



Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Școala Doctorală de Chimie
Centrul de Cercetare Enzimologie și Biocataliză Aplicată

TEZĂ DE DOCTORAT

STRATEGII DE INGINERIE PROTEICĂ ȘI DE IMOBILIZARE PENTRU SINTEZA BIOCATALITICĂ EFICIENTĂ A D-FENILALANINELOR

Candidat: **Krisztina (Boros) Kelemen**

Coordonator științific: **Prof. Habil Dr. Monica-Ioana Toșa**

Cluj-Napoca

2025



Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Chimie şi Inginerie Chimică
Şcoala Doctorală de Chimie
Centrul de Cercetare Enzimologie şi Biocataliză Aplicată

STRATEGII DE INGINERIE PROTEICĂ ŞI DE IMOBILIZARE PENTRU SINTEZA BIOCATALITICĂ EFICIENTĂ A D-FENILALANINELOR

Candidat: Krisztina (Boros) Kelemen

Coordonator ştiinţific: Prof. Habil Dr. Monica-Ioana Toşa – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, România

Preşedinte: Prof. Habil Dr. Csaba Paizs – Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania

Referenţi:

Asst. Prof. Dr. Fabio Parmeggiani – Universitatea Politehnică Milano, Milano, Italia

Prof. Dr. Francisc Péter – Universitatea Politehnică Timişoara, Timişoara, România

Prof. Dr. László Poppe – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, România şi
Universitatea de Tehnologie şi Economie, Budapesta, Ungaria

TABLE OF CONTENTS

Acknowledgments	6
List of publications.....	7
Abstract.....	8
Rezumat	11
Chapter 1 – Introduction	14
1.1 Small molecules – Amino acids	14
1.2 D-Amino acids	15
1.2.1 Functions of D-amino acids	16
1.2.2 Applications of D-amino acids	18
1.3 D-Phenylalanine and its derivatives.....	18
1.4 Aims and objectives of the thesis	20
Chapter 2 – Biocatalytic approaches for the production of D-phenylalanines.....	21
2.1 Phenylalanine ammonia-lyase-catalyzed hydroaminations.....	23
2.2 D-Selective amino acid dehydrogenase-catalyzed reductive amination	25
2.3 Multi- and chemoenzymatic cascades yielding D-phenylalanines	29
2.3.1 Enzyme cascades involving engineered DAADHs.....	32
2.3.2 Enzyme cascades involving engineered DAATs	33
2.3.3 Enzyme cascades combining DAADHs and DAATs	34
2.3.4 Enzyme cascades involving PALs	36
2.3.5 Comparison of chemoenzymatic cascades – case study	37
2.4 Conclusions and perspectives	39
Chapter 3 – Novel structural insight on phenylalanine ammonia-lyases	41
3.1 Contextual background and aims of the study.....	41
3.1.1 Mechanistic basis of reduced enantioselectivity	42
3.2 Results and discussion	44
3.2.1 Analysis of the structural data on AALs	46
3.2.2 Crystallization of PcPAL variants with D-phenylalanines.....	51
3.2.3 Inhibitor screening to stabilize catalytically relevant loops in PcPAL	53
3.2.4 Novel PcPAL structure co-crystallized with N-phenylglycine	58
3.3 Conclusions	60

Chapter 4 – Immobilization of D-amino acid dehydrogenase for the production of D-phenylalanines	61
4.1 Contextual background and aims of the study.....	61
4.2 Results and discussion	65
4.2.1 Selection of the optimal support for immobilization	65
4.2.2 Fine-tuning the immobilization on Purolite® ECR8415F	69
4.2.3 Refinement of DAADH and GDH co-immobilization on PEI-coated agarose beads.....	72
4.2.4. Specific activities of the best-performing immobilized preparations	75
4.2.5. Preparative-scale reductive amination using immobilized <i>Ut</i> DAADH	76
4.3. Conclusions	76
Chapter 5 – Site-specifically immobilized biocatalysts for the synthesis of D-phenylalanines	78
5.1 Contextual background and aims of the study.....	78
5.2 Results and discussion	81
5.2.1 Site-specific immobilization in case of <i>Pc</i> PAL	81
5.2.2 Site-specific immobilization of <i>Ut</i> DAADH.....	85
5.2.3 Conclusions	93
Chapter 6 – General conclusions	95
Chapter 7 – Materials, instrumentation and methods	98
7.1 Materials	98
7.2 Instrumentation.....	98
7.3 Methods	99
7.3.1 Experimental part for Chapter 3.....	99
7.3.2 Experimental part for Chapter 4.....	102
7.3.3 Experimental part for Chapter 5.....	112
References	120
Appendix	139
Amino acid and nucleotide sequences.....	139
Molecular cloning.....	140
Protein expression and purification	141
Thermal denaturing profiles of the purified enzymes	141

Specific activity measurements	143
Enzyme kinetics.....	144
Inhibition kinetics.....	144
Biotransformation with isolated enzymes	147
Enzyme immobilization.....	148
Enzyme leakage from immobilized preparations.....	148
Substrate/product adsorption issues	149
Representative HPLC chromatograms	150
NMR spectra of the purified D-Phe product	155

Dintre moleculele mici biologic active, D-aminoacizii aromatici atrag o atenție tot mai mare ca elemente chirale esențiale pentru diverse produse farmaceutice și substanțe chimice fine.¹ D-Fenilalanina a fost investigată pentru potențialul său terapeutic în gestionarea durerii și în tratamentul bolii Parkinson;² derivații săi au fost utilizați în terapia diabetului zaharat de tip 2³ și constituie precursori importanți pentru antibiotice și spermicide,^{3,4} inhibitori ai Pin1,⁵ inhibitori ciclici ai plasminelor,⁶ agenți terapeutici de anti-obeizitate,⁷ inhibitori ai SETD7 lizină metiltransferazei,⁸ precum și ai neurotoxinei botulinice,⁹ ai proteinei KIFC1.¹⁰ și inhibitori ai agregării peptidelor amiloid- β (A β)¹¹ (**Figura 1**).

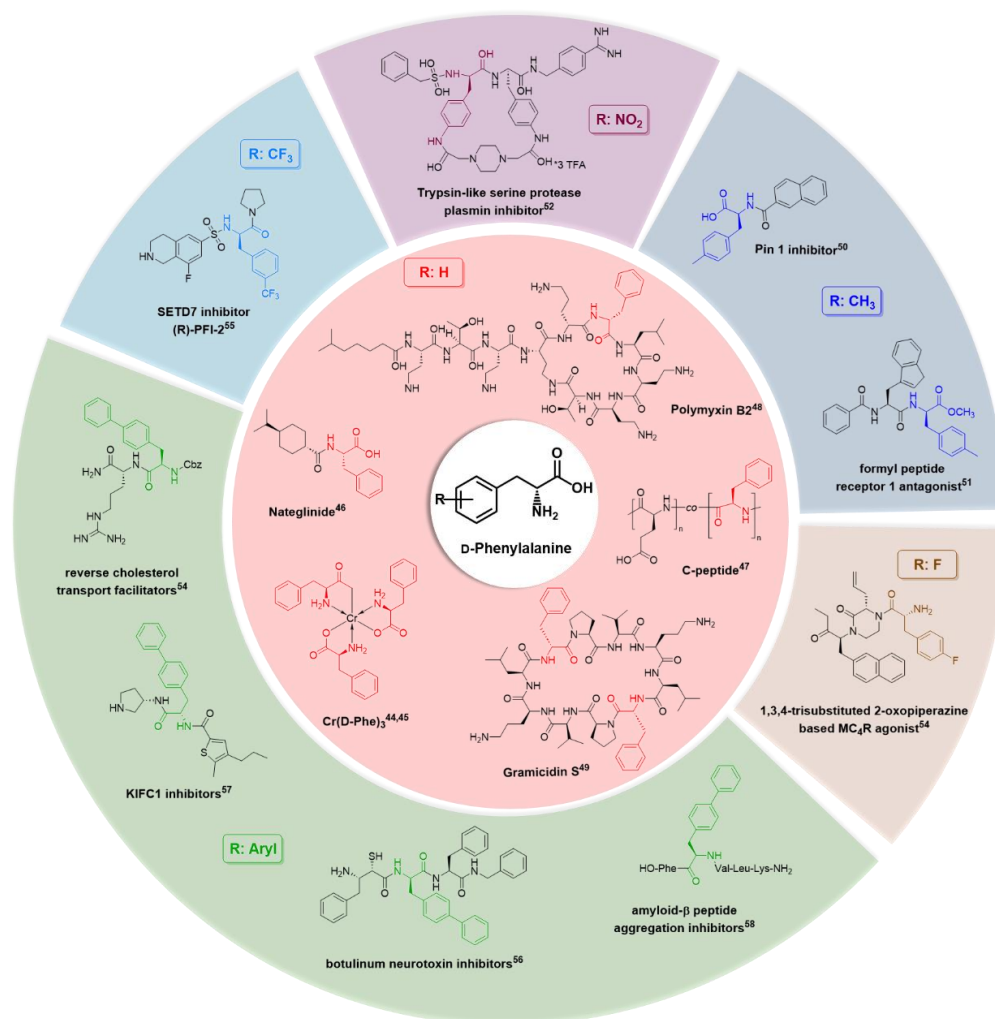


Figura 1. D-Fenilalanina și derivații săi ca substanțe farmaceutice active.

Teza oferă o analiză comparativă exhaustivă a procedurilor biosintetice și a cascadelor (chemo)enzimatice implicate în sinteza asimetrică a D-fenilalaninelor, cu un accent special pe eforturile de inginerie proteică ce au condus la biocatalizatori eficienți. Procedurile biocatalitice pentru obținerea D-aminoacizilor includ conversia D-hidantoinei prin acțiunea cuplată a D-hidantoinazei și D-carbamoilazei,^{12,13} hidroliza N-acil-D-aminoacizilor mediată de

N-acil-D-aminoacid amidohidrolaze,¹² rezoluția cinetică a amestecurilor racemice utilizând L-aminoacid oxidaze (sau deaminaze), precum și proceduri asimetrice, cum sunt aminrea reductivă a α -cetoacizilor catalizată de D-aminoacid dehidrogenaze sau de aminoacid aminotransferaze,¹ și aditia de amoniac la acizii cinamici catalizată de fenilalanină amoniac-liaze^{14,15} (**Figura 2**). În plus, sistemele chemoenzimatice și cascadele multi-enzimatice au apărut ca strategii importante pentru sinteza enantiopură a mai multor molecule de importanță ridicată, precum D-aminoacizii.¹

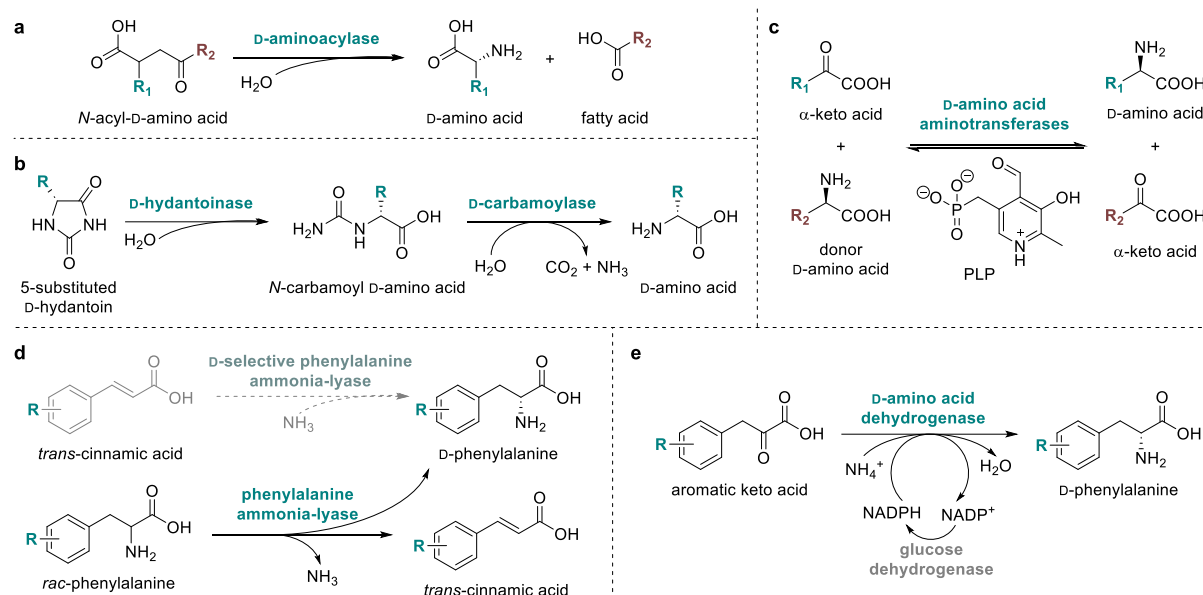


Figura 2. Procedurile biocatalitice utilizate pentru producerea D-aminoacizilor includ: **a)** hidroliza *N*-acil-D-aminoacizilor catalizată de D-aminoacilaze, **b)** transformarea hidantoinelor substituite în poziția 5 racemice prin acțiunea cuplată a D-hidantoinazei și *N*-carbamoyl-D-amino acid amidohidrolazei (D-carbamoylază), **c)** transferul grupării amino catalizat de D-aminoacid aminotransferaze dependente de PLP, **d)** hidroaminarea acidului *trans*-cinamic sau deaminarea stereoselectivă a *rac*-fenilalaninei catalizată de fenilalanină amoniac-liaze și **e)** aminarea reductivă asimetrică a cetoacizilor aromatici catalizată de D-aminoacid dehidrogenaze.

După concluziile noastre, procedurile mediate de D-aminoacid dehidrogenaza (DAADH) sau de fenilalanină amoniac-liaza (PAL) se dovedesc a fi cele mai promițătoare în ceea ce privește aplicabilitatea lor industrială. În consecință, în capitolele următoare atenția a fost orientată către optimizarea proceselor existente bazate pe aceste enzime.

CAPITOLUL 3

În cazul PAL-urilor, o strategie deosebit de atractivă constă în inversarea stereoselectivității enzimei în reacția de hidroaminare, importantă din punct de vedere sintetic,¹ permițând conversia derivaților de acid cinamic în D-fenilalanine. Pentru realizarea inversării stereoselectivității, s-a urmărit o abordare bazată pe proiectare rațională. Analiza detaliată a datelor structurale existente privind amoniac-liazele aromatice a sugerat absența unor structuri complete de PcPAL în condiții de reacție de hidroaminare, în complex cu un analog al acidului *trans*-cinamic. Având la dispoziție mutanți PcPAL și AtPAL despre care s-a raportat anterior că prezintă un exces enantiomeric redus în transformarea analogilor de acid *trans*-cinamic cu substituenți puternic electronatrăgători, s-a încercat cristalizarea variantelor PcPAL-F137V și PcPAL-I460V, respectiv AtPAL-F136V și AtPAL-I461V. În experimentele noastre, mutantul

PcPAL I460V, co-cristalizat cu D-*m*-CF₃-fenilalanină, a rezultat o structură cu ligandul (derivatul de acid cinamic corespunzător) legat în situsul catalitic într-o orientare neobservată anterior (**Figura 3**), oferind informații valoroase pentru studii ulterioare de proiectare rațională.

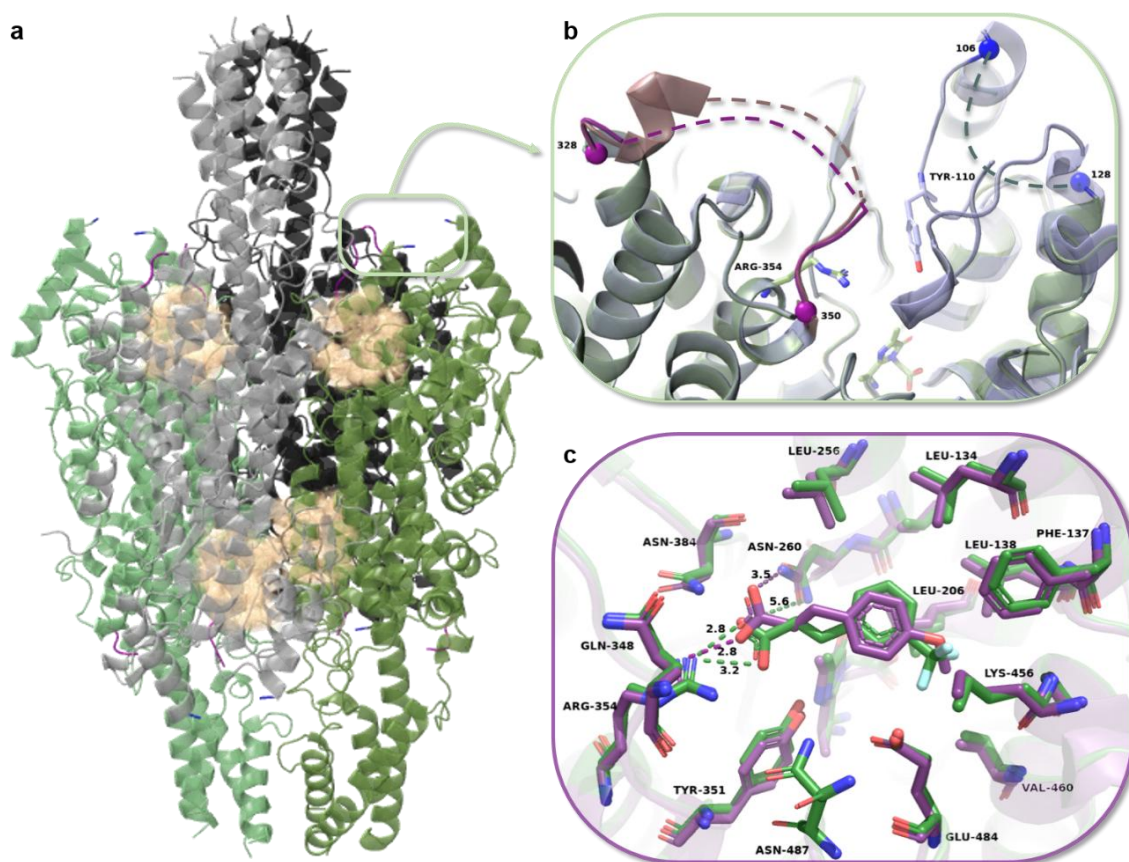


Figura 3. Noua structură *PcPAL* complexat cu acid *m*-CF₃-cinamic: **a)** structura globală homotetramerică, cu cele patru subunități colorate în verde deschis/închis și gri/negru, iar cele patru situsuri catalitice din fiecare lanț evidențiate în culoare nisip; **b)** suprapunerea noii structuri cu structura 6HQP¹⁶ (albastru deschis), evidențiind prezența sau absența (linii întrerupte) a buclei de tirozină (gri pentru noua structură, albastru deschis pentru 6HQP) și a buclei asociate cu arginine 354 (violet intens pentru noua structură și roz deschis pentru 6HQP); **c)** suprapunerea situsului catalitic al noii structuri cu structura *PcPAL* determinată anterior, co-cristalizată cu acid *p*-metoxicinamic (PDB ID: 6RGS¹⁷; violet închis).

Totuși, structura cristalină obținută nu conține cele două bucle (loop-uri) semnificative din punct de vedere funcțional. Prin urmare, s-a concentrat mai departe pe obținerea unei structuri complete de PAL în complex cu un derivat de acid cinamic. În cadrul testării derivaților ai acidului cinamic ca potențiali inhibitori de PAL, s-a identificat *N*-fenilglicina (NPG) drept inhibitor puternic al enzimei *PcPAL*. Utilizarea de NPG ca ligand în experimentele de co-cristalizare a permis obținerea unei structuri cristaline complete de *PcPAL*, în care ambele bucle catalitice esențiale, bucla care conține tirozina din poziția 110 și bucla asociată cu arginina din poziția 354, au fost rezolvate complet în conformații închise, catalitic active (**Figura 4**). Structurile noi obținute constituie un punct de plecare solid pentru studii viitoare de proiectare rațională vizând inversarea stereoselectivității a PAL-urilor.

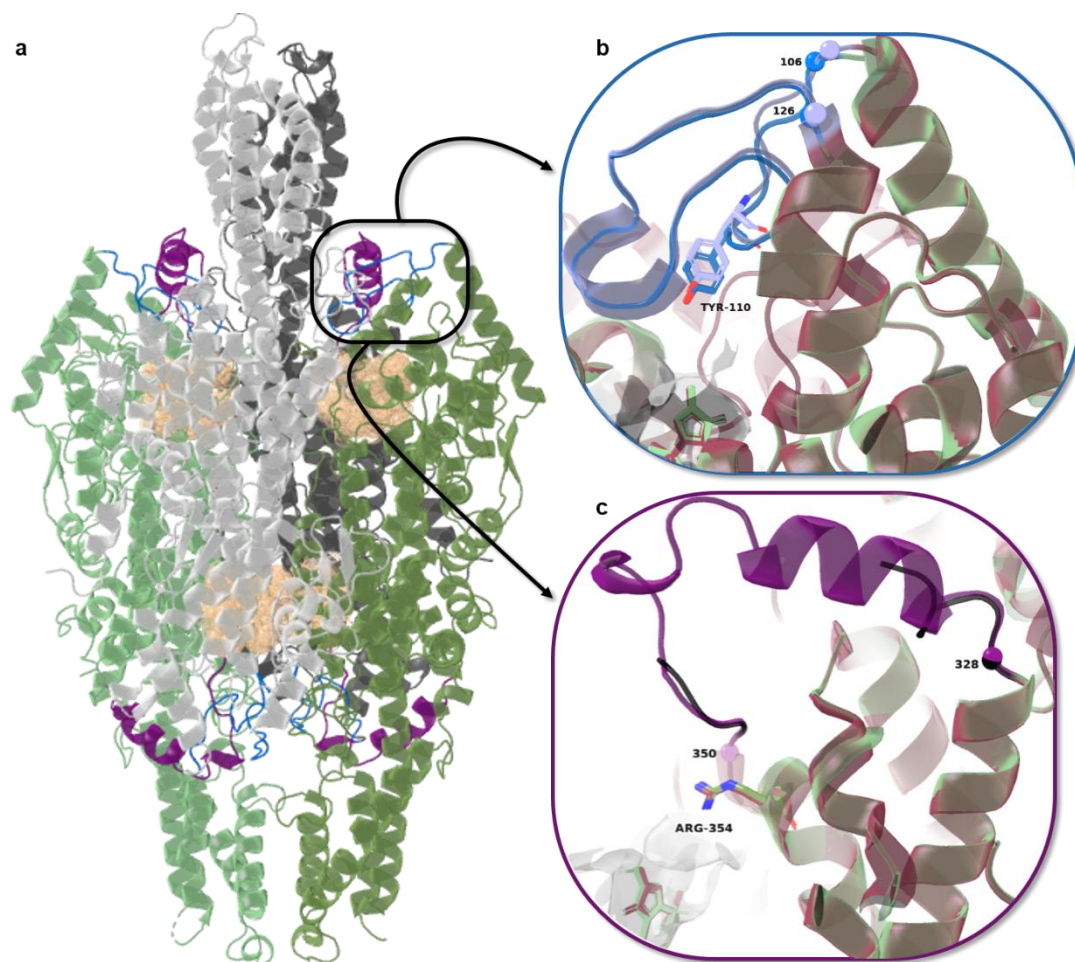


Figura 4. Noua structură a proteinei PcPAL cu ambele bucle catalitice esențiale în conformația închisă, catalitic competentă. **a)** Structura globală a enzimei PcPAL în forma sa homotetramerică, cu cele patru subunități colorate în verde deschis/închis și gri/negru, iar cele patru situsuri catalitice din fiecare lanț evidențiate în culoare nisip. Suprapunerea noii structuri cu structura 6F6T¹⁶ complexată cu acidul (S)-(1-amino-2-fenilalil)fosfonic (roșu), evidențiind diferențele în **b)** bucla conținând tirozina și poziționarea restului de tirozină 110 (albastru pentru noua structură și albastru deschis pentru 6F6T); și diferențele în **c)** cazul buclei asociate cu arginine 354 (violet intens pentru noua structură și negru pentru 6F6T).

CAPITOLUL 4

Deoarece inversarea enantioselectivității PAL-urilor încă reprezintă o sarcină dificilă/provocare, depășind intervalul de timp al tezei, între timp ne-am concentrat asupra optimizării celei de-a doua căi biocatalitice promițătoare pentru sinteza D-fenilalaninelor, aminarea reductivă a cetoacizilor catalizată de D-aminoacid dehidrogenaza (DAADH). Deși rezultatele de inginerie proteică în cazul DAADH-urilor sunt bine documentate, imobilizarea lor – indispensabilă pentru aplicabilitatea lor industrială – a fost mai puțin explorată. Așadar, în cadrul acestei teze, s-au testat mai multe metode de imobilizare a DAADH-ului derivat din *Ureibacillus thermosphaericus* (UtDAADH) (**Figura 5**). Pe baza conversiilor de reacție obținute în cadrul aminării reductive a fenilpiruvatului, precum și considerând reciclabilitatea preparatelor, reproductibilitatea eficienței între loturi și costurile de imobilizare, DAADH imobilizat covalent pe rășină Purolite® ECR8415F sau co-imobilizat împreună cu GDH pe agaroză învelită cu polietilenimină au fost selectate pentru optimizări suplimentare.

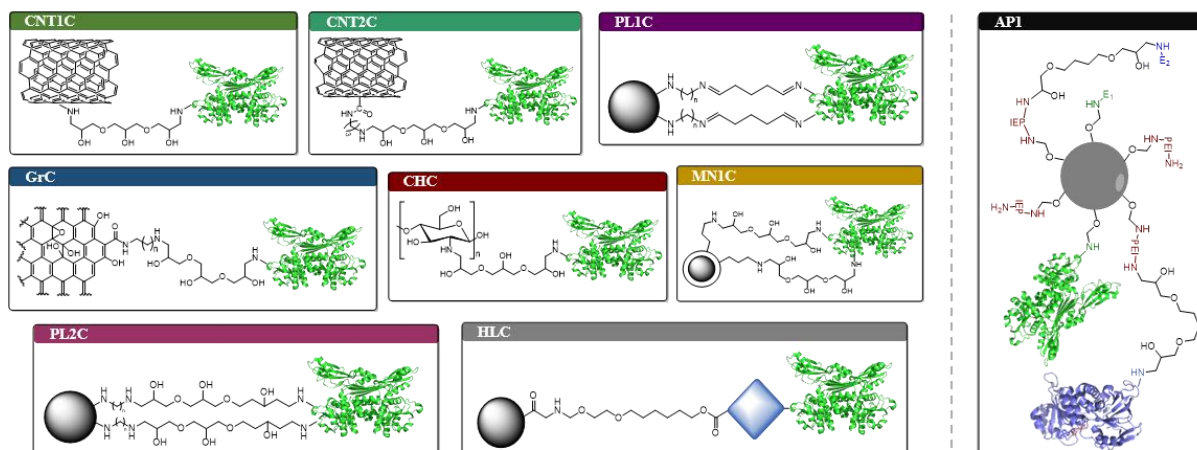


Figura 5. DAADH imobilizat covalent pe nanotuburi de carbon funcționalizați cu grupări amino (SWCNTs) (CNT1C), pe SWCNTs funcționalizate cu grupări carboxil (CNT2C), pe oxid de grafenă redusă (GrC), pe nanoparticule magnetice (MN1C), pe chitozan (CHC), pe rășină metacrilică Purolite® ECR8415F prin linker-ul de glutaraldehidă (PL1C), pe rășină Purolite® ECR8415F prin linker-ul glicerol-diglicidil eter (PL2C), prin proteina de fuziune HaloTag® (romb albastru) (HLC), și co-imobilizată împreună cu GDH pe bile de agaroză acoperite cu polietilenimină (API). Structurile monomerice ale *Ut*DAADH (PDB ID: 5GZ6) și *Bs*GDH (PDB ID: 2CDA) sunt reprezentate, în verde și albastru.

Procedura de imobilizare mai ușor de realizat, adsorpția DAADH-ului pe rășina Purolite®, s-a dovedit, de asemenea, aplicabilă. Deși acest preparat a prezentat o scădere semnificativă, de 58,8%, a activității specifice după 10 cicluri de reacție, a furnizat totuși conversii comparabile cu cele ale variantei imobilizate covalent (**Figura 6**). Sistemul DAADH–GDH co-imobilizat nu a prezentat pierderi semnificative de activitate pe parcursul a 10 cicluri de reacție. În acest caz, co-imobilizarea suplimentară a cofactorului NADP⁺ a furnizat un biocatalizator autosuficient, dar numai pe durata de trei cicluri de reacție, după care conversiile au scăzut cu aproximativ 60%, din cauza pierderii cofactorului.

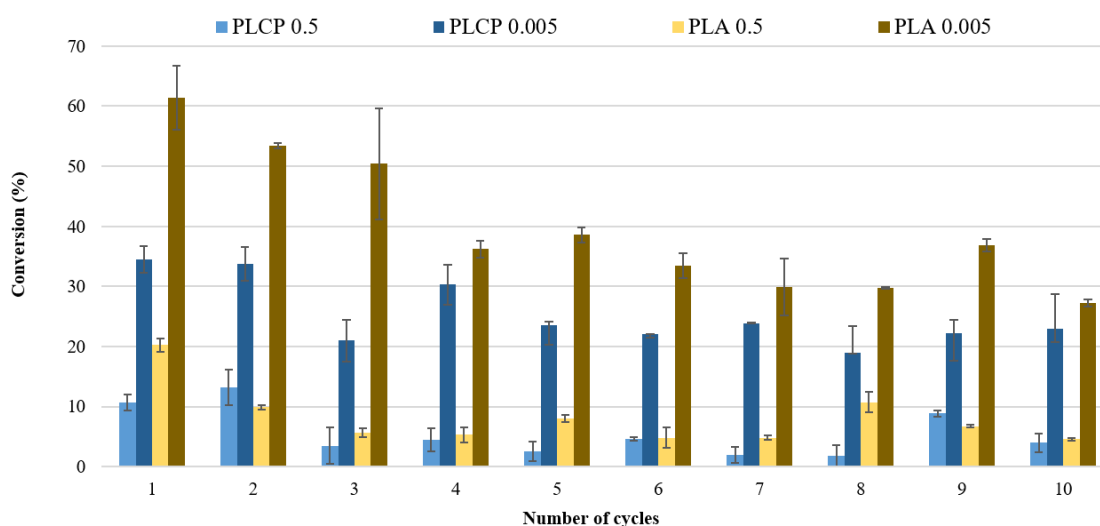


Figura 6. Conversiile obținute după 4 ore de reacție utilizând *Ut*DAADH imobilizat fie prin legare covalentă (PLCP), fie prin adsorbție (PLA), având raporturile enzimă-suport maxime și la cele optime (acestea din urmă determinate pentru preparatul PLCP).

Utilitatea sintetică a DAADH-ului imobilizat a fost demonstrată prin aminarea reductivă a fenilpiruvatului la scară de 100 mg, obținându-se D-fenilalanină cu un randament global de 86%.

Cele mai robuste strategii de imobilizare se bazează pe atașarea covalentă a enzimei pe suporturi solide; totuși, legăturile covalente nespecifice în mai multe poziții pot rigidiza structura flexibilă a biomoleculelor, conducând adesea la pierderi semnificative de activitate în comparație cu enzima liberă.¹⁸⁻²⁰ Astfel, într-un studiu paralel, am investigat efectul imobilizării situs-specifice în cazul biocatalizatorilor bazați pe enzimele PAL și DAADH. Având la dispoziție un biocatalizator PAL robust, imobilizat covalent, am testat și comparat eficiența variantei sale imobilizată situs-specific prin cuplare de tip maleimidă/tiol, folosind de resturile de cisteină expuse la suprafața enzimei. Metoda respectivă de imobilizare a permis modularea activității enzimatică prin selectarea adecvată a situsului de atașare, controlând astfel orientarea enzimei legate de suport. Biocatalizatorii rezultați au fost evaluați în reacția de adiție a amoniacului, o transformare dificilă din punct de vedere sintetic ([Capitolul 5](#)). Au fost optimizate atât condițiile de imobilizare, cât și cele de reacție, iar cel mai performant biocatalizator, SWCNTNH₂-SS-PcPAL, a demonstrat o eficiență catalitică ridicată, furnizând o conversie excelentă (~90% în 10 ore) a acidului *trans*-cinamic în L-fenilalanină și menținând aceste valori de conversie pe parcursul a >7 cicluri de reacție. În plus, variante mutante ale enzimei PcPAL imobilizate situs-specific au fost utilizate cu succes în sinteza a mai multor derivați de L-fenilalanină de valoare sintetică ridicată ([Figura 7](#)).

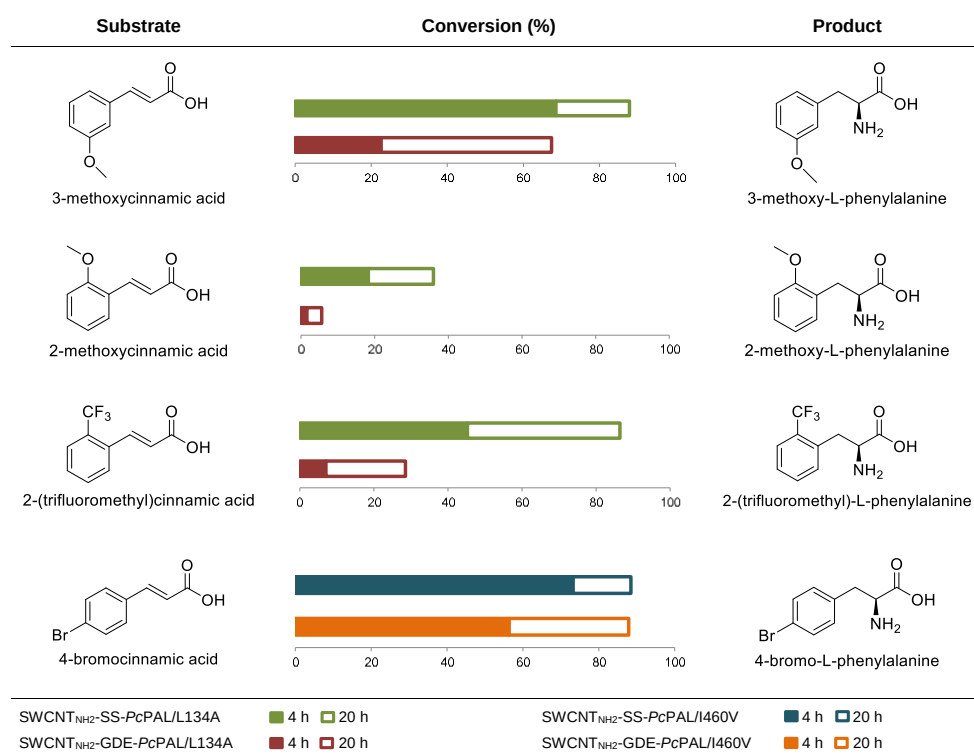


Figura 7. Conversiile reacțiilor de adiție a amoniacului la derivații acidului cinamic, după 4 ore (bare pline) și după 20 de ore de reacție (bare goale), catalizate de variante mutante ale enzimei PcPAL L134A și I460V, imobilizate situs-specific sau nespecific.

Având la dispoziție procedura optimă de imobilizarea covalentă a DAADH-ului și condițiile optime pentru imobilizarea situs-specifică, am implementat imobilizarea situs-specifică și în cazul enzimei *Ut*DAADH ([Capitolul 5](#)). Mutația individuală a serinelor expuse

la suprafața enzimei la cisteine în pozițiile 2, 58, 92, 185, 192 și 317 ale *UtDAADH*-ului a permis imobilizarea situs-specifică a mutantelor pe rășina metacrilică Purolite® ECR8415F funcționalizat cu maleimidă. Cele mai mari activități specifice au fost obținute în cazul preparatelor imobilizate prin cisteina din poziția 2 și prin cisteina din poziția 192, prezentând activități de 2,1-, respectiv 2,2-ori mai mari comparativ cu *UtDAADH* imobilizat covalent, nespecific. Reciclabilitatea preparatelor imobilizate a fost evaluată pe parcursul a 10 cicluri de aminare reductivă. Pe baza conversiilor de reacție și ale activităților specifice reziduale, *UtDAADH* imobilizat prin S2C s-a dovedit a fi cel mai performant biocatalizator, menținând 65–70% din conversia inițială și 50% din activitatea specifică inițială după cel de-al 10-lea ciclu. După determinarea raportului optim între enzimă și substrat, *UtDAADH* imobilizat prin S2C a fost testat în trei reacții consecutive preparative, la scară de 200 mg, furnizând D-fenilalanină în formă enantiopură, cu conversie completă și randamente de izolare excelente, de peste 88% (**Figura 8**).

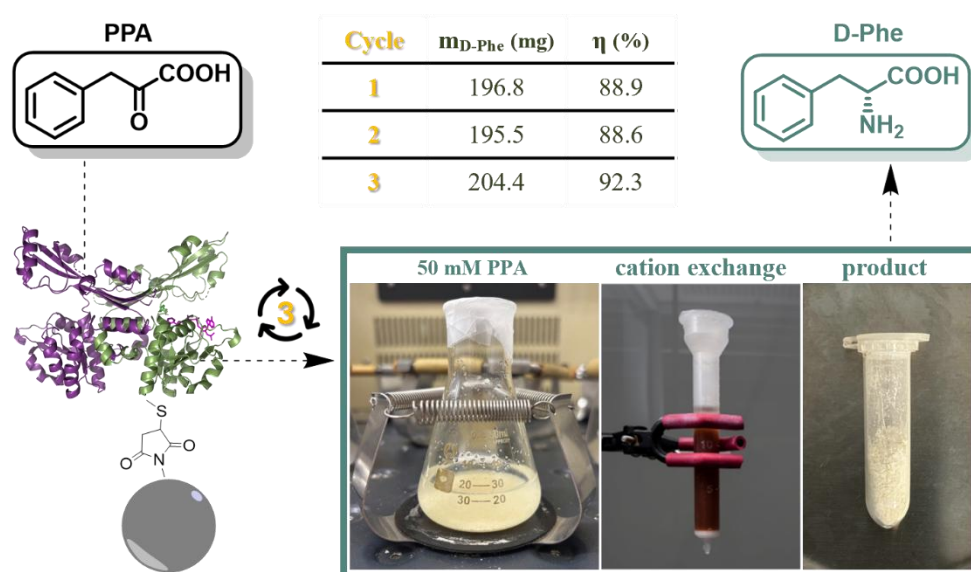


Figura 8. Schema reprezentativă a celor trei cicluri consecutive de aminare reductivă la scară preparativă, utilizând fenilpiruvat (PPA) ca substrat. Reacțiile au fost catalizate de variant S2C a *UtDAADH* imobilizată situs-specific. D-Fenilalanina obținută a fost izolată prin schimb cationic, utilizând rășina AmberChrom™ 50WX2, obținându-se aminoacidul în formă enantiopură cu randamente ridicate (η).

REFERENCES

- (1) Tomoiagă, R. B.; Nagy, L. C.; Boros, K.; Moisă, M. E.; Bencze, L. C. Engineered biocatalysts for the asymmetric synthesis of D-phenylalanines. *ACS Catalysis* **2025**, *15* (9), 7361–7389. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5c00837>.
- (2) Heller, B. D-Phenylalanine Treatment. US4355044A, 1980.
- (3) Martínez-Rodríguez, S.; Martínez-Gómez, A. I.; Rodríguez-Vico, F.; Clemente-Jiménez, J. M.; Las Heras-Vázquez, F. J. Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: an overview. *Chemistry & Biodiversity* **2010**, *7* (6), 1531–1548. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900245>.
- (4) Falciani, C.; Pini, A.; Bracci, L. Peptide Drugs. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; Hughes, A. B., Ed.; Wiley, 2011; pp 247–275. <https://doi.org/10.1002/9783527631827.ch7>.
- (5) Dong, L.; Marakovits, J.; Hou, X.; Guo, C.; Greasley, S.; Dagostino, E.; Ferre, R.; Johnson, M. C.; Kraynov, E.; Thomson, J.; Pathak, V.; Murray, B. W. Structure-based design of novel human Pin1 inhibitors (II). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20* (7), 2210–2214. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.02.033>.

- (6) Saupe, S. M.; Leubner, S.; Betz, M.; Klebe, G.; Steinmetzer, T. Development of new cyclic plasmin inhibitors with excellent potency and selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56 (3), 820–831. <https://doi.org/10.1021/jm3012917>.
- (7) Tian, X.; Switzer, A. G.; Derosé, S. A.; Mishra, R. K.; Solinsky, M. G.; Mumin, R. N.; Ebetino, F. H.; Jayasinghe, L. R.; Webster, M. E.; Colson, A.-O.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Dowty, M. E.; Obringer, C. M.; Cruze, C. A.; Burklow, M. L.; Suchanek, P. M.; Dong, L.; Dirr, M. K.; Sheldon, R. J.; Wos, J. A. Discovery of orally bioavailable 1,3,4-trisubstituted 2-oxopiperazine-based melanocortin-4 receptor agonists as potential antiobesity agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51 (19), 6055–6066. <https://doi.org/10.1021/jm800525p>.
- (8) Lenstra, D. C.; Damen, E.; Leenders, R. G. G.; Blaauw, R. H.; Rutjes, F. P. J. T.; Wegert, A.; Mecinović, J. Structure–activity relationship studies on (R)-PFI-2 analogues as inhibitors of histone lysine methyltransferase SETD7. *ChemMedChem* **2018**, 13 (14), 1405–1413. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800242>.
- (9) Roques, B.; Anne, C.; Turcaud, S.; Fournie-Zaluski, M.-C. Type B botulism toxin inhibitors. WO2002083716A3, 2002.
- (10) Yang, B.; Lamb, M. L.; Zhang, T.; Hennessy, E. J.; Grewal, G.; Sha, L.; Zambrowski, M.; Block, M. H.; Dowling, J. E.; Su, N.; Wu, J.; Deegan, T.; Mikule, K.; Wang, W.; Kaspera, R.; Chuaqui, C.; Chen, H. Discovery of potent KIFC1 inhibitors using a method of integrated high-throughput synthesis and screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57 (23), 9958–9970. <https://doi.org/10.1021/jm501179r>.
- (11) Taniguchi, A.; Sasaki, D.; Shiohara, A.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. Attenuation of the aggregation and neurotoxicity of amyloid- β peptides by catalytic photooxygenation. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53 (5), 1382–1385. <https://doi.org/10.1002/anie.201308001>.
- (12) Wang, F.; Qi, H.; Li, H.; Ma, X.; Gao, X.; Li, C.; Lu, F.; Mao, S.; Qin, H.-M. State-of-the-art strategies and research advances for the biosynthesis of D-Amino Acids. *Critical Reviews in Biotechnology* **2024**, 44 (4), 495–513. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2193861>.
- (13) Gao, X.; Ma, Q.; Zhu, H. Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2015**, 99 (8), 3341–3349. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6507-3>.
- (14) Parmeggiani, F.; Lovelock, S. L.; Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Turner, N. J. Synthesis of D- and L-phenylalanine derivatives by phenylalanine ammonia lyases: a multienzymatic cascade process. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, 54 (15), 4608–4611. <https://doi.org/10.1002/anie.201410670>.
- (15) Zhu, L.; Feng, G.; Ge, F.; Song, P.; Wang, T.; Liu, Y.; Tao, Y.; Zhou, Z. One-pot enzymatic synthesis of D-arylalanines using phenylalanine ammonia lyase and L-amino acid deaminase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2019**, 187 (1), 75–89. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2794-3>.
- (16) Bata, Z.; Molnár, Z.; Madaras, E.; Molnár, B.; Santa-Bell, E.; Varga, A.; Leveles, I.; Qian, R.; Hammerschmidt, F.; Paizs, C.; Vértessy, B. G.; Poppe, L. Substrate tunnel engineering aided by X-ray crystallography and functional dynamics swaps the function of MIO-enzymes. *ACS Catalysis* **2021**, 11 (8), 4538–4549. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c00266>.
- (17) Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Lang, P. A.; Filip, A.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Toşa, M. I.; Schofield, C. J.; Brem, J.; Paizs, C.; Bencze, L. C. Mapping the hydrophobic substrate binding site of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum*. *ACS Catalysis* **2019**, 9 (9), 8825–8834. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b02108>.
- (18) Sheldon, R. A.; Van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, What and How. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>.
- (19) Bolivar, J. M.; Woodley, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chemical Society Reviews* **2022**, 51 (15), 6251–6290. <https://doi.org/10.1039/D2CS00083K>.
- (20) Smith, M. T.; Wu, J. C.; Varner, C. T.; Bundy, B. C. Enhanced protein stability through minimally invasive, direct, covalent, and site-specific immobilization. *Biotechnology Progress* **2013**, 29 (1), 247–254. <https://doi.org/10.1002/btpr.1671>.
- (21) Robescu, M. S.; Bavaro, T. A comprehensive guide to enzyme immobilization: all you need to know. *Molecules* **2025**, 30 (4), 939. <https://doi.org/10.3390/molecules30040939>.