectrofotometrului la 290 nm timp de 5 min.

ion metalic	activitate reziduală (%) (10 mM L-Phe)		
	0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM
Li^+	91.7	91.5	91.2
Na^+	114.1	101.3	99.8
K^+	110.3	107.9	106.0
Mg^{2+}	72.8	69.9	74.7
Ba^{2+}	83.1	83.3	79.6
Mn^{2+}	160.4	118.9	118.5
Co^{2+}	89.6	109.2	150.7
Cu^{2+}	90.9	72.0	44.2
Zn^{2+}	88.4	78.1	48.3



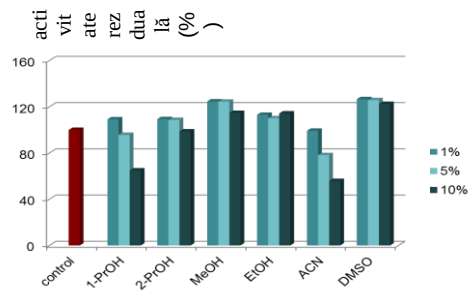
Efectul **ionilor metalici** asupra activității liazice a enzimei PcPAL

Valorile obținute în cadrul experimentului indică faptul că atât Mn^{2+} cât și Co^{2+} îmbunătățesc considerabil activitatea liazică a enzimei, în timp ce metale precum Na^+ , K^+ duc la scăderea activității.

4.2. Efectul solvenților organici asupra activității liazice a enzimei PcPAL

Solvenții organici: propanol (1-PrOH), izopropanol (2-PrOH), metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetonitril (ACN) și dimetilsulfoxid (DMSO) au fost testați la concentrații diferite (1%, 5% și respectiv 10%) cu scopul de a determina stabilitatea enzimei în prezența lor.

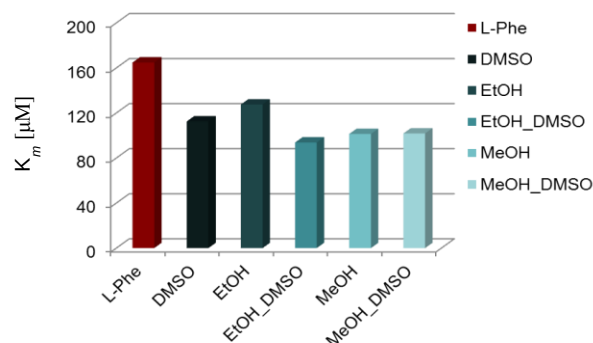
solvent organic	activitate reziduală (%) (10 mM L-Phe)		
	1%	5%	10%
1-PrOH	109.2	95.7	64.9
2-PrOH	109.4	108.6	98.7
MeOH	124.7	124.5	114.7
EtOH	113.1	110.1	114.3
ACN	99.3	78.2	55.8
DMSO	126.6	125.8	122.5



Efectul **solvenților organici** asupra activității liazice a enzimei PcPAL

În prezența solvenților organici polari: etanol, metanol și dimetilsulfoxid *PcPAL* prezintă stabilitate și activitate crescută. În urma incubării substratului atât în prezența cât și în absența solvenților organici, la 30 °C timp de 5 min, reacția a fost inițiată prin adăugarea enzimei. Formarea acrilatului a fost monitorizată continuu cu ajutorul spectrofotometrului la 290 nm timp de 5 min. Rezultatele obținute în urma determinării parametrilor cinetici sunt prezentate în tabelul de mai jos.

solvent organic (1%)	K_m [μ M]	V_{max} [μ M/s]
L-Phe	164.83	2.50E-01
DMSO	112.50	2.50E-01
EtOH	127.53	2.50E-01
EtOH_DMSO	93.77	2.50E-01
MeOH	101.38	2.50E-01
MeOH_DMSO	101.82	2.50E-01



4.3. Screening enzimatic

Pentru a investiga efectul MeOH, EtOH, ionul metalic Mn^{2+} , dar și combinația dintre acesta cu cei doi solvenți asupra activității liazice a enzimei *PcPAL* a fost ales ca substrat model acidul 2-amino-3-(tiofen-2-il)propanoic racemic.

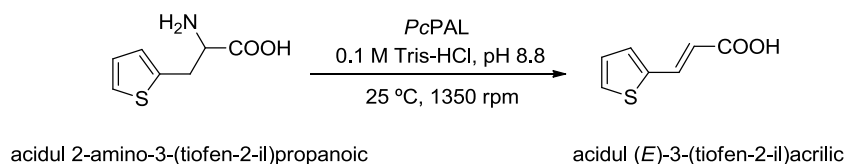


Figura 12. Eliminarea amoniacului din tiofenilalanină catalizată de *PcPAL*

reacții	substrat	Mn	MeOH	EtOH
	5 mM	0.5 mM	10%	10%
1	✓	—	—	—
2	✓	✓	—	—
3	✓	—	✓	—
4	✓	—	—	✓
5	✓	✓	✓	—
6	✓	✓	—	✓

Monitorizarea reacțiilor a avut loc cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) folosind coloana chirală Chiralpak ZWIX (+) pentru a separa enantiomerii și pentru a calcula conversia la diferite intervale de timp.

timp (ore)	conversia (%)					
	1	2	3	4	5	6
2	28	29	27	28	27	26
3	32	30	31	30	32	31
7	33	39	40	38	37	38
24	35	43	50	47	47	46

În urma screening-ului efectuat și a analizei cromatogramelor obținute la HPLC cea mai ridicată reactivitate ($c = 50\%$) s-a obținut după 24 de ore în reacția de eliminare a amoniacului din acidul 2-amino-3-(tiofen-2-il)propanoic în prezență de 10% MeOH.

OBIECTIVEUL 2: BIOTRANSFORMAREA SUBSTRATURILOR CU PAL SI PAM NATURALE SI MUTANTE

iotransformarea substraturilor cu PAL și PAM naturale și 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.13**). 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).

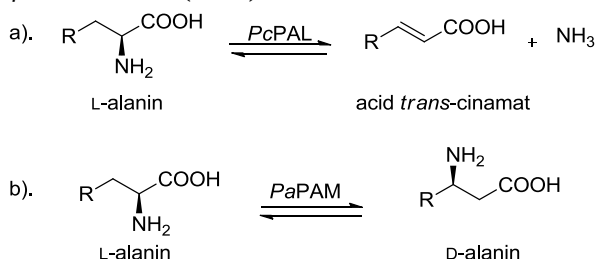


Fig.13. Reacții catalizate de PAL (a.) și PAM (b.).

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.14**).

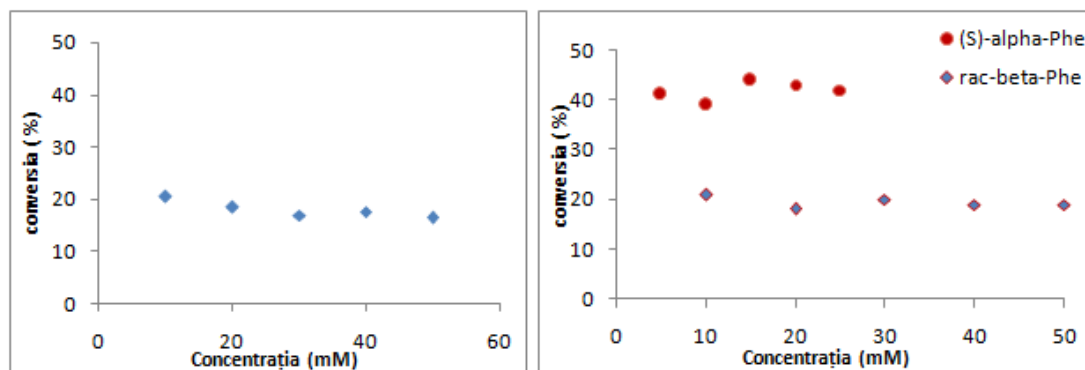


Fig.14. a) Efectul concentrației de substrat asupra conversiei. b) Efectul concentrației de acid cinamic asupra conversiei

Rezultatele obținute au scos în evidență faptul că nici concentrația substratului, nici prezența acidului 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.15.b**).

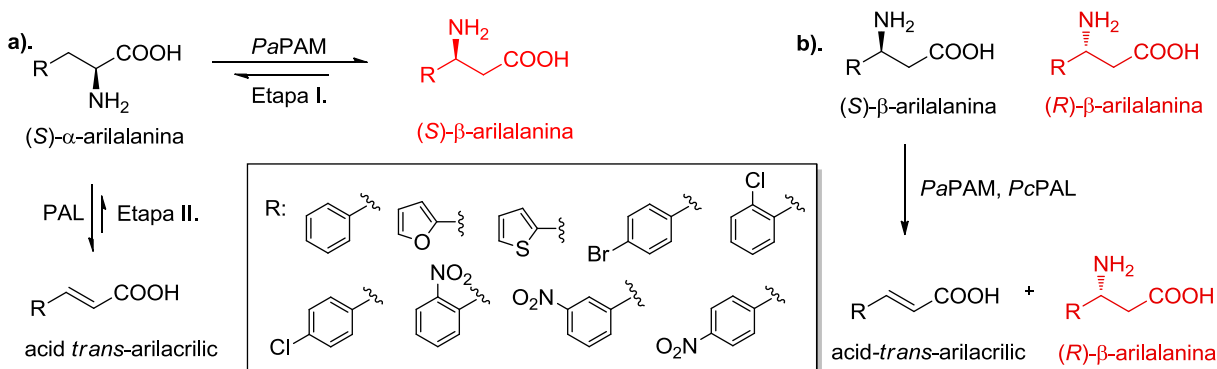


Fig.15. Sinteza de (S)- β -arilalanina (a.) și sinteza de (R)- β -arilalanina (b.)

(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.16.**).

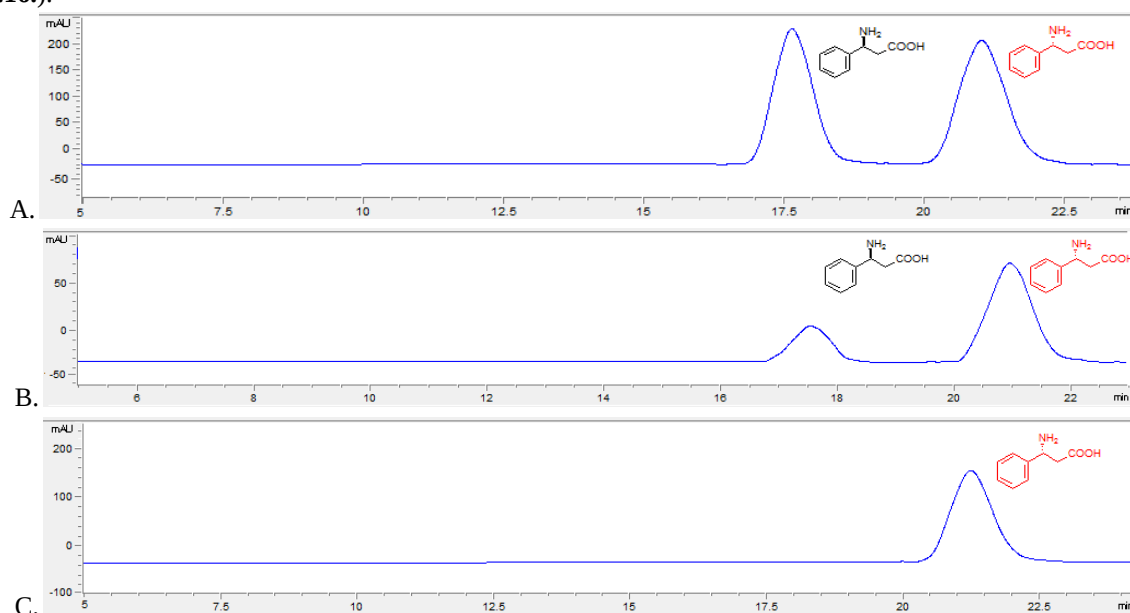


Fig.16. *Rac*- β -fenilalanina transformată de PaPAM. A.după 2h, B.după 24h, C.după 48h

În vederea extinderii metodei la alanine nenaturale, am considerat necesară în prealabil analizarea reacțiilor catalizate de PaPAM (**Fig.17.**). 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.

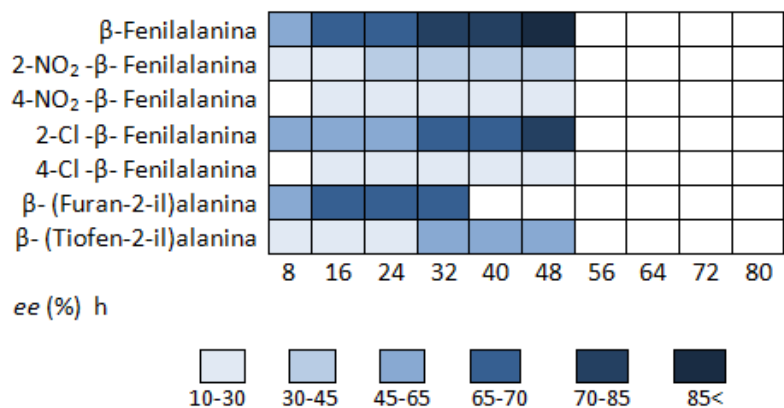


Fig.17. *Rac*- β -arilalanine transformate de *PaPAM*

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 1.**).

Tabel 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.15.**). 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.18.**), 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.

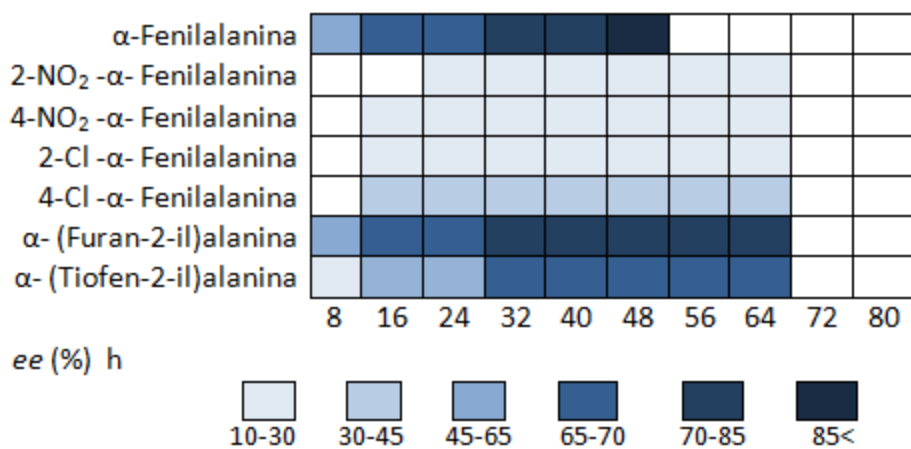


Fig.18. *Rac*- α -arilalanine transformate de PaPAM

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.19.**).

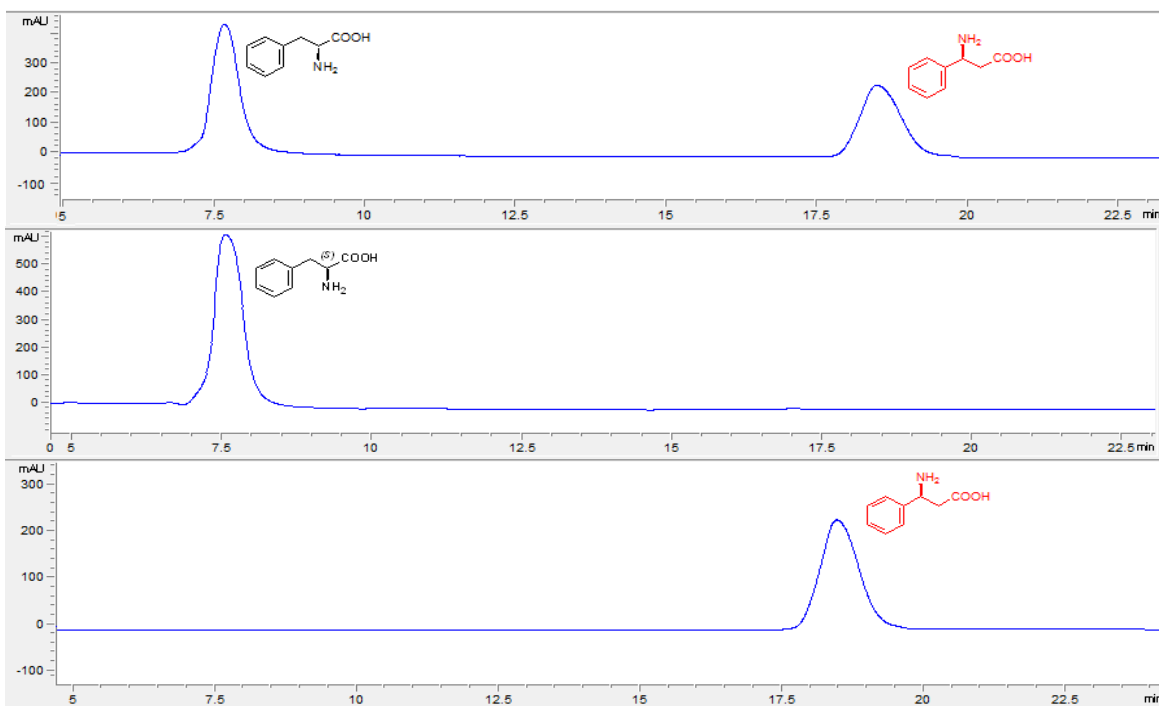


Fig.19. (S)- α -fenilalanina transformată de PaPAM. A.după 2h, B.după 24h, C.după 48h