

Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Școala Doctorală de Chimie

Centrul de Cercetare Enzimologie și Biocataliză Aplicată, RO-400028 Cluj-Napoca, strada Arany János nr. 11, România



Rezumatul tezei de doctorat

**Enzime PAL obținute prin inginerie
proteică pentru producția la scară
preparativă a analogilor de
L- și D- fenilalanină**

Doctorand: SOUAD-DIANA TORK

Coordonator științific: Prof. Dr. Eng. FLORIN-DAN IRIMIE

Cluj-Napoca, 2023

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT:
ENZIME PAL OBTINUTE PRIN INGINERIE PROTEICĂ
PENTRU PRODUCȚIA LA SCARĂ PREPARATIVĂ A
ANOLOGILOR DE L- ȘI D- FENILALANINĂ

Doctorand: **SOUAD-DIANA TORK**

Președinte:

Prof. Dr. Ing. Tiberiu FRENȚIU – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Coordonator științific:

Prof. Dr. Ing. Florin-Dan IRIMIE – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Referenți:

Prof. Dr. Bioing. Anca-Irina GALACTION – Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa", Facultatea de Bioinginerie Medicală, Iași

Prof. Dr. Ferencz KILÁR – Institutul de Bioanaliză, Facultatea de Medicină, Universitatea Pécs, Ungaria

Prof. Dr. Ing. Francisc PÉTER – Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria mediului, Universitatea Politehnică, Timișoara

Data susținerii publice: 28 Aprilie, 2023

Locația: Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Cuprins

CUPRINS	3
LISTA DE PUBLICAȚII	5
OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	6
CAPITOLUL I. INTRODUCERE: BIOTRANSFORMĂRI MEDIATE DE PAL	8
I.1 Aminoacizi nenaturali utilizați ca building blocks	8
I.2 Fenilalanin amoniac-liaza (PAL)	8
I.3 Starea actuală a biotransformărilor mediate de PAL la scară preparativă	9
CAPITOLUL II. PRODUCȚIA DE L- ȘI D-FENILALANINE UTILIZÂND FENILALANIN AMONIAAC-LIAZA DIN <i>PETROSELINUM CRISPUM</i>	11
II.1 Background (date din literatură)	11
II.2 Rezultate și Discuții	11
<i>II.2.1 Optimizarea reacțiilor de aminare catalizate de PcPAL</i>	<i>11</i>
II.2.1.1 Efectul mediului de reacție/sursa de amoniac	11
II.2.1.2 Efectul densității celulare	12
II.2.1.3 Efectul concentrației de substrat.....	12
II.2.1.4 Inhibiția de substrat/produs	14
<i>II.2.2 Optimizarea reacțiilor de deaminare mediate de PAL</i>	<i>15</i>
II.2.2.1 Efectul sistemelor de soluții tampon utilizate ca mediu de reacție.....	15
II.2.2.2 Efectul raportului biocatalizator: substrat.....	16
II.2.2.3 Efectul concentrației de substrat.....	16
II.2.2.4 Inhibiția de substrat	18
<i>II.2.3 Reacțiile preparative de adiție și eliminare de amoniac</i>	<i>18</i>
II.2.3.1 Condițiile optime	18
II.2.3.2 Utilizarea PAL în biotransformările la scară preparativă	19
II.3 Concluzii	20
CAPITOLUL III. CĂTRE O ABORDARE GENERALĂ PENTRU ADAPTAREA SITUS-ULUI DE LEGARE HIDROFOB AL FENILALANIN AMONIAAC-LIAZELOR	21
III.1 Background (date din literatură).....	21
III.2 Rezultate și Discuții	21
<i>III.2.1 Generarea de noi enzime PAL mutante</i>	<i>21</i>
<i>III.2.2 Domeniul de substrat – screening</i>	<i>22</i>
III.2.2.1 Cazul 1: Substraturi cu un inel fenil orto-substituit	23
III.2.2.2 Cazul 2: Substraturi cu un inel fenil meta-substituit	25
III.2.2.3 Cazul 3: Substraturi cu inel fenil para-substituit.....	25

III.3 Concluzii.....	30
CAPITOLUL IV. PRODUCȚIE PROIECTATĂ, SCALABILĂ, DE L-FENILALANINE OPTIC PURE FOLOSIND FENILALANIN AMONIAC-LIAZA DIN ARABIDOPSIS THALIANA	31
IV.1 Background (date din literatură).....	31
IV.2 Rezultate și discuții.....	31
<i>IV.2.1 Optimizarea reacțiilor de aminare mediate de AtPAL.....</i>	<i>31</i>
IV.2.1.1 Efectul concentrației de substrat	31
IV.2.1.2 Efectul formei biocatalizatorului	35
IV.2.1.3 Efectul densității celulare.....	36
IV.2.1.4 Efectul sursei de amoniac/mediului de reacție.....	36
IV.2.1.5 Efectul pH-ului	37
IV.2.1.6 Efectul temperaturii	37
<i>IV.2.2 Utilizarea AtPAL la scară preparativă</i>	<i>38</i>
IV.2.2.1 Rezultatele la scară preparativă și procedurile bazate pe PAL raportate anterior.....	39
IV.2.2.2 Factori E simplificați (sEF) și randamente spațiu-timp (STY)	40
V.3 Concluzii.....	41
CONCLUZII GENERALE.....	43
CAPITOLUL V. SECȚIUNEA EXPERIMENTALĂ: MATERIALE ȘI METODE	44
BIBLIOGRAFIE	44

Lista de publicații

Prezenta teză se bazează pe următoarele publicații:

- 1. Tork S.D.**, Nagy E.Z.A., Cserepes L., Bordea D.M., Nagy B., Toșa M.I., Paizs C., Bencze L.C., The production of L- and D-phenylalanines using engineered phenylalanine ammonia lyases from *Petroselinum crispum*, *Scientific Reports* **2019**, 9: 20123.
DOI: 10.1038/s41598-019-56554-0
IF: 4.16
ISSN: 2045-2322
AIS: 1.285 (Q1)
- 2. Tork S.D.**, Moisă M.E., Cserepes L., Filip A., Nagy L.C., Irimie F.D., Bencze L.C., Towards a general approach for tailoring the hydrophobic binding site of phenylalanine ammonia-lyases, *Scientific Reports* **2022**, 12: 10606.
DOI: 10.1038/s41598-022-14585-0
IF: 4.54
ISSN: 2045-2322
AIS: 1.285 (Q1)
- 3. Tork S.D.**, Nagy E.Z.A., Cserepes L., Tomoiagă R.B., Bencze L.C., Engineered, scalable production of optically pure L-phenylalanines using phenylalanine ammonia-lyase from *Arabidopsis thaliana*, *The Journal of Organic Chemistry* **2023**, 88: 852
DOI: 10.1021/acs.joc.2c02106
IF: 4.198
ISSN: 0022-3263
AIS: 0.793 (Q1)

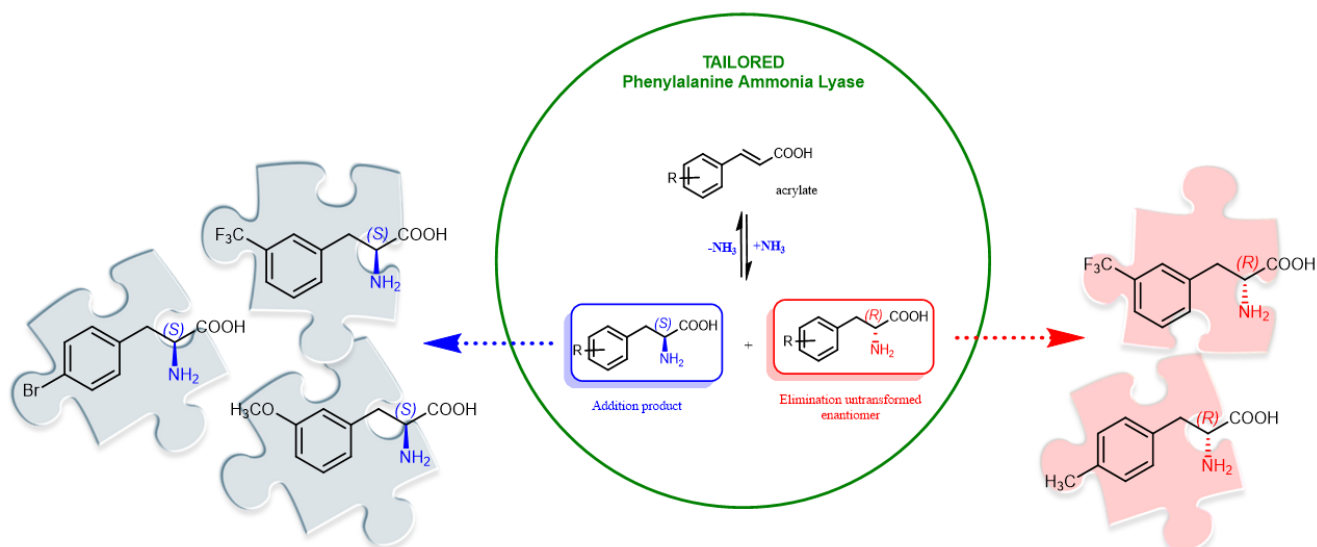
Alte publicații cu tematici complementare:

- Filip A., Nagy E.Z.A., **Tork S.D.**, Bánóczy G., Toșa M.I., Irimie F.D., Poppe L., Csaba P., Bencze L.C., Tailored mutants of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum* for the synthesis of bulky L- and D-arylalanines, *ChemCatChem*, **2018**, 10: 2627.
DOI: 10.1002/cctc.201800258
IF: 4.495
ISSN: 1867-3899
AIS: 1.056 (Q2)
- Nagy E.Z.A., **Tork S.D.**, Lang P.A., Irimie F.D., Poppe L., Toșa 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: 8825.
DOI: 10.1021/acscatal.9b02108
IF: 12.350
ISSN: 2155-5435
AIS: 3.13 (Q2)
- Tomoiagă R.B., **Tork S.D.**, Horváth I., Filip A., Nagy L.C., Bencze L.C., Saturation mutagenesis for phenylalanine ammonia lyases of enhanced catalytic properties, *Biomolecules*, **2020**, 10: 838.
DOI: 10.3390/biom10060838
IF: 4.555
eISSN: 2218-273X
AIS: 1.041 (Q2)
- Tomoiagă R.B., **Tork S.D.**, Filip A., Nagy L.C., Bencze L.C., Phenylalanine ammonia lyases: protein engineering versus natural diversity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2023**, 107: 1243
DOI: 10.1007/s00253-023-12374-x
IF: 5.46
ISSN: 0175-7598
AIS: 0.864 (Q2)

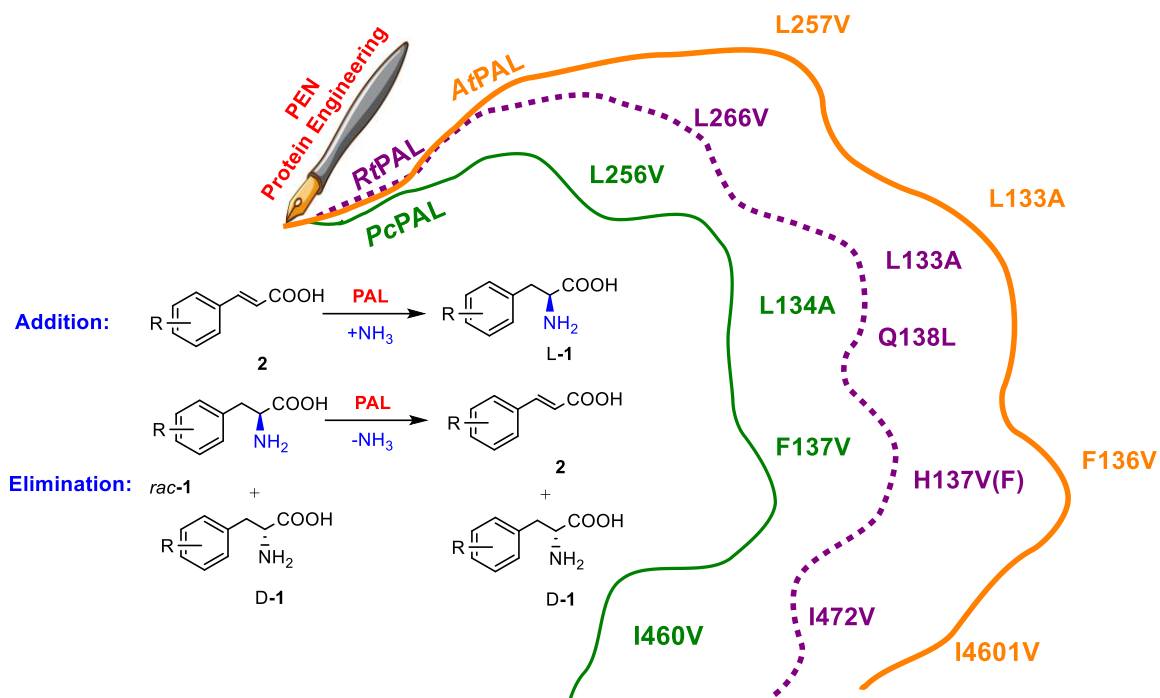
Obiectivele tezei de doctorat

Scopul principal al tezei este dezvoltarea unei proceduri biotehnologice extrem de eficiente pentru sinteza la scară preparativă a unor analogi nenaturali de fenilalanină cu aplicații industriale semnificative, folosind ca și biocatalizator fenilalanin amoniac-liază (PAL) modificată prin inginerie proteică. S-a identificat un **set de obiective**, care au fost categorizate în trei capitole distincte, fiecare capitol reprezentând un aspect diferit al obiectivului general:

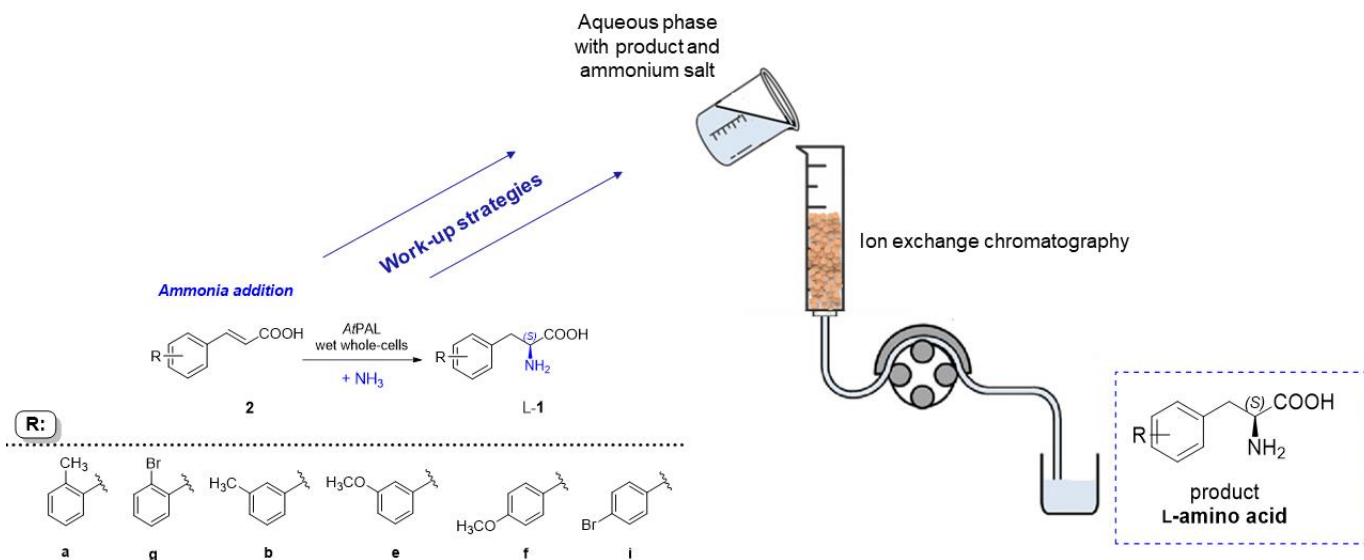
Obiectivul 1: Dezvoltarea unei proceduri extrem de eficiente pentru sinteza de derivați de fenilalanină folosind *PcPAL*-uri, pentru a furniza dovezi empirice pentru utilitatea sintetică a variantelor mutante de *PcPAL* în aplicații practice în sinteza de compuși cu valoare industrială ridicată.



Obiectivul 2: Evaluarea transferabilității modelului de proiectare rațională care a fost utilizat pentru producerea variantelor mutante eficiente ale *PcPAL*-ului, prin examinarea modalității în care această metodă poate fi aplicată la alte PAL-uri din aceeași familie enzimatică, pentru a furniza o gamă de biocatalizatori disponibili pentru sinteza de derivați valoroși de fenilalanină.



Obiectivul 3: Folosirea variantelor mutante de *AtPAL* pentru a permite dezvoltarea unei proceduri biocatalitice care permite obținerea unor aminoacizi valoroși, utilizați ca building blocks în diverse industrii și respectă principiile chimiei verzi.



Cuvinte cheie: aminoacizi nenaturali, fenilalanin amoniac-liaza, scară preparativă, biotransformare, derivați de fenilalanină, inginerie proteică, proceduri sintetice verzi.

Capitolul I. Introducere: Biotransformări mediate de PAL

I.1 Aminoacizi nenaturali utilizați ca building blocks

Companiile farmaceutice și de produse chimice sunt implicate activ în producția de aminoacizi optic puri datorită rolului lor central ca building blocks în sinteza diferitelor produse farmaceutice, cosmetice, hormoni și produse agrochimice.^{1, 2} Incorporarea aminoacizilor non-proteinogenici în aceste produse a câștigat o atenție semnificativă în cercetarea modernă de descoperire a medicamentelor, datorită diversității lor structurale, dar și a versatilității lor funcționale.^{2, 3} Peptidomimeticele, în particular, au utilizat pe scară largă aminoacizii nenaturali pentru a reglementa răspunsul natural sau activitatea biologică a produselor vizate.² În plus, aminoacizii nenaturali au fost încorporați în diferite produse, inclusiv inhibitori de protează pentru prevenirea HIV, antibiotice, peptide antimicrobiene, conjugate anticorpi-medicament, liganzi ai receptorilor neuronal și medicamente anticancer.^{2, 4-6}

Există mai multe abordări pentru sinteza de aminoacizi non-proteinogenici, cum ar fi sinteza chimică, o metodă larg utilizată. Însă aceasta se finalizează cu obținerea unui amestec racemic de enantiomeri D și L, iar separarea lor este o sarcină provocatoare.^{2, 7} În contrast, procedurile chimice și biocatalitice stereoselective oferă o alternativă atractivă pentru sinteza aminoacizilor optic puri, inclusiv a aminoacizilor nenaturali. Abordarea, utilizând metode biocatalitice este de mare interes datorită numeroaselor avantaje.

De exemplu, metodele biocatalitice folosesc adesea condiții de reacție blânde și prietenoase cu mediul înconjurător, permițând utilizarea de materii prime disponibile achirale. În plus, biocataliza elimină necesitatea etapelor de protecție și / sau deprotecție, care sunt frecvent necesare în sinteza organică.^{1, 2, 7} Aceste avantaje au dus la creșterea interesului în abordarea biocatalitică pentru sinteza de aminoacizi optic puri pentru diverse aplicații în industria farmaceutică și de produse chimice.

De un interes particular sunt aminoacizii aromatici, precum derivații de fenilalanină (obiectivul tezei), cu diverse aplicații industriale: aditivi alimentari^{8, 9}, cosmetice¹⁰, medicină¹¹⁻¹³ și aplicații farmaceutice.

I.2 Fenilalanin amoniac-liaza (PAL)

PAL catalizează deaminarea reversibilă a L-fenilalaninei la acid *trans*-cinamic, fiind prima etapă în biosinteza unui spectru larg de compuși fenilpropanoidici. Cele mai studiate fenilalanin amoniac-liaze sunt: *RgPAL* (*Rhodotorula glutinis* - PAL din drojdie)¹⁴, *RtPAL* (*Rhodospiridium toruloides* - PAL din drojdie)¹⁵, *PcPAL* (*Petroselinum crispum* - PAL din plante)^{16, 17} și *AvPAL* (*Anabaena variabilis* - PAL din bacterii)¹⁸.

Domeniul de substrat al *PcPAL*-ului a fost explorat pe larg, dezvăluind o toleranță largă a enzimei față de diverse substraturi, dar și potențialul valoros al acesteia în sinteza biocatalitică industrială a aminoacizilor nenaturali. Cercetările anterioare ale lui Rétey, Paizs și colegilor lor au arătat că sinteza mai multor acizi 5-fenilfuran-2-il-acrilici și a aminoacizilor lor corespunzători este posibilă utilizând enzima *PcPAL wild-type* purificată, obținând conversii mari și un exces enantiomeric ridicat (*ee* > 99%).¹⁹ Enzima *PcPAL wild-type* a fost de asemenea testată cu sisteme de furan și tiofen, inclusiv cu inele aromatice mai mari, convertind eficient multe dintre aceste substraturi

cu randamente de izolare bune (49-89% în cazul reacțiilor de adiție de amoniac și 43-45% în cazul reacțiilor de eliminare de amoniac) (**Figura I.1**), cu toate că o parte din aceste substraturi au arătat anterior o activitate slabă sau nulă cu PAL-urile fungice²⁰. Cu toate acestea, s-a constatat că substraturile care conțin furani și tiofeni substituie în poziția 3 adoptă o conformație de legare nefavorabilă în situsul activ, ducând la o lipsă de activitate, susținând mecanismul de tip Friedel-Crafts.

Prin explorarea riguroasă a situsului activ al *PcPAL*-ului și demonstrarea toleranței sale largi pentru substraturi, acest studiu a deschis calea pentru dezvoltarea de rute sustenabile, potențiale pentru producția unei game largi de derivați de aminoacizi nenaturali. Recent, modificarea situsului catalitic al fenilalanin amoniac-liazei din *Petroselinum crispum* prin ingineria genetică a furnizat noi variante mutante cu activitate biocatalitică îmbunătățită. Prin urmare, mutantul F137V s-a dovedit a fi eficient în cazul analogilor voluminoși precum stirilalaninele, impedimentați steric de inelul aromatic al fenilalaninei din poziția 137²¹, în timp ce alți analogi valoroși ai fenilalaninei, cum ar fi (4-metoxifenil)-, (naftalen-2-il)-, ([1,1'-bifenil]-4-il)-, (4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)- și (5-feniltiofen-2-il)alanine, au fost sintetizați cu randamente relativ bune (19-65%) utilizând mutația combinată a reziduurilor F137 și I460²² (**Figura I.1**). Prin modificarea buzunarului de legare hidrofob al *PcPAL*-ului și evaluarea unui set de variante mutante singulare, s-a obținut o activitate și selectivitate îmbunătățită către fenilalanine și acizi cinamici substituiți cu grupări electron-donoare sau electron-acceptoare în toate pozițiile (*orto*, *meta*, *para*) de pe inelul lor aromatic.²³

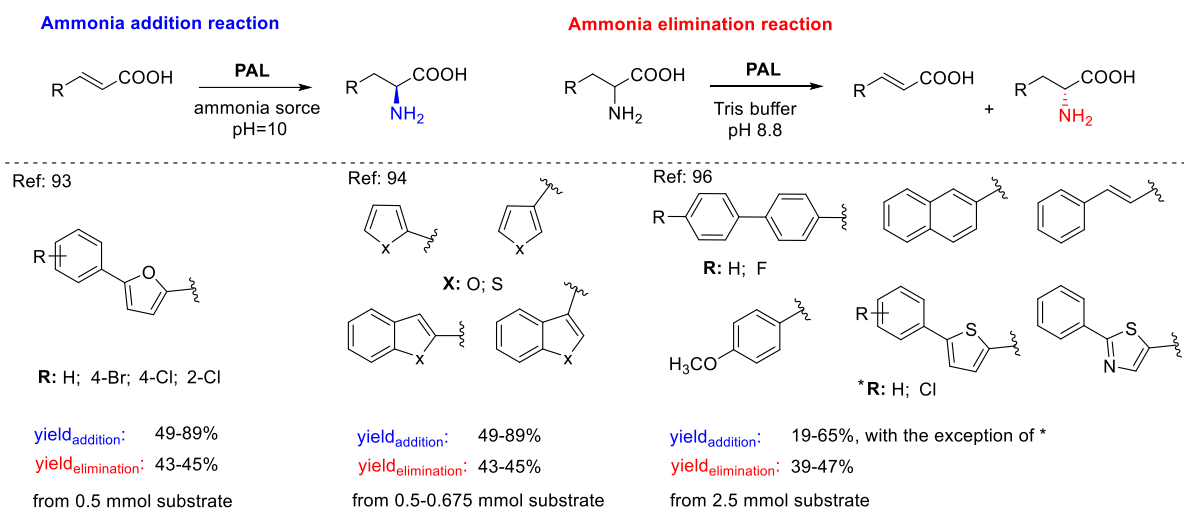


Figura I.1. Reacții de adiție și eliminare la scară preparativă raportate în literatură utilizând enzima *PcPAL*.

I.3 Starea actuală a biotransformărilor mediate de PAL la scară preparativă

Unul dintre avantajele semnificative ale utilizării fenilalanin amoniac-liazelor (PAL, EC 4.3.1.24/25) în sinteza chimică este capacitatea lor de a cataliza adiția de amoniac la acizii *trans*-cinamici, chiar și la concentrații ridicate de amoniac. Această proprietate unică permite sinteza asimetrică a analogilor optici puri ai L-fenilalaninei, făcând din PAL un biocatalizator atractiv pentru producția de aminoacizi chirali.

Cu toate că PAL-urile au arătat că au potențial în sinteza chimică, există un număr limitat de exemple de reacții de aminare la scară industrială de succes utilizând acești biocatalizatori. Compania Royal DSM, a dezvoltat o reacție de aminare la scară industrială eficientă pentru producerea acidului

(*S*)-2,3-dihidro-1*H*-indol-2-carboxilic, un intermediar cheie utilizat în sinteza inhibitorilor ACE, pentru tratarea hipertensiunii arteriale. Reacția implică aminarea selectivă a acizilor 2-Cl- sau 2-Br-cinamici utilizând o enzimă PAL din *Rhodotorula glutinis* (RgPAL) și închiderea inelului catalizată de cupru rezultând acidul (*S*)-2-indolin-carboxilic. Reacția produce 18,1 g (100 mM) de 2-Cl-(*S*)- α -fenilalanină cu o conversie de 91% în 8,5 ore (**Figura I.2**).²⁴

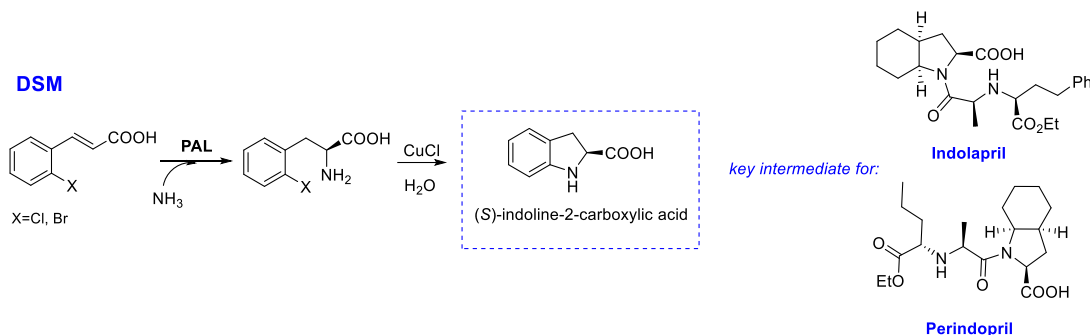


Figura I.2. Producția la scară preparativă a acidului (*S*)-2,3-dihidro-1*H*-indol-2-carboxilic de către DSM.

O altă enzimă, AvPAL, obținută prin inginerie proteică (PAL-130 SEQ ID NOs 987/988, dezvoltată de Codexis, utilizând platforma lor de inginerie proteică CodeEvolver) a fost folosită în sinteza Olodanrigan-ului (EMA401), un antagonist de tip 2 al angiotensinei II utilizat pentru tratarea durerii neuropatice. Novartis a dezvoltat o abordare sintetică pentru EMA401 care implică hidroaminarea acidului (*E*)-3-(2-(benziloxi)-3-metoxifenil)acrilic la acidul (*S*)-2-amino-3-(2-(benziloxi)-3-metoxifenil)propanoic ca etapă cheie. Enzima PAL-130 a fost aplicată în condiții optime pentru biotransformarea unui derivat de acid cinamic, rezultând producția intermediarului tetrahydroizochinolinic cu un randament de 68% după patru zile²⁵ (**Figura I.3**).

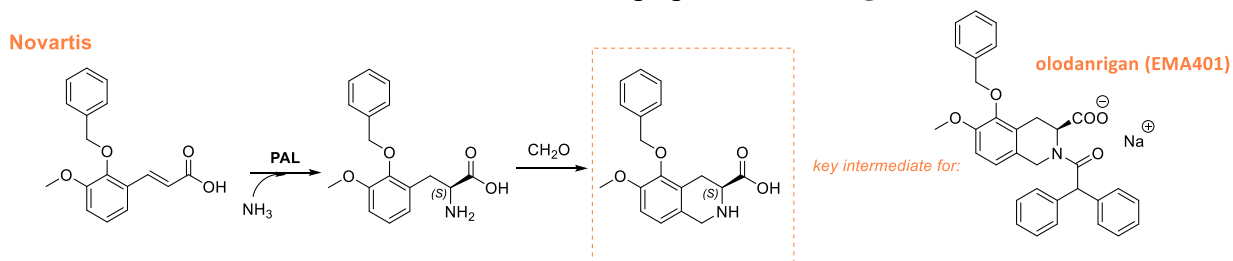


Figura I.3. Ruta biocatalitică pentru sinteza EMA401 de către Novartis.²⁵

Capitolul II. Producția de L- și D-fenilalanine utilizând fenilalanin amoniac-liaza din *Petroselinum crispum*

II.1 Background (date din literatură)

II.2 Rezultate și Discuții

Producția unor analogi importanți de (*S*)- α -fenilalanină și (*R*)- α -fenilalanină utilizând variante mutante de PcPAL (L256V, L134A și I460V) raportate în literatură²³ (**Figura II.1**), ne-a determinat să stabilim condițiile optime pentru biotransformări la scară preparativă. Astfel, o serie de parametri de reacție au fost optimizați atât pentru reacțiile de eliminare, cât și pentru cele de adiție: raportul biocatalizator: substrat, sursa de amoniac, mediul de reacție și concentrația de substrat.

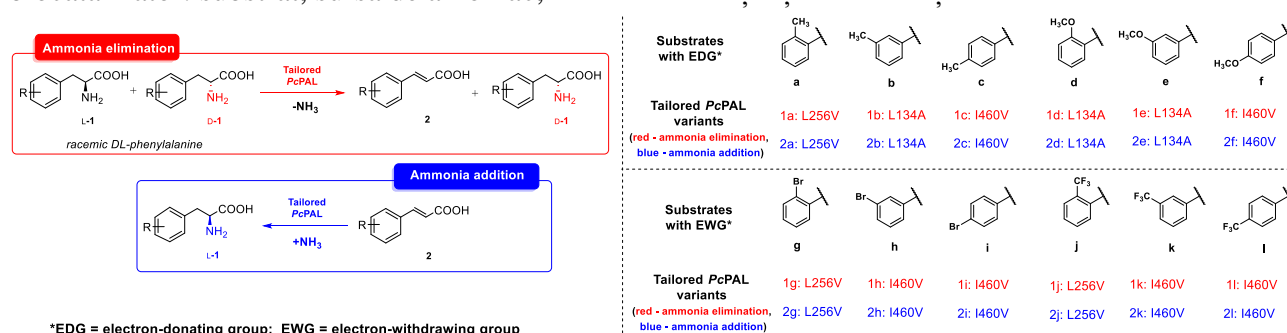


Figura II.1. Substraturi testate în reacțiile de adiție și de eliminare a acizilor cinamici și a fenilalaninelor monosubstituie cu grupări electron-donoare (-CH₃, -OCH₃) sau electron-acceptoare (-CF₃, -Br), catalizate de variantele mutante PcPAL corespunzătoare²³.

II.2.1 Optimizarea reacțiilor de aminare catalizate de PcPAL

II.2.1.1 Efectul mediului de reacție/sursa de amoniac

Influența mediului de reacție utilizat și ca sursă de amoniac asupra valorilor de conversie și excesul enantiomeric al reacțiilor de hidroaminare a fost studiată folosind doi derivați de acid cinamic *para*-substituiți ca substraturi model și anume, acidul *p*-metil-cinamic **2c** și acidul *p*-trifluorometil-cinamic **2l**. Adițiile de amoniac au fost efectuate la o concentrație fixă (2 mM substrat), cu celule întregi de PcPAL I460V de densități celulare de OD₆₀₀ ~ 1 (~ 6 mg celule umede/mL), variind diferite concentrații de soluții tampon de amoniac (2, 4, 6 M NH₄OH pH 10,0 ajustat cu CO₂) și soluții de carbamat de amoniu (2, 4, 6 M NH₄[H₂NCO₂] pH ~10,0 fără ajustare).

Rezultate obținute în urma reacțiilor de adiție pe substraturile **2c** și **2l** indică că cea mai mare conversie a fost obținută utilizând 6 M NH₄OH, cu valori de conversie de 30,2% și respectiv 60,3%, după 24 ore (**Figura II.2**). Cu toate acestea, utilizarea a 4-6 M NH₄[H₂NCO₂] a rezultat în valori de conversii semnificativ mai mici (11,1-20,6% pentru **2c** și <1-17,6% pentru **2l**) după 24 ore, contrar cu rezultatele raportate în literatură pentru alte PAL-uri^{26, 27}. Rezultatele din **Figura II.2** indică că prin utilizarea soluției de 2 M carbamat de amoniu au rezultat valori de conversii similare cu cele obținute cu soluția de amoniac 6 M. Acest rezultat se datorează cel mai probabil faptului că NH₄[H₂NCO₂] eliberează două molecule de amoniac și are o tărie ionică mai mică față de NH₄OH.

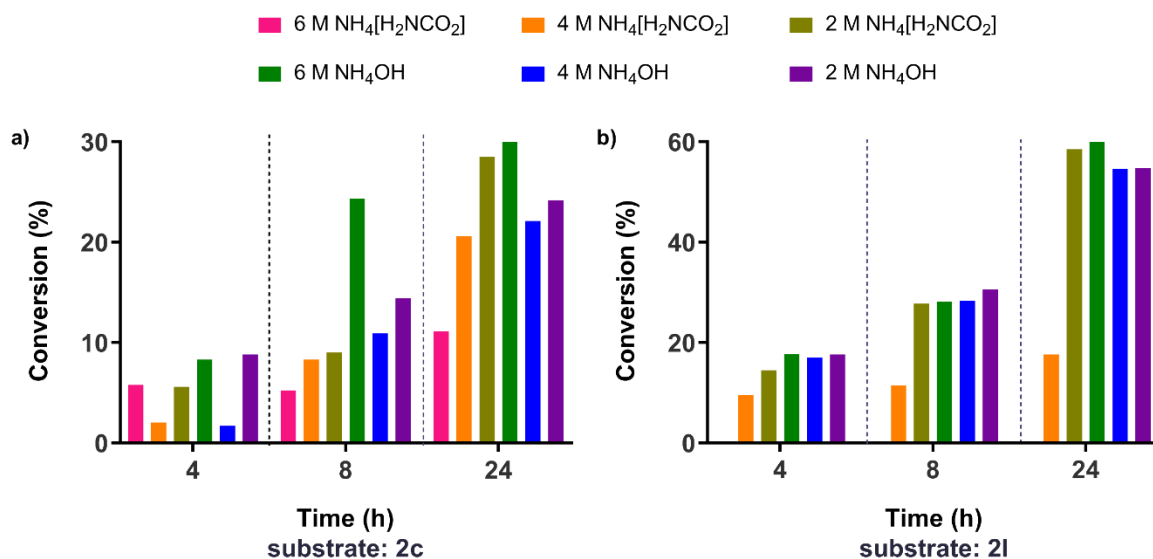


Figura II.2. Valorile de conversie obținute la aminarea a) acidului *p*-CH₃-cinamic **2c** și b) acidului *p*-CF₃-cinamic **2l**, utilizând NH₄OH și NH₄[H₂NCO₂] ca sursă de amoniac. *ee* > 99% în toate probele colectate din reacție.

II.2.1.2 Efectul densității celulare

Efectul diferitelor densități celulare asupra valorilor de conversie și excesului enantiomeric (*ee*) a fost testat pentru aceleași substraturi model: acidul *p*-metil-cinamic **2c** și acidul *p*-trifluorometil-cinamic **2l**, utilizând celule întregi de *PcPAL* I460V de OD₆₀₀ ~ 1, 2, 4 și 8, corespunzând unei concentrații de celule umede de ~ 6, 12, 24 și 48 mg/mL. La o concentrație fixă a substratului de 2 mM, raportul biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM) a variat de la 0,5 la 4. Utilizarea unor densități celulare de OD₆₀₀ ~ 2 a condus la valori ridicate ale conversiei (**Figura II.3**), în timp ce creșterea densității celulare la OD₆₀₀ ~ 4 sau 8 a condus doar la o creștere a vâscozității mediului de reacție, făcând dificilă pregătirea probelor și monitorizarea prin HPLC. Prin urmare, un raport biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM) de 1 a fost ales pentru optimizările ulterioare.

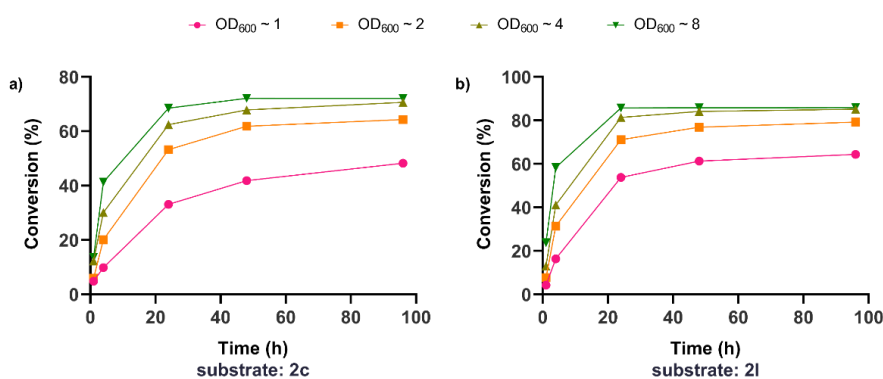


Figura II.3. Valorile de conversie obținute la aminarea a) acidului *p*-CH₃-cinamic **2c** și b) acidului *p*-CF₃-cinamic **2l**, variind raportul biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM).

II.2.1.3 Efectul concentrației de substrat

Efectul concentrației substratului asupra performanței catalitice a variantelor mutante *PcPAL* (L134A, L256V și I460V) a fost testat în adăugarea de amoniac pe toți analogii acidului cinamic **2a-l** în limita solubilității acestora timp de 48 de ore, folosind 6 M NH₄OH ca mediu de reacție și sursă de amoniac și un raport optim biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM) de ~1.

Rezultatele arată că substraturile *orto*-substituie (cu excepția acidului *o*-CH₃-cinamic) au fost obținute cu conversii mari chiar și la concentrații mari de substrat de până la 70 mM după 48 de ore, cu valori de conversie de 91,8% pentru **2a**, 81,0% pentru **2g**, și 66,0% pentru **2j** (Figura II.4). Cu toate acestea, valorile de conversie pentru acidul *o*-OCH₃-cinamic **2d** au scăzut de la 44,4% la 19,9% la dublarea concentrației substratului de la 10 mM la 20 mM (Figura II.4).

În cazul substraturilor *meta*-substituie care poartă grupări atrăgătoare de electroni -CF₃ și -Br, conversia staționară maximă s-a apropiat de ~80% după 24 de ore la o concentrație scăzută de substrat de 2 și, respectiv, 5 mM (Figura II.5). Reacția de adiție de amoniac pe acidul *m*-CH₃-cinamic **2b** s-a oprit la 26,4% la o concentrație de substrat de 2 mM după 48 de ore. Cu toate acestea, valoarea de conversie staționară pentru acidul *m*-OCH₃-cinamic **2e** nu a fost afectată de creșterea concentrației substratului și a atins 71% la 50 mM după 48 de ore (Figura II.5).

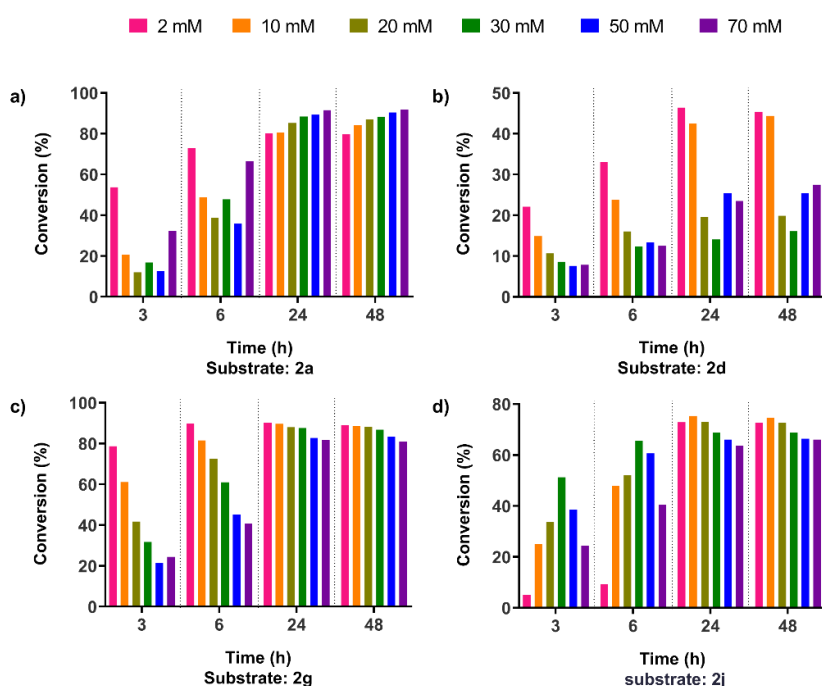


Figura II.4. Profilul de conversie în timp pentru a) acidul *o*-CH₃-cinamic **2a**, b) acidul *o*-OCH₃-cinamic **2d**, c) acidul *o*-Br-cinamic **2g** și d) acidul *o*-CF₃-cinamic **2j** utilizând variante corespunzătoare de *PcPAL*.

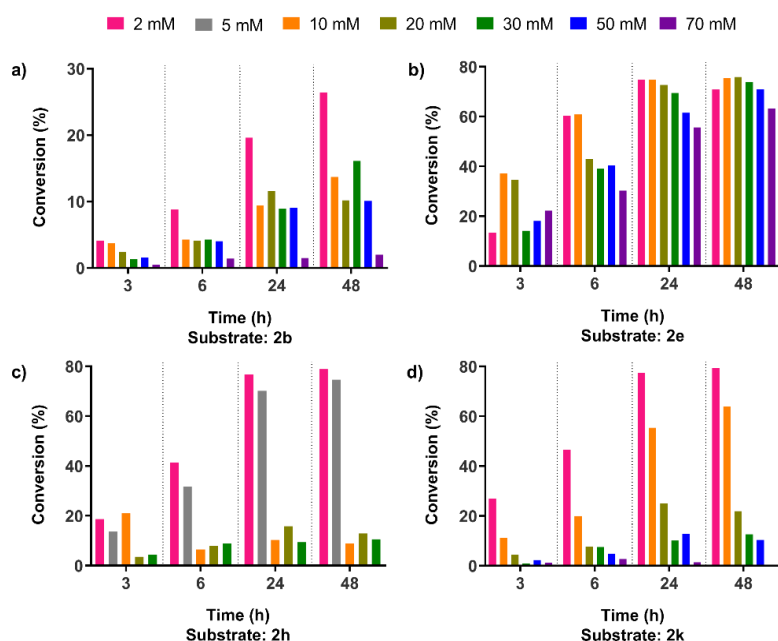


Figura II.5. Profilul de conversie în timp pentru a) acidul *m*-CH₃-cinamic **2b**, b) acidul *m*-OCH₃-cinamic **2e**, c) acidul *m*-Br-cinamic **2h** și acidul *m*-CF₃-cinamic **2k** utilizând variante corespunzătoare de *PcPAL*.

O situație similară a fost observată pentru acidul *p*-OCH₃-cinamic **2f**, unde reacția de aminare s-a oprit la o conversie de numai 19,1% la o concentrație de substrat de 30 mM după 48 de ore (**Figura II.6**). Excepție este cazul acidului *p*-CH₃-cinamic **2c**, unde valorile moderate de conversie (~55-60%) au fost obținute la o concentrație de substrat de până la 50 mM.

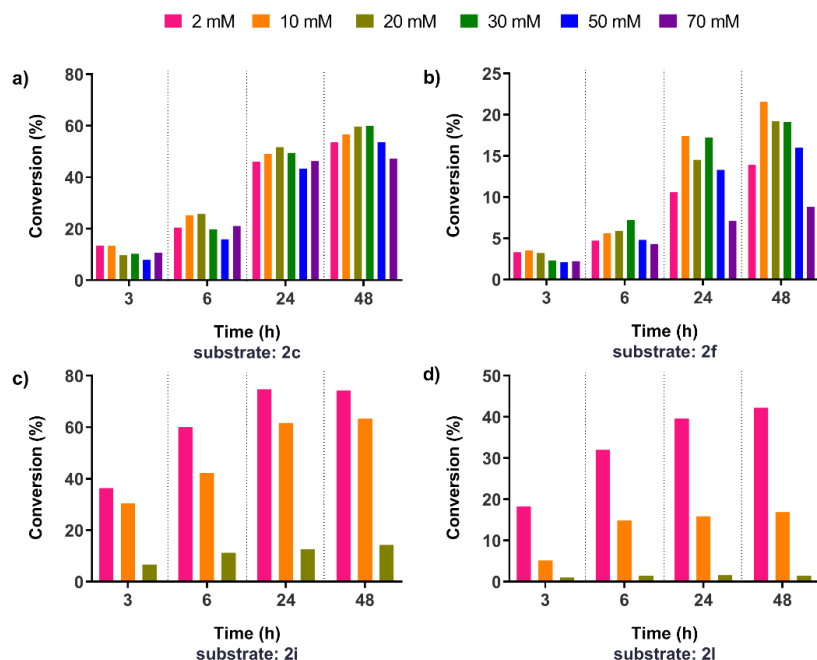


Figura II.6. Profilul de conversie în timp pentru a) acidul *p*-CH₃-cinamic **2c**, b) acidul *p*-OCH₃-cinamic **2f**, c) acidul *p*-Br-cinamic **2i** și d) acidul *p*-CF₃-cinamic **2l** utilizând variante corespunzătoare de PcPAL.

II.2.1.4 Inhibiția de substrat/produs

Folosind parametrii optima determinați pentru reacțiile de adiție a amoniacului pe derivații de acid cinamic **2a-1**, s-au înregistrat conversii mari sau moderate cu enantioselectivități excelente, exceptând substraturile **2b** și **2f**, pentru care s-au înregistrat conversii staționare semnificativ scăzute de 26,4 % și 19,1%. Efectul inhibitor al produsului a fost demonstrat prin monitorizarea producției de derivați de fenilalanină în prezența diferitelor concentrații de *rac*-**1b** și *rac*-**1f** (0-1.5 mM), folosind condițiile optime și o concentrație fixă de substrat de **2b** și **2f** de 1 mM. (**Figura II.7**). În plus, efectul inhibitor al produsului în reacțiile de aminare a acidului *p*-CH₃O-cinamic **2f** a fost de asemenea investigat utilizând măsurători cinetice, monitorizând formarea derivatului de fenilalanină L-**1f** la 316 nm prin varierea diferitelor concentrații de *rac*-**1f** (0-2 mM) (**Figura II.8**).

Apariția inhibiției de substrat a fost investigată pentru **2l**, care a prezentat conversii staționare reduse la concentrații mai mari de substrat. Inhibiția a fost confirmată prin monitorizarea UV a producției de L-**1l** la 316 nm în prezența diferitelor concentrații de **2l** folosind enzima I460V PcPAL purificată (**Figura II.8**).

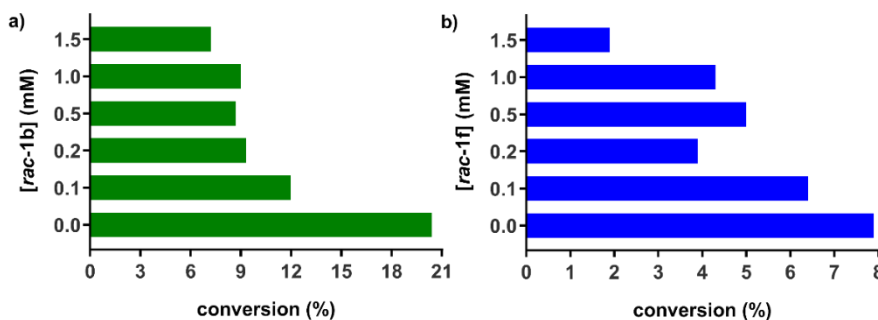


Figura II.7. Influența creșterii concentrației de produs asupra valorilor de conversie ale adiției de amoniac pe a) acidul *m*-CH₃-cinamic **2b** și b) acidul *p*-CH₃O-cinamic **2f**, utilizând celule întregi de L134A și I460V PcPAL.

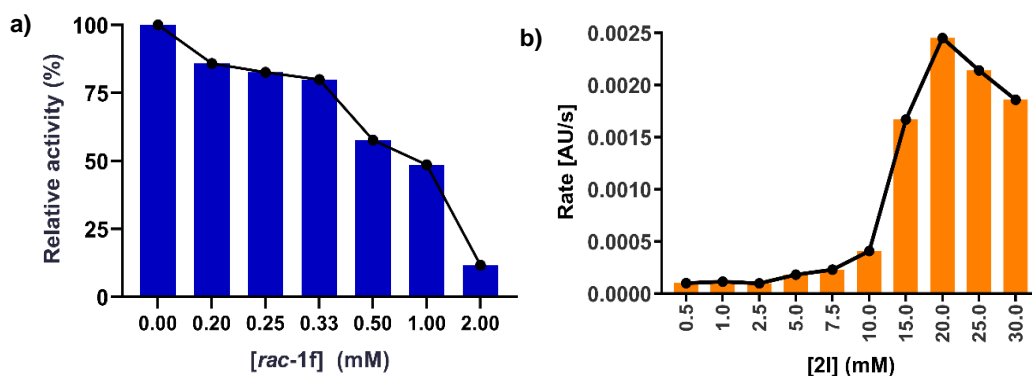


Figura II.8. Influența creșterii a) concentrației de produs asupra activității relative a adăugării de amoniac pe **2f** și b) concentrației de substrat asupra vitezei de reacție a adăugării de amoniac pe **2I**, folosind enzima I460V PcPAL purificată.

II.2.2 Optimizarea reacțiilor de deaminare mediate de PAL

II.2.2.1 Efectul sistemelor de soluții tampon utilizate ca mediu de reacție

Influența diferitelor sisteme tampon asupra valorilor de conversie și de exces enantiomeric (ee_D) au fost studiate în reacțiile de eliminare a amoniacului pe substraturile model *rac-p*-CH₃-fenilalanina (*rac-1c*) și *rac-m*-CF₃-fenilalanina (*rac-1k*), la o concentrație fixă de substrat de 2 mM. Sistemele tampon apoase testate, cum ar fi Tris (20 mM Tris.HCl, 120 mM NaCl, pH 8,8), NH₄OH (0,1 M NH₄OH, pH 9,5, ajustat cu CO₂), fosfat (0,1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8,8), borax (0,1 M Na₂[B₄O₅(OH)₄], pH 9,5), acetat de amoniu (0,1 M CH₃COONH₄, pH 9,5) și carbonat de sodiu (0,1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,0) sunt poziționate în domeniul pH-ului optim al enzimei PAL care variază în general între 8,2-9,5.^{18, 28, 29} Profilul de pH al biotransformării mediate de celule întregi I460V PcPAL a fost determinat în deaminarea *rac-1k*, utilizând soluție tampon Tris ca mediu de reacție având diferite valori de pH (pH 7,5–10,0). Cele mai mari valori de conversie (~50%) au fost obținute după 20 de ore la un pH cuprins între 8,8-9,7 (**Figura II.9**).

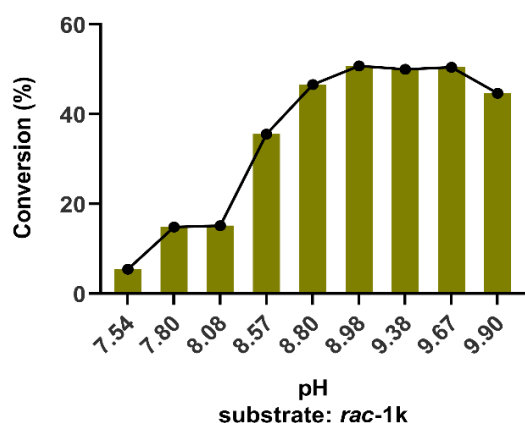


Figura II.9. Valorile de conversie obținute în reacția de deaminare mediată de celule întregi PcPAL I460V a *rac-m*-CF₃-fenilalaninei *rac-1k* utilizând soluție tampon Tris ca mediu de reacție (valoarea pH-ului variază de la 7,5 la 10,0).

Sistemul tampon optim pentru care s-au obținut cele mai mari valori de conversie și exces enantiomeric pentru ambele substraturi model, a fost cel pe bază de borax, fiind utilizat mai departe în reacțiile la scară preparativă (**Figura II.10**).

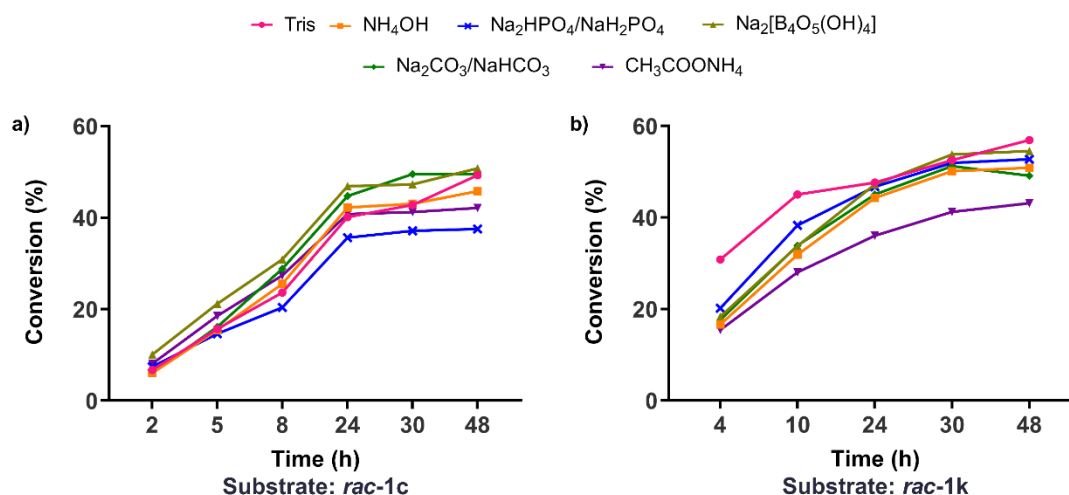


Figura II.10. Valorile de conversie obținute în deaminarea mediată de celule întregi *PcPAL I460V* pentru a) *rac-p*-CH₃-fenilalanina *rac-1c* și b) *rac-m*-CF₃-fenilalanina *rac-1k* folosind diferite sisteme tampon ca mediu de reacție.

II.2.2.2 Efectul raportului biocatalizator: substrat

Efectul raportului biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM) a fost testat pe aceleași substraturi model. Prin menținerea unei concentrații fixe de substrat de 2 mM în tampon borax (0,1 M Na₂[B₄O₅(OH)₄], pH 9,5), densitatea celulară (OD₆₀₀) a fost variată de la 1 la 4. Creșterea raportului biocatalizator: substrat la 2, a condus la timpuri de reacție mai scurți pentru realizarea conversiei optime de 50% (Tabelul II.1).

Tabel II.1. Efectul creșterii densității celulare asupra valorilor de conversie și exces enantiomeric ale *rac-p*-metil-fenilalanina *rac-1c* și *rac-m*-trifluorometil-fenilalanina *rac-1k*.

Substrat	(OD ₆₀₀ : mM) = 0,5			(OD ₆₀₀ : mM) = 1			(OD ₆₀₀ : mM) = 2		
	c (%)	<i>ee</i> _{D-1} (%)	<i>ee</i> _{theorD-1} (%)	c (%)	<i>ee</i> _{D-1} (%)	<i>ee</i> _{theorD-1} (%)	c (%)	<i>ee</i> _{D-1} (%)	<i>ee</i> _{theorD-1} (%)
<i>rac-p</i> -CH ₃ -fenilalanina (<i>rac-1c</i>)	38,1 [#]	63,3	61,7	39,9 [#]	66,3	66,5	~50 [#]	94,1	>99
<i>rac-m</i> -CF ₃ -fenilalanina (<i>rac-1k</i>)	27,3 [*]	37,5	37,5	45,6 [*]	88,8	84,0	~50 [*]	>99	>99

Condiții de reacție: testele au fost efectuate în tuburi de polipropilenă de 1,5 ml la 30 °C, 250 rpm, în 500 μL volum de reacție, utilizând 2 mM concentrație de substrat, diferite rapoarte (OD₆₀₀: mM) și 0,1 M Na₂[B₄O₅(OH)₄], pH 9,5 ca soluție tampon.

[#]după 24 ore; ^{*}după 5 ore;

II.2.2.3 Efectul concentrației de substrat

Influența concentrației substratului asupra conversiei și valorilor *ee* ale substraturilor model *rac-1c* și *rac-1k* a fost testată în limita solubilităților acestora. Reacțiile de deaminare au fost efectuate în soluție tampon 0,1 M Na₂[B₄O₅(OH)₄], pH 9,5 cu un raport OD₆₀₀: mM de 0,5 (pentru a reduce vâscozitatea mediului de reacție), variind concentrația substratului.

Conversia optimă de 50% a fost atinsă pentru *rac-1c* indiferent de concentrația substratului (Figura II.11), dar s-a observat o scădere a valorilor excesului enantiomeric odată cu creșterea concentrației de substrat (89% la concentrația de substrat de 15 mM) (Figura II.12). Pentru *rac-1k*,

s-au obținut conversii scăzute sau nule la concentrații mari de substrat (>10 mM) (**Figura II.13**) cu o scădere semnificativă a excesului enantiomeric.

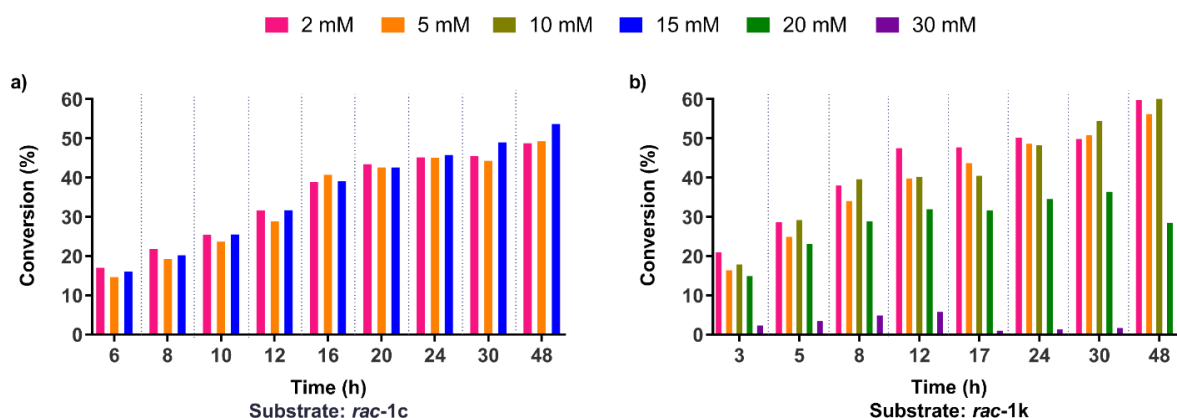


Figura II.12. Influența creșterii concentrației de substrat asupra valorilor de conversie ale eliminării amoniacului din a) *rac-p*-metil-fenilalanina *rac-1c* și b) *rac-m*-trifluorometil-fenilalanina *rac-1k*, folosind celule întregi de I460V *PcPAL*.

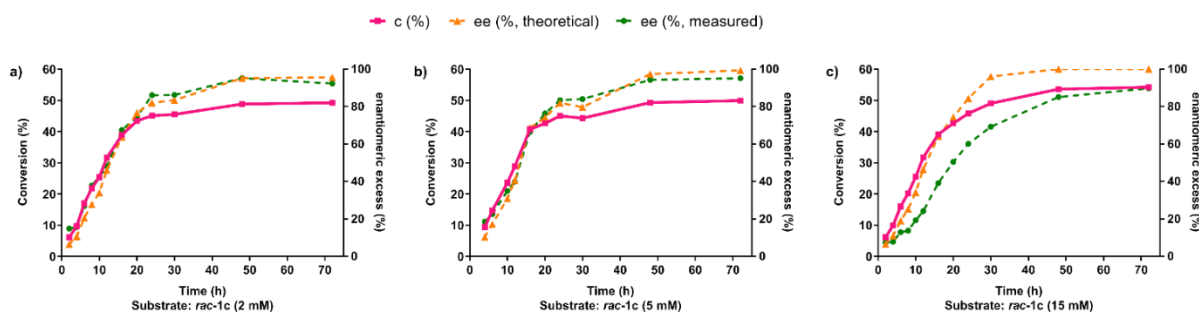


Figura II.13. Profil de progresie în timp (conversie și exces enantiomeric) pentru reacțiile de eliminare de amoniac din *p*-CH₃-fenilalanina *rac-1c* folosind celule întregi de I460V *PcPAL* ca biocatalizator și a) 2 mM, b) 5 mM și c) 15 mM concentrație de substrat.

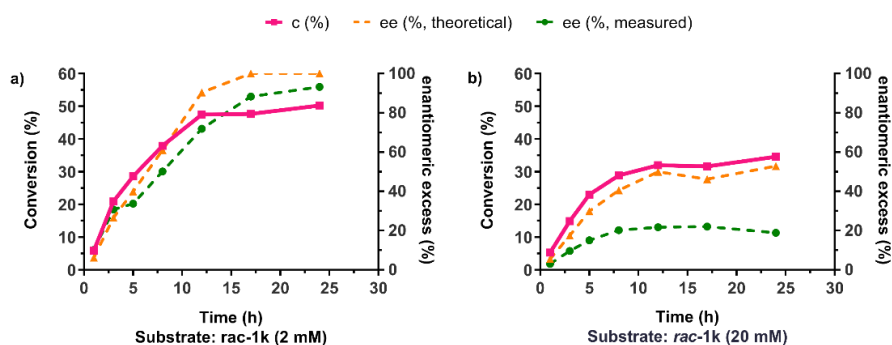


Figura II.14. Profil de progresie în timp (conversie și exces enantiomeric) pentru reacțiile de eliminare de amoniac din *m*-CF₃-fenilalanină *rac-1k* folosind celule întregi de I460V *PcPAL* ca biocatalizator și a) 2 mM, b) 20 mM concentrație de substrat.

II.2.2.4 Inhibiția de substrat

Scăderea valorilor de conversie odată cu creșterea concentrației substratului a sugerat apariția inhibiției de substrat, în mod similar cu aminarea acidului *m*-CF₃-cinamic **2k**. Inhibiția de substrat în reacția de eliminare a amoniacului din *rac*-**1k** a fost confirmată spectrofotometric prin monitorizarea UV a producției de acid *m*-CF₃-cinamic **2k** la 290 nm în prezența a diferitelor concentrații de *rac*-**1k** (0,1-50 mM), folosind I460V *PcPAL* ca biocatalizator. În acest caz, scăderea semnificativă a valorilor vitezelor de reacție a fost înregistrată la o concentrația de substrat >10 mM (**Figura II.14**).

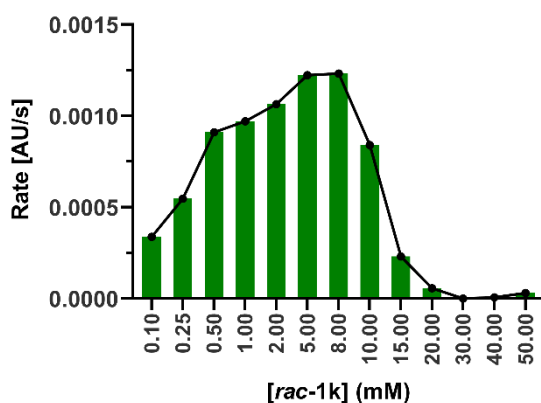


Figura II.14. Influența creșterii concentrației de substrat asupra vitezei de eliminare a amoniacului din *m*-CF₃-fenilalanină *rac*-**1k** utilizând enzima I460V *PcPAL* purificată.

II.2.3 Reacțiile preparative de adădire și eliminare de amoniac

II.2.3.1 Condițiile optime

În cazul reacțiilor de aminare, condițiile optime determinate au fost un raport biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM) de 1, 6 M NH₄OH pH 10 (ajustat cu CO₂) ca mediu de reacție, în timp ce creșterea concentrației substratului a avut un efect major asupra valorilor de conversie, pentru majoritatea substraturilor, din cauza apariției inhibiției de substrat sau de produs. Prin urmare, concentrațiile optime de substrat au fost alese ținând cont de cele mai mari valori de conversie și exces enantiomeric (*ee*) obținute în cel mai scurt timp (**Tabel II.2**). În cazul analogilor acidului cinamic care poartă substituentul donor de electroni -OCH₃, s-au obținut conversii și valori *ee_L* superioare celor raportate pentru *wild-type PcPAL*²³ (*c*<1% pentru **2d**, **2f** și *c*=1% pentru **2e**), *AvPAL*³⁰ (*c*=25% pentru **2e** și *c*=2% for **2e**) și *PbPAL F133A*^{31,32} (*c*=30% pentru **2d**). În cazul acizilor cinamici metil-substituiți, *ee_L* și valori de conversie mai mici sunt raportate pentru *wt-AvPAL*³⁰ (*ee_{L-1d}*=90%, *c*=64% pentru **2d**, *ee_{L-1e}*=94%, *c*=58% pentru **2e** și *c*=59% pentru **2f**). În cazul substraturilor cu grupări electron-acceptoare, valorile *ee_L* au depășit pe cele raportate pentru *wild-type AvPAL*³³ pentru **2l** (*ee_{L-1l}*=76% și *c*=65%), în timp ce valorile de conversie sunt superioare celor raportate pentru *AvPAL wild-type*³⁰ (*c*=66% pentru **2g**, *c*=55% pentru **2h** și *c*=42% pentru **2i**), comparabile cu cele obținute pentru mutanții *AvPAL F107L*, *F107I* și *F107A*³⁴ (*c*=72-80% pentru **2i**), dar inferioare față de cele raportate pentru mutantul *RgPAL 31E*²⁶ (*c*=94% pentru **2i**).

În cazul reacțiilor de eliminare a amoniacului, condițiile optime determinate au fost un raport biocatalizator: substrat (OD₆₀₀: mM) de 0,5, soluția tampon 0,1 M Na₂[B₄O₅(OH)₄], pH 9,5 ca mediu de reacție, în timp ce creșterea concentrației substratului a scăzut semnificativ valorile de conversie la fel ca și în cazul reacțiilor de aminare, dar au avut și un impact asupra valorilor de exces enantiomeric. Prin urmare, eliminarea amoniacului din *rac*-**1c** și *rac*-**1k** a fost efectuată la concentrații relativ scăzute de substrat (5 mM și respectiv 2 mM) pentru a obține valoarea optimă de conversie de

50%, la valori ee_D relativ mari (95% și respectiv 93%) (**Tabelul II.2**). Substraturile marcate cu fundal gri au fost selectate în continuare pentru biotransformări la scară preparativă.

Tabel II.2. Valori de conversie și excess enantiomeric (ee) obținute în reacțiile de adiție și de eliminare a amoniacului în condiții optime.

Reacția	Substrat	Substituent	Varianta PcPAL	[S] (mM)	Timp (ore)	c (%)	ee (%)*
Adiție de amoniac	2a	<i>o</i> -CH ₃	L256V	70	24	91,5	>99
	2b	<i>m</i> -CH ₃	L134A	2	48	26,4	>99
	2c	<i>p</i> -CH ₃	I460V	30	48	59,9	>99
	2d	<i>o</i> -OCH ₃	L134A	10	24	42,5	>99
	2e	<i>m</i> -OCH ₃	L134A	50	48	71,0	>99
	2f	<i>p</i> -OCH ₃	I460V	30	48	19,1	>99
	2g	<i>o</i> -Br	L256V	70	24	81,6	>99
	2h	<i>m</i> -Br	I460V	5	24	70,1	98,3
	2i	<i>p</i> -Br	I460V	10	24	61,6	>99
	2j	<i>o</i> -CF ₃	L256V	20	24	73,0	>99
	2k	<i>m</i> -CF ₃	I460V	2	24	77,5	>99
	2l	<i>p</i> -CF ₃	I460V	2	48	42,2	>99
Eliminare de amoniac	rac-1c	<i>p</i> -CH ₃	I460V	5	48	~50	95
	rac-1k	<i>m</i> -CF ₃	I460V	2	23	~50	93

Condiții de reacție pentru aminarea **2a-l**: testele au fost efectuate în tuburi de polipropilenă de 1,5 ml la 30 °C, 250 rpm, în 500 μL volum de reacție, utilizând 2-70 mM concentrație de substrat, un raport (OD₆₀₀: mM) de 1 și 6 M NH₄OH pH 10 (ajustat cu CO₂).

Condiții de reacție pentru deaminarea **rac-1c** și **rac-1f**: testele au fost efectuate în tuburi de polipropilenă de 1,5 ml la 30 °C, 250 rpm, în 500 μL volum de reacție, utilizând 2-70 mM concentrație de substrat, un raport (OD₆₀₀: mM) de 0,5 și 0,1 M Na₂[B₄O₅(OH)₄], pH 9,5 ca soluție tampon.

* ee_L (reacție de adiție) și ee_D (reacție de eliminare)

II.2.3.2 Utilizarea PAL în biotransformările la scară preparativă

Folosind condițiile optime de reacție, au fost efectuate biotransformări la scară preparativă (500 mg) pentru a confirma aplicabilitatea sintetică a PcPAL-urilor proiectate. Substraturile model (**2e**, **2i** și **2k** pentru reacțiile de adiție de amoniac și **rac-1c**, **rac-1k** pentru reacțiile de eliminare a amoniacului) au fost selectate pentru producerea de analogi enantiopuri de L- și D-Phe de mare interes industrial, cum ar fi: acidul (*S*)-2-amino-3-(3-metoxifenil)propanoic (*S*)-**1e**, acidul (*S*)-2-amino-3-(4-bromfenil)propanoic (*S*)-**1i**, acidul (*S*)-2-amino-3-(3-(trifluormetil)fenil)propanoic (*S*)-**1k**, acidul (*R*)-2-amino-3-(*p*-tolil)propanoic (*R*)-**1c** și acidul (*R*)-2-amino-3-(3-(trifluormetil)fenil)propanoic (*R*)-**1k**. Valorile de conversie și excesul enantiomeric au fost similare cu cele înregistrate la scară analitică, cu randamente bune de izolare și purități optice ridicate (**Tabelul II.3**).

Tabel II.3. Producție la scară preparativă. Valori de conversie și exces enantiomeric obținute în reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului în condiții optime la scară de 0,5 grame.

Tip de reacție	Produs	Timp de reacție (h)	Y* (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{27}$ #	Utilizare
Adiție de amoniac	(<i>S</i>)- 1e	42	59	>99	-66,4	inhibitor de protează HIV ³⁵
	(<i>S</i>)- 1i	48	82	>99	-47,6	analogi de sansamicină ³⁶ , biarilalanine ³⁴
	(<i>S</i>)- 1k	48	52	>99	-35,2	inhibitori KIFC ³⁷
Eliminare de amoniac	(<i>R</i>)- 1c	30	49	95	+5,7	inhibitori Pin1 ³⁸ , antagoniști ai receptorului 1 al peptidei formil ³⁹

(<i>R</i>)- 1k	30	39	93	+31,5	inhibitori (<i>R</i>)-PFI-2 ⁴⁰
-------------------------	----	----	----	-------	---

*Y = randamentul de reacție determinat din reacția la scară preparativă incluzând izolarea produsului, etapele de purificare;

#măsurătorile au fost efectuate în MeOH cu o concentrație de substrat de 10 mg/mL.

II.3 Concluzii

Studiul prezent demonstrează aplicabilitatea sintetică de succes a mutațiilor *PcPAL* anterior generați (L256V, L134A, I460V)²³ pentru sinteza biocatalitică eficientă a derivaților de enantiomeri de L- și D -Phe de înaltă valoare industrială. Reacțiile de adădire a amoniacului au avantaje notabile față de reacțiile de eliminare a amoniacului în ceea ce privește potențialul sintetic. Aspectul constatat se datorează faptului că aceste reacții de adădire oferă un randament teoretic de 100% pentru analogii de L-Phe și utilizează materiale de pornire achirale, accesibile din punct de vedere sintetic. În contrast, reacțiile de eliminare a amoniacului produc D-fenilalanine cu un randament teoretic maxim de 50%, care este realizat prin intermediul unui proces de rezoluție enzimatică pornind de la aminoacizi racemici.

Conversiile finale în reacțiile de adădire a amoniacului sunt afectate semnificativ de concentrația substratului, în special pentru substraturile care conțin grupuri poziționate *meta* sau substituenți electron-atrăgători, cum ar fi -Br sau -CF₃. Condiții de reacție specifice sunt necesare pentru fiecare substrat în parte în cazul reacțiilor de eliminare a amoniacului, inclusiv utilizarea diferitelor sisteme tampon ca medii de reacție, variația pH-ului și ajustarea raportului (OD: mM), deoarece acești factori pot influența conversia și valorile excesului enantiomeric. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că concentrațiile ridicate de substrat pot inhiba atât reacțiile de adădire, cât și cele de eliminare a amoniacului, ducând la o conversie și o enantioselectivitate redusă în procesul de rezoluție.

Capitolul III. Către o abordare generală pentru adaptarea situs-ului de legare hidrofob al fenilalanin amoniac-liazelor

III.1 Background (date din literatură)

III.2 Rezultate și Discuții

Dezvoltarea de noi PAL-uri de diferite origini este în continuă expansiune^{23, 32, 33, 41}. Regiunea de legare hidrofobă responsabilă pentru acomodarea ușoară a inelului aromatic al substratului în situsul activ prezintă, de asemenea, o similitudine ridicată între PAL-uri, cu toate că, în mai multe cazuri, apar și resturi de aminoacid polare. Un rest de aminoacid polar, cum ar fi histidina la poziția analoagă cu 137 în *PcPAL*, oferă, de asemenea, o activitate TAL (tirozin amoniac-liază). Acesta este motivul pentru care enzimele PAL din *Rhodotorula glutinis* (*RgPAL*) și *Rhodospodium toruloides* (*RtPAL*), au o activitate PAL/TAL și sunt capabile de deaminarea/aminarea aminoacizilor aromatici fenilalanină și tirozină. Alinierea secvenței PAL-urilor de diferite origini a arătat că *AtPAL*-ul este foarte asemănător cu *PcPAL*-ul, cu o identitate de secvență de 81%, în timp ce *RtPAL*-ul împărtășește doar o identitate de secvență de 38% cu *PcPAL*, dar un situs catalitic aproape identic, cu excepția pozițiilor analoage cu 137 și 138 din *PcPAL* (**Tabelul III.1**).

Tabel III.1. Resturile de aminoacizi ale regiunii de legare a substratului hidrofobă și polară ale *AtPAL* și *RtPAL* pe baza alinierii secvențelor cu *PcPAL*. Resturile de aminoacizi supuse mutațiilor sunt marcate cu albastru (*orto*), portocaliu (*meta*), verde (*para*), în timp ce diferențele majore dintre PAL sunt marcate cu culoare roșie.

Enzimă	<i>PcPAL</i>	<i>AtPAL</i>	<i>RtPAL</i>	Enzimă	<i>PcPAL</i>	<i>AtPAL</i>	<i>RtPAL</i>
Buzunar de legare hidrofob	L206	L207	L215	Regiune polară	Y110	Y109	Y110
	L256	L257	L266		N384	N385	N397
	V259	V260	V269		Q348	Q349	Q360
	L134	L133	L134		Y351	Y352	Y363
	L138	L137	Q138		N487	N488	N499
	F137	F136	H137		E484	E485	E496
I460	I461	I472	K456	K457	K468		
MIO	202-204	203-205	211-213	R354	R355	R366	

III.2.1 Generarea de noi enzime PAL mutante

Mutația individuală a resturilor de amoniacizi L134, F137, L256 și I460 din buzunarul de legare hidrofob al *PcPAL*-ului a condus la obținerea unei librării de variante PAL focalizată, cu activitate catalitică și selectivitate crescută față de fenilalanine și acizi cinamici monosubstituiți cu grupuri donoare și atrăgătoare de electroni în toate pozițiile (*orto*, *meta*, *para*) ale inelului lor aromatic²³. Aceleași resturi de aminoacizi care acționează ca modulatori ai specificității substratului au fost înlocuite în *AtPAL* și *RtPAL*, obținându-se opt noi variante PAL (L257V, L133A, F136V, I461V *AtPAL* și L266V, L134A, H137V, I472V *RtPAL*) (**Figura III.1**). În screening-urile inițiale, varianta mutantă H137V *RtPAL* a arătat o activitate biocatalitică redusă, spre deosebire de omologul său F137V *PcPAL*. Cauza s-a datorat probabil prezenței rezidului Q138 în apropierea sa, cu care

este implicat în crearea unei rețele de legături de hidrogen. Prin urmare, noi mutații *RtPAL* au fost proiectați prin adaptarea strategiei mutaționale și crearea unei librării *RtPAL* „*PcPAL*-like” care seamănă mai mult cu situsul catalitic al *PcPAL*-ului: H137F/Q138L, H137F/Q138L/L266V, H137V/Q138L și H138V/IQ41 omologi la *wild-type*, L256V, F137V și I460V *PcPAL*. Din păcate, nu am reușit să obținem mutantul H137F/Q138L/L134A prin mutagenză situs-direcționată, în ciuda aplicării diferitelor protocele optimizate.

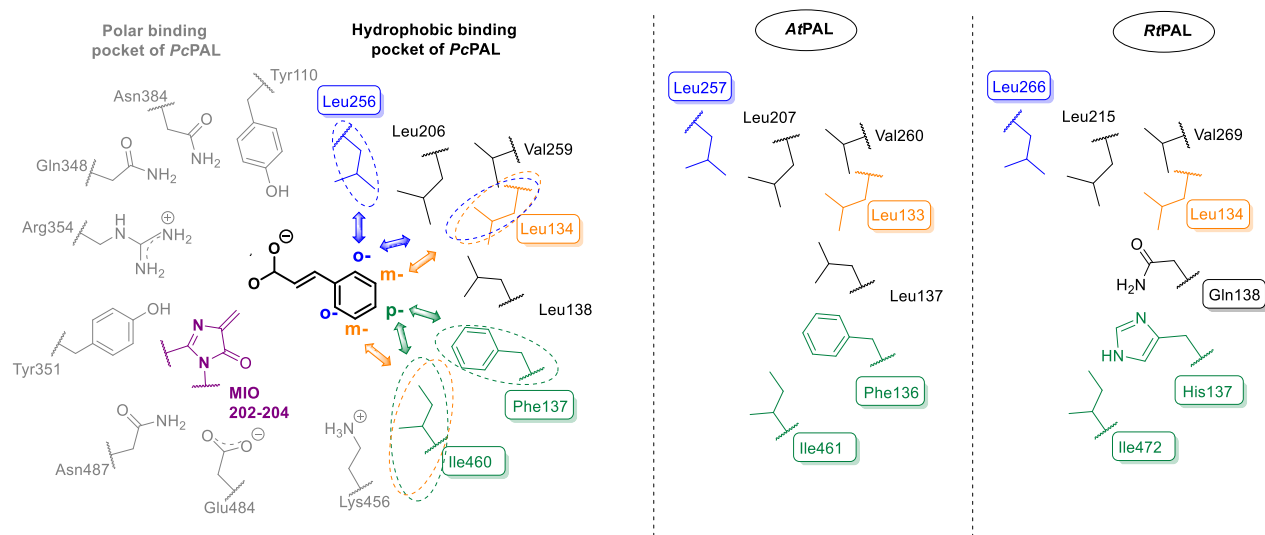


Figura III.1. Modelul situsului catalitic al *PcPAL*-ului²³ cu amplasarea substratului -acidul *trans*-cinamic-, central. Interacțiunea dintre resturile de aminoacizi din buzunarul de legare hidrofob și substituenții inelului aril este marcată cu albastru (*orto*), portocaliu (*meta*) și verde (*para*). Resturile de aminoacizi care modulează specificitatea substratului omologi în *AtPAL* și *RtPAL* sunt prezentate pe baza alinierii secvenței lor cu *PcPAL*. Reziduurile plasate în dreptunghiuri au fost înlocuite cu alanină sau valină pentru acomodarea substituenților inelului aromatic.

III.2.2 Domeniul de substrat – screening

Activitatea noilor mutații *AtPAL* și *RtPAL* a fost caracterizată prin valorile de conversie ale reacției de adădire și eliminare a amoniacului utilizând ca substraturi derivați de fenilalanină și acid *trans*-cinamic monosubstituiți, *rac*-**1a-1** și respectiv **2a-1** (**Figura III.2**). Mai mult, în cazul reacțiilor de deaminare, au fost determinați și parametri cinetici (K_M , k_{cat} și k_{cat}/K_M) pentru a oferi o perspectivă mai bună asupra efectului mutațiilor omoloage asupra performanței catalitice a enzimelor PAL de origine diferită. Mutații *PcPAL* raportați anterior²³ cu cea mai mare conversie și activități relative atât în reacțiile de adădire a amoniacului, cât și de eliminare a amoniacului, ale substraturilor cu inel aromatic substituit *rac*-**1a-1** și **2a-1** au fost utilizate ca termen de comparație.

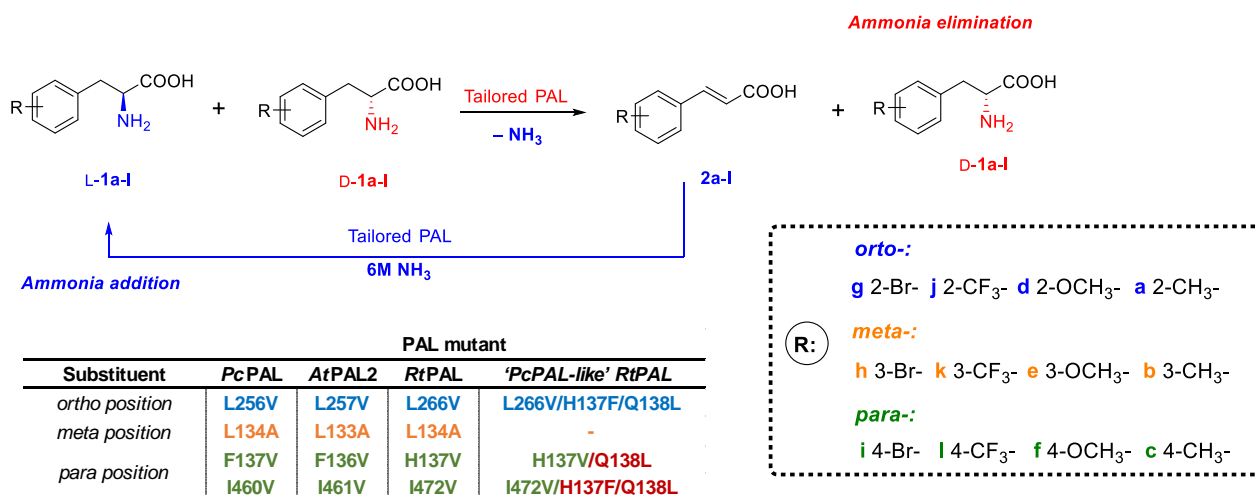


Figura III.2. Reacțiile de eliminare și de adiție a amoniacului mediate de PAL pentru substraturile *rac*-**1a-I** și **2a-I**.

III.2.2.1 Cazul 1: Substraturi cu un inel fenil orto-substituit

Biotransformările mediate de celule întregi de PAL ale substraturilor *orto*-substituite au arătat că variantele AtPAL au dat valori de conversie mai mari în comparație cu variantele PcPAL. Chiar și AtPAL nativ a avut rezultate mai bune decât PcPAL nativ, atât în reacțiile de adiție a amoniacului, cât și de eliminare a amoniacului din **2a,d,g,j** și respectiv *rac*-**1a,d,g,j**. În schimb, RtPAL *wild-type* a avut performanțe slabe în ambele căi de reacție. AtPAL L257V și L133A au prezentat eficiențe catalitice mai mari decât variantele corespunzătoare PcPAL L256V și L134A, așa cum este indicat de valorile de conversie și k_{cat} (**Tabelul III.2**).

În experimentele care utilizează AtPAL *wild-type* și varianta mutantă L257V, ambele substraturi, acidul *o*-Br-cinamic **2g** și *o*-Br-fenilalanina *rac*-**1g**, au prezentat conversii staționare mari de 94,3% și, respectiv, 47,6%, într-un interval scurt de reacție. Cu toate acestea, valoarea k_{cat} mai mare a L257V (0,435) în comparație cu AtPAL nativ (0,210) sugerează că mutația a crescut eficiența catalitică. Rezultate similare au fost observate pentru substraturile **2j** și *rac*-**1j** substituite cu *o*-CF₃, L257V prezentând o creștere de 5,5 ori a valorii k_{cat} în comparație cu varianta *wild-type*. PcPAL *wild-type* a avut, de asemenea, rezultate bune cu aceste substraturi, prezentând conversii mari de 86,6% (pentru **2g** după 6 ore) și 75,4% (pentru **2j** după 6 ore), iar conversii moderat îmbunătățite au fost obținute cu varianta L256V. Cu toate acestea, în cazul *o*-CF₃-fenilalaninei, toate PAL-urile mutante au arătat o afinitate scăzută pentru substrat în comparație cu variantele lor native, așa cum este indicat de valorile K_M ridicate, sugerând o acomodare mai puțin favorabilă a substratului în situsul catalitic modificat.

Efectul benefic al mutației L266V RtPAL a fost confirmat și de conversiile mai mari în adiția de amoniac pe **2g** ($c=94,2\%$ după 6 ore) și **2j** ($c=82,2\%$ după 24 de ore) prin comparație cu RtPAL nativ, în timp ce mutantul triplu H137F/Q138L/L266V RtPAL nu a oferit o îmbunătățire semnificativă în ceea ce privește conversiile (**Tabelul III.2**).

În timp ce substraturile substituite cu *o*-OCH₃ au fost slab transformate de toate enzimele RtPAL, reflectate și în valorile K_M ridicate și îmbunătățirea neglijabilă a k_{cat} de către mutantul L134A, AtPAL L133A a furnizat o conversie semnificativ crescută, până la 95,5% în aminarea **2d** și o creșterea de 3,5 ori a eficienței catalitice (k_{cat}). Studiile computaționale sugerează că hidrofobicitatea crescută în regiunea reziduurilor H137F și Q138L este favorabilă pentru acomodarea și transformarea

substratului datorită poziției grupării metil în apropierea ambelor reziduuri L134 și L266 (**Figura III.3**). În cazul eliminării amoniacului din *rac*-*o*-CH₃-fenilalanină *rac*-**1a**, s-a observat o creștere mai puțin semnificativă a valorilor k_{cat} și K_M pentru L266V *Rt*PAL, L256V *Pc*PAL și L257V *At*PAL în comparație cu variantele corespunzătoare *wild-type*, rezultând constante de specificitate comparabile.

Tabel III.2. Reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului din substraturile *orto*-substituie **2g,j,a,d** și *rac*-**1g,j,a,d**, catalizate de diferite variante de PAL.

Enzimă Variantă	<i>Pc</i> PAL		<i>At</i> PAL		<i>Rt</i> PAL			
	<i>wt</i>	L256V	<i>wt</i>	L257V	<i>wt</i>	L266V	H137F/Q138L/L266V	
Substrat	<i>o</i> -Br/ <i>rac</i> - 1g, 2g							
Adiție de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	86,6 (6 ore)	89,6 (6 ore)	88,6 (0,5 ore)	82,1 (0,5 ore)	4,2 (1 ore)	55,0 (1 ore)	49,7 (1 ore)	
	95,7 (24 ore)	95,7 (24 ore)	94,3 (1 ore)	92,7 (1 ore)	29,6 (6 ore)	94,2 (6 ore)	94,3 (6 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	31,9 (6 ore)	45,9 (6 ore)	36,7 (3 ore)	48,6 (3 ore)	13,5 (6 ore)	19,5 (6 ore)	24,9 (6 ore)	
	42,4 (24 ore)	50,6 (24 ore)	47,6 (6 ore)	50,3 (6 ore)	23,9 (24 ore)	41,3 (24 ore)	42,4 (24 ore)	
Parametrii cinetici	K_M (μ M)	153	110	199	184	662	254	59
	k_{cat} (s^{-1})	0,157	0,365	0,210	0,435	0,094	0,079	0,046
	k_{cat}/K_M (s^{-1}/μ M ⁻¹)	$1,02 \cdot 10^{-3}$	$3,31 \cdot 10^{-3}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$2,36 \cdot 10^{-3}$	$1,42 \cdot 10^{-4}$	$3,11 \cdot 10^{-4}$	$7,78 \cdot 10^{-4}$
Enzimă Variantă	<i>Pc</i> PAL		<i>At</i> PAL		<i>Rt</i> PAL			
	<i>wt</i>	L256V	<i>wt</i>	L257V	<i>wt</i>	L266V	H137F/Q138L/L266V	
Substrat	<i>o</i> -CF ₃ / <i>rac</i> - 1j, 2j							
Adiție de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	31,2 (3 ore)	35,2 (3 ore)	41,4 (0,5 ore)	51,1 (0,5 ore)	9,0 (6 ore)	69,2 (6 ore)	69,6 (6 ore)	
	75,4 (24 ore)	83,8 (24 ore)	86,2 (3 ore)	83,7 (3 ore)	34,8 (24 ore)	82,2 (24 ore)	83,2 (24 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	37,5 (6 ore)	49,8 (6 ore)	37,1 (0,5 ore)	50,6 (0,5 ore)	24,7 (6 ore)	34,8 (6 ore)	43,9 (6 ore)	
	49,7 (24 ore)	50,2 (24 ore)						
Parametrii cinetici	K_M (μ M)	523	2733	240	2911	92	1225	103
	k_{cat} (s^{-1})	0,042	0,148	0,032	0,177	0,004	0,019	0,117
	k_{cat}/K_M (s^{-1}/μ M ⁻¹)	$8,03 \cdot 10^{-5}$	$5,41 \cdot 10^{-5}$	$1,33 \cdot 10^{-4}$	$6,08 \cdot 10^{-5}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-5}$	$1,14 \cdot 10^{-3}$
Enzimă Variantă	<i>Pc</i> PAL		<i>At</i> PAL		<i>Rt</i> PAL			
	<i>wt</i>	L134A	<i>wt</i>	L134A	<i>wt</i>	L134A	H137F/Q138L/L266V	
Substrat	<i>o</i> -OCH ₃ / <i>rac</i> - 1d, 2d							
Adiție de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	5,5 (24 ore)	40,8 (24 ore)	19,3 (24 ore)	95,5 (24 ore)	<1 (16 ore)	2,7 (16 ore)	17,4 (16 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	<1 (24 ore)	15,6 (24 ore)	6,4 (16 ore)	45,2 (16 ore)	3,1 (16 ore)	<1 (16 ore)	19,3 (16 ore)	
Parametrii cinetici	K_M (μ M)	3351	403	4752	326	2580	6552	n,d,
	k_{cat} (s^{-1})	0,019	0,134	0,019	0,058	0,014	0,016	n,d,
	k_{cat}/K_M (s^{-1}/μ M ⁻¹)	$5,67 \cdot 10^{-6}$	$3,32 \cdot 10^{-4}$	$3,99 \cdot 10^{-6}$	$1,78 \cdot 10^{-4}$	$5,43 \cdot 10^{-6}$	$2,44 \cdot 10^{-6}$	n,d,
Enzimă	<i>Pc</i> PAL		<i>At</i> PAL		<i>Rt</i> PAL			

Variantă	<i>wt</i>	L256V	<i>wt</i>	L257V	<i>wt</i>	L266V	H137F/Q138L/266V	
Substrat	<i>o</i> -CH ₃ / <i>rac</i> -1a, 2a							
Adiție de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	61,7 (6 ore)	42,9 (6 ore)	53,8 (1 ore)	54,9 (1 ore)	30,4 (3 ore)	55,3 (3 ore)	60,7 (3 ore)	
	75,8 (24 ore)	74,1 (24 ore)	83,0 (3 ore)	83,5 (3 ore)	78,5 (24 ore)	85,7 (24 ore)	86,6 (24 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	34,4 (6 ore)	35,0 (6 ore)	32,9 (1 ore)	36,1 (1 ore)	29,5 (6 ore)	27,3 (6 ore)	20,7 (6 ore)	
			48,8 (6 ore)	47,7 (6 ore)				
Parametrii cinetici	K _M (μM)	59	128	46	n,d,	663	760	96
	k _{cat} (s ⁻¹)	0,211	0,282	0,119	0,226	0,252	0,268	0,115
	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ /μM ⁻¹)	3,58·10 ⁻³	2,20·10 ⁻³	2,58·10 ⁻³	n,d,	3,80·10 ⁻⁴	3,53·10 ⁻⁴	1,19·10 ⁻³

n.d. – nedeterminabil, în timpul cineticii enzimatice, intervalul neliniar al curbei Michaelis-Menten nu a fost obținut utilizând concentrația de substrat permisă de solubilitatea compușilor testați. # $ee_t > 99\%$ în reacțiile de adiție de amoniac

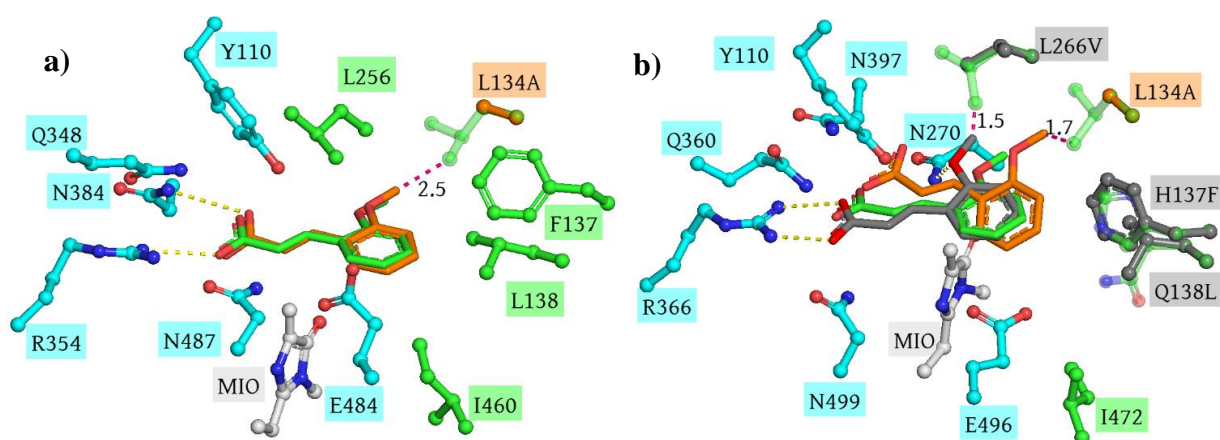


Figura III.3. Docking molecular flexibil și rigid al acidului *o*-OCH₃-cinamic **2d**: a) situl catalitic al *PcPAL* *wild-type* (verde, -7,3 kcal/mol) și L134A *PcPAL* (portocaliu, -7,7 kcal/mol); b) situl catalitic al *RtPAL* *wild-type* (verde, -4,2 kcal/mol), L134A *RtPAL* (portocaliu, -6,9 kcal/mol) și H137F/Q138L/L266V *RtPAL* (gri, -8 kcal/mol). Ciocnirile sterice între substituentul *o*-OCH₃ și lanțurile laterale ale resturilor L266, L134 din *RtPAL* și L134 din *PcPAL* sunt marcate cu linii punctate roz.

III.2.2.2 Cazul 2: Substraturi cu un inel fenil *meta*-substituit

Pentru seria *meta* de acizi cinamici **2h,k,b** și *rac*-fenilalanine *rac*-**1h,k,b**, s-a observat o performanță catalitică crescută cu *RtPAL* nativ în comparație cu *wt-PcPAL* și *wt-AtPAL*, susținută de valorile k_{cat} și valorile de conversie (**Tabelul III.3**). Substraturile **2e** și *rac*-**1e** substituie cu *m*-OCH₃ au fost cel mai bine transformate cu varianta L133A *AtPAL*, cu o conversie de 87,0% în adiția de amoniac și o conversie de 49,1% în eliminarea amoniacului. Valori similare au fost obținute cu mutantul *PcPAL* L134A ($c_{adiție} = 74,8\%$ și $c_{eliminare} = 47,7\%$ după 24 de ore), în timp ce pentru *RtPAL*, mutația echivalentă nu a îmbunătățit conversia. Aceeași tendință de conversie a fost observată pentru toate cele trei enzime PAL pentru substraturi substituie cu *m*-CH₃.

Performanța catalitică inferioară înregistrată cu I472V *RtPAL*, precum și cu varianta „*PcPAL*-like” I472V/H137F/Q138L *RtPAL*, se datorează probabil prezenței resturilor polare la pozițiile 137 (histidină) și 138 (glutamină), care joacă un rol important în acomodarea substraturilor purtând grupări atrăgătoare de electroni (-Br, -CF₃) ca substituenți. Docking-ul molecular sugerează că prezența reziduurilor polare Q138 și H137 schimbă oarecum orientarea *meta*-substituenților din

situsul catalitic de la pozițiile prezise și explorate anterior în cazul *PcPAL*-ului, către reziduu L134. Acest lucru este susținut de rezultatele experimentale, în care varianta L134A a furnizat date de conversie și cinetice care au fost în concordanță cu cele observate pentru *wt-RtPAL* pentru toate substraturile testate. Din păcate, mutageneza direcționată pe situs nereușită pentru varianta „*PcPAL*-like” L134A/H137F/Q138L nu a permis testarea efectului combinat de înlocuire a resturilor de aminoacizi polari H137, Q138 și L134 (**Figura III.4**).

Tabel III.3. Reacțiile de adădire și eliminare a amoniacului din substraturile *orto*-substituie **2h,k,e,b** și *rac*-**1h,k,e,b**, catalizate de diferite variante de PAL.

Enzimă	<i>PcPAL</i>			<i>AtPAL</i>			<i>RtPAL</i>				
Variantă	<i>wt</i>	I460V	L134A	<i>wt</i>	I461V	L133A	<i>wt</i>	I472V	L134A	H137F/Q138L/I472V	
Substrat	<i>m</i> -Br/ <i>rac</i> - 1ore, 2ore										
Adădire de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	36,1 (3 ore)	51,7 (3 ore)	51,4 (3 ore)	24,2 (0,5 ore)	76,5 (0,5 ore)	74,6 (0,5 ore)	65,6 (3 ore)	11,7 (6 ore)	73,3 (3 ore)	<1 (6 ore)	
	84,4 (24 ore)	90,8 (24 ore)	89,6 (24 ore)	77,9 (3 ore)	87,3 (3 ore)	87,5 (3 ore)*	83,8 (6 ore)	39,1 (24 ore)	88,2 (6 ore)	4,1 (24 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	31,8 (6 ore)	30,4 (6 ore)	37,2 (6 ore)	33,6 (1 ore)	26,6 (1 ore)	47,7 (1 ore)	40,0 (3 ore)	31,9 (24 ore)	37,1 (3 ore)	<1 (24 ore)	
Parametrii cinetici	K_M (μ M)	153	51	-	n,d	55	76	363	n,d	409	n,d
	k_{cat} (s^{-1})	0,095	0,154	-	0,07	0,197	0,395	0,343	n,d	0,288	n,d
	k_{cat}/K_M (s^{-1}/μ M ⁻¹)	6,21·10 ⁻⁴	3,02·10 ⁻³	-	n,d	3,58·10 ⁻³	5,19·10 ⁻³	9,45·10 ⁻⁴	n,d	7,04·10 ⁻⁴	n,d
Enzimă	<i>PcPAL</i>			<i>AtPAL</i>			<i>RtPAL</i>				
Variantă	<i>wt</i>	I460V	L134A	<i>wt</i>	I461V	L133A	<i>wt</i>	I472V	L134A	H137F/Q138L/I472V	
Substrat	<i>m</i> -CF ₃ / <i>rac</i> - 1k, 2k										
Adădire de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	1,8 (6 ore)	33,5 (6 ore)	8,9 (6 ore)	6,0 (6 ore)	73,6 (6 ore)	17,1 (6 ore)	18,0 (6 ore)	<1 (6 ore)	16,0 (6 ore)	<1 (6 ore)	
	20,2 (24 ore)	66,9 (24 ore)	12,7 (24 ore)	18,4 (24 ore)	86,6 (24 ore)	23,8 (16 ore)	40,2 (24 ore)	7,3 (24 ore)	52,6 (24 ore)	<1 (24 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	2,2 (6 ore)	26,1 (6 ore)	19,9 (6 ore)	13,4 (3 ore)	50,4 (3 ore)	35,5 (3 ore)	34,1 (6 ore)	4,8 (24 ore)	26,1 (6 ore)	<1 (24 ore)	
	7,4 (24 ore)	46,6 (24 ore)	44,0 (24 ore)								
Parametrii cinetici	K_M (μ M)	533	163	912	217	112	-	1369	2505	1573	-
	k_{cat} (s^{-1})	0,057	0,2	0,203	0,04	0,272	-	0,11	0,013	0,085	-
	k_{cat}/K_M (s^{-1}/μ M ⁻¹)	1,07·10 ⁻⁴	1,23·10 ⁻³	2,23·10 ⁻⁴	1,84·10 ⁻⁴	2,43·10 ⁻³	-	8,03·10 ⁻⁵	5,19·10 ⁻⁶	5,40·10 ⁻⁵	-
Enzimă	<i>PcPAL</i>			<i>AtPAL</i>			<i>RtPAL</i>				
Variantă	<i>wt</i>	L134A		<i>wt</i>	L134A		<i>wt</i>	L134A			
Substrat	<i>m</i> -OCH ₃ / <i>rac</i> - 1e, 2e										
Adădire de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	5,9 (3 ore)	42,0 (3 ore)		11,0 (6 ore)	87,0 (3 ore)		17,5 (24 ore)		14,0 (24 ore)		
	31,9 (24 ore)	74,8 (24 ore)		52,1 (24 ore)	87,7 (24 ore)						
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	18,9 (24 ore)	47,7 (24 ore)		47,0 (24 ore)	49,1 (24 ore)		22,6 (16 ore)		33,3 (16 ore)		

Parametrii cinetici	K_M (μM)	378	170	297	49	2971	4291
	k_{cat} (s^{-1})	0,011	0,431	0,095	0,213	0,078	0,07
	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}^{-1}$)	$2,91 \cdot 10^{-5}$	$2,53 \cdot 10^{-3}$	$3,19 \cdot 10^{-4}$	$4,35 \cdot 10^{-3}$	$2,62 \cdot 10^{-5}$	$1,63 \cdot 10^{-5}$
Enzimă	<i>PcPAL</i>		<i>AtPAL</i>		<i>RtPAL</i>		
Variantă	<i>wt</i>	L134A	<i>wt</i>	L134A	<i>wt</i>	L134A	
Substrat	<i>m</i> -CH ₃ / <i>rac</i> - 1b , 2b						
Adiție de amoniac [#] (c%, timp de reacție)	2,3 (24 ore)	26,4 (24 ore)	7,4 (6 ore)	74,8 (3 ore)	23,7 (16 ore)	80,2 (24 ore)	25,7 (16 ore)
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	10,8 (24 ore)	28,9 (24 ore)	22,9 (6 ore)	45,5 (6 ore)	45,0 (16 ore)	50,5 (16 ore)	50,5 (16 ore)
Parametrii cinetici	K_M (μM)	55	115	n.a.	63	333	338
	k_{cat} (s^{-1})	0,014	0,1	n.a.	0,113	0,153	0,146
	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}^{-1}$)	$2,54 \cdot 10^{-4}$	$8,69 \cdot 10^{-4}$	n.a.	$1,79 \cdot 10^{-3}$	$4,59 \cdot 10^{-4}$	$4,32 \cdot 10^{-4}$

n.d. – nedeterminabil, în timpul cineticii enzimatice, intervalul nelinier al curbei Michaelis-Menten nu a fost obținut utilizând concentrația de substrat permisă de solubilitatea compușilor testați; n.a. – nici o activitate detectată; “-” – nu a fost făcută nici o măsurătoare

[#] $ee_t > 99\%$ în reacțiile de adiție de amoniac, cu excepția L-**1h** ($ee = 93,6\%$) produs în cadrul reacției de adiție a amoniacului pe **2h** catalizată de L134A *AtPAL*

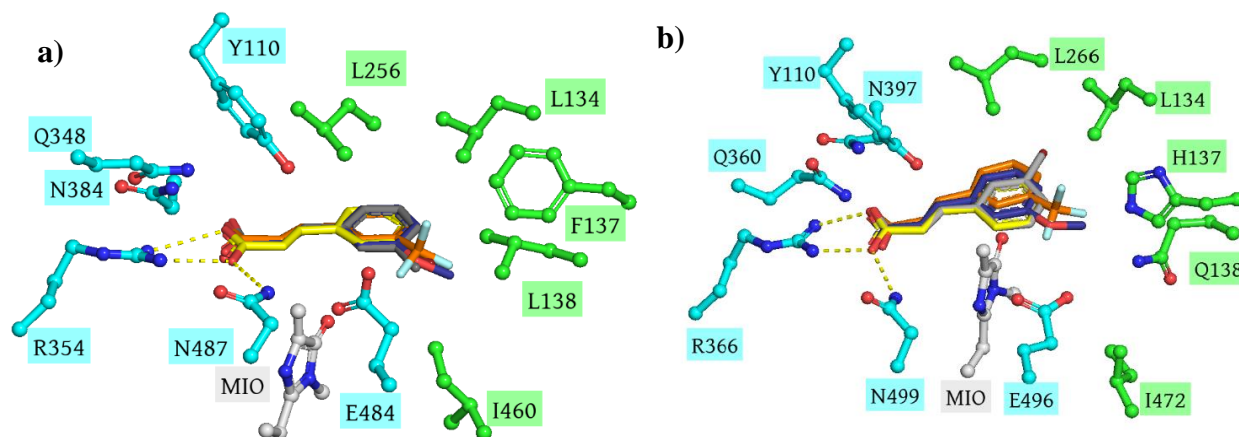


Figura III.4. Acomodarea substraturilor *meta*-substituite acid *m*-Br-cinamic **2h** (galben), acid *m*-CF₃-cinamic **2k** (portocaliu), acid *m*-OCH₃-cinamic **2e** (albastru) și acid *m*-CH₃-cinamic **2b** (gri) în situsul catalitic al a) *PcPAL* wild-type și b) *RtPAL* wild-type. Resturile de aminoacizi din regiunea de legare hidrofobă sunt marcate cu verde, în timp ce resturile din regiunea de legare polară sunt marcate cu cyan.

III.2.2.3 Cazul 3: Substraturi cu inel fenil *para*-substituit

Conversiile scăzute obținute cu *PcPAL* nativ în cazul substraturilor *p*-substituite (**Tabelul III.4**) se datorează impedimentelor sterice dintre substituentul din poziția *para* și resturile de aminoacizi din situsul activ, așa cum este descris în raportul nostru anterior²³. Acest lucru s-a dovedit a fi adevărat în cazul *RtPAL* nativ, dar nu și în cazul *AtPAL*-ului, deși acesta are o identitate de secvență de 81% în comparație cu PAL din *Petroselinum crispum*. *AtPAL* wild-type a furnizat o valoare maximă de conversie în cazul eliminării amoniacului din *p*-Br- și *p*-CH₃-fenilalanina *rac*-**1i,c**

valoare maximă de conversie în cazul eliminării amoniacului din *p*-Br- și *p*-CH₃-fenilalanina *rac*-**1i,c** (c~50% după 6 și, respectiv, 16 ore) și o conversie moderată în cazul *p*-CF₃-fenilalanina *rac*-**1l** (c=40% după 6 ore). În cazul substraturilor substituite cu -OCH₃, *wt-Pc/RtPAL* s-au dovedit a fi ineficiente, în timp ce *wt-AtPAL* a înregistrat un comportament similar.

Mutații I461V și F136V *AtPAL* au prezentat valori mari de conversie, prezentând parametri cinetici crescuți în reacțiile de eliminare a amoniacului (**Tabelul III.4**). Cu toate acestea, F136V *AtPAL*, ca și omologul său din *PcPAL*, au afectat enantioselectivitatea reacțiilor de aminare. Biotransformarea bazată pe I461V *AtPAL* a produs valori *ee* mai mari în comparație cu F136V *AtPAL*.

În general, *RtPAL* nativ s-a dovedit a fi ineficient în transformarea substraturilor *para*-substituite, iar mutații precum I472V sau „*PcPAL*-like” H137V/Q138L/I472V *RtPAL* nu au îmbunătățit performanța catalitică. Prezența rezidului polar Gln la poziția 138, aproape de V137, poate fi responsabil pentru performanța catalitică slabă a H137V. Cu toate acestea, varianta H137V/Q138L *RtPAL* a arătat o eficiență catalitică îmbunătățită față de toate substraturile în comparație cu varianta singulară H137V, iar valorile de conversie au fost similare cu cele observate cu echivalenții *AtPAL* și *PcPAL*. Datele experimentale au fost susținute de rezultate computaționale, indicând o mai bună acomodare a substraturilor *para*-substituite în situsul catalitic al mutantului H137V/Q138L, comparativ cu *RtPAL* nativ (**Figura III.5**)

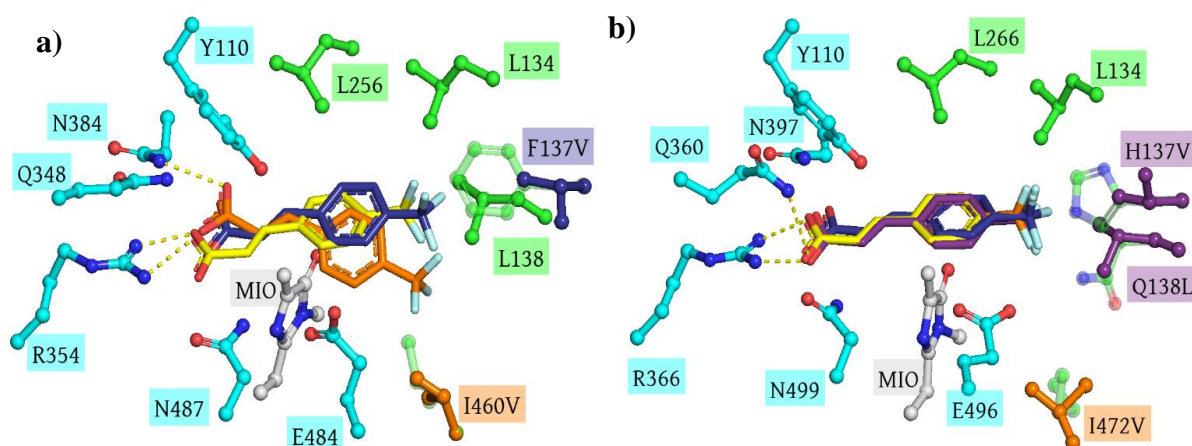


Figure III.5. Acomodarea acidului *m*-CF₃-cinamic **2k** în situsul catalitic al **a)** *PcPAL* *wild-type* și **b)** *RtPAL* *wild-type*, cu orientare activă marcată cu galben pentru *wt-PcPAL* (-4,8 kcal/mol) și *wt-RtPAL* (-5,5 kcal/mol), portocaliu pentru I460V *PcPAL* (-6,4 kcal/mol) și I472V *RtPAL* (-5,5 kcal/mol), albastru pentru F137V *PcPAL* (-8,9 kcal/mol) și H137V *RtPAL* (-6,9 kcal/mol), violet pentru H137V/Q138L *RtPAL* (-7,5 kcal/mol). Resturile de aminoacizi din regiunea de legare hidrofobă sunt marcate cu verde, în timp ce resturile din regiunea de legare polară sunt marcate cu cyan.

Tabel III.4. Reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului din substraturile *orto*-substituite **2i,l,f,c** și *rac*-**1i,l,f,c**, catalizate de diferite variante de PAL.

Enzimă	<i>PcPAL</i>			<i>AtPAL</i>			<i>RtPAL</i>				
	<i>wt</i>	I460V	F137V	<i>wt</i>	I461V	F136V	<i>wt</i>	I472V	H137V	H137F/ Q138L/I 472V	H137V/ Q138L
Substrat	<i>p</i> -Br/ <i>rac</i> - 1i, 2i										
	7,1 (24 ore)	58,8 (24 ore)	71,6 (24 ore)*	84,7 (16 ore)	90,5 (16 ore)	89,4 (16 ore)*	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	18,5 (16 ore)	<1 (16 ore)	84,3 (16 ore)

Adiție de amoniac[#] (c%, timp de reacție)												
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	49,9 (24 ore)	51,5 (24 ore)	59,8 (24 ore)**	51,5 (6 ore)	53,4 (6 ore)	61,8 (6 ore)**	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	23,1 (16 ore)	<1 (16 ore)	50,3 (16 ore)	
Parametrii cinetici	K_M (μM)	269	71	-	73	61	-	621	2120	-	n,a,	n,a,
	k_{cat} (s⁻¹)	0,165	0,259	-	0,085	0,245	-	0,005	0,008	-	n,a,	n,a,
	k_{cat}/K_M (s⁻¹/μM⁻¹)	6,13·10 ⁻⁴	3,65·10 ⁻³	-	1,16·10 ⁻³	4,01·10 ⁻³	-	8,05·10 ⁻⁶	3,77·10 ⁻⁶	-	n,a,	n,a,
Enzimă	PcPAL			AtPAL			RtPAL					
VARIANTĂ	<i>wt</i>	I460V	F137V	<i>wt</i>	I461V	F136V	<i>wt</i>	I472V	H137V	H137F/ Q138L/ I472V	H137V/ Q138L	
Substrat	<i>p</i>-CF₃/ <i>rac</i>-11, 2i											
Adiție de amoniac[#] (c%, timp de reacție)	5,7 (16 ore)	32,0 (6 ore)	45,9 (3 ore)	48,9 (16 ore)	36,1 (3 ore)	92,8 (6 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	10,5 (16 ore)	<1 (16 ore)	82,8 (16 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	9,3 (24 ore)	37,3 (24 ore)	50,2 (24 ore)**	40,0 (6 ore)	50,7 (6 ore)	80,8 (6 ore)**	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	7,9 (16 ore)	<1 (16 ore)	50,8 (16 ore)	
Parametrii cinetici	K_M (μM)	2490	901	151	1467	275	-	6381	n,a,	3231	n,a,	n,a,
	k_{cat} (s⁻¹)	0,25	0,55	0,42	0,127	0,428	-	0,004	n,a,	0,032	n,a,	n,a,
	k_{cat}/K_M (s⁻¹/μM⁻¹)	1,00·10 ⁻⁴	6,10·10 ⁻⁴	2,78·10 ⁻³	8,66·10 ⁻⁵	1,55·10 ⁻³	-	6,27·10 ⁻⁷	n,a,	9,90·10 ⁻⁴	n,a,	n,a,
Enzimă	PcPAL			AtPAL			RtPAL					
VARIANTĂ	<i>wt</i>	I460V	F137V	<i>wt</i>	I461V	F136V	<i>wt</i>	I472V	H137V	H137F/ Q138L/ I472V	H137V/ Q138L	
Substrat	<i>p</i>-OCH₃/ <i>rac</i>-1f, 2f											
Adiție de amoniac[#] (c%, timp de reacție)	<1 (24 ore)	11,8 (24 ore)	4,1 (24 ore)	<1 (24 ore)	24,5 (24 ore)	23,7 (24 ore)*	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	16,9 (16 ore)	
Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)	<1 (24 ore)	17,0 (24 ore)	15,4 (24 ore)	14,1 (16 ore)	42,0 (16 ore)	38,4 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	25,3 (16 ore)	
Parametrii cinetici	K_M (μM)	1858	265	-	1048	132	-	3219	n,d,	n,d,	-	-
	k_{cat} (s⁻¹)	0,009	0,10	-	0,007	0,112	-	0,036	n,d,	n,d,	-	-
	k_{cat}/K_M (s⁻¹/μM⁻¹)	4,84·10 ⁻⁶	3,88·10 ⁻⁴	-	6,68·10 ⁻⁶	8,48·10 ⁻⁴	-	1,12·10 ⁻⁵	n,d,	n,d,	-	-
Enzimă	PcPAL			AtPAL			RtPAL					
VARIANTĂ	<i>wt</i>	I460V	F137V	<i>wt</i>	I461V	F136V	<i>wt</i>	I472V	H137V	H137F/ Q138L/ I472V	H137V/ Q138L	
Substrat	<i>p</i>-CH₃/ <i>rac</i>-1c, 2c											
Adiție de amoniac[#] (c%, timp de reacție)	1,7 (6 ore)	13,5 (6 ore)	16,6 (24 ore)	3,8 (6 ore)	28,6 (3 ore)	29,2 (6 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	61,0 (16 ore)	

Eliminare de amoniac (c%, timp de reacție)		6,0 (16 ore)	10,7 (16 ore)	22,1 (16 ore)	50,0 (16 ore)	50,1 (16 ore)	36,2 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	<1 (16 ore)	9,6 (16 ore)
Parametrii cinetici	K_M (μM)	208	107	-	191	144	-	9902	n,a,	7080	n,a,	n,a,
	k_{cat} (s^{-1})	0,026	0,092	-	0,018	0,1	-	0,003	n,a,	0,003	n,a,	n,a,
	k_{cat}/K_M	1,25·	8,59·	-	9,42·	6,94·	-	3,03·	n,a,	4,24·	n,a,	n,a,
	($s^{-1}/\mu M^{-1}$)	10^{-4}	10^{-4}	-	10^{-5}	10^{-4}	-	10^{-7}	n,a,	10^{-7}	n,a,	n,a,

n.d. – nedeterminabil, în timpul cineticii enzimatice intervalul neliniar al curbei Michaelis-Menten nu a fost obținut folosind concentrația de substrat permisă de solubilitatea compușilor testați; n.a. – nicio activitate detectată; „-” – nu a fost efectuată nicio determinare/măsurare;

$ee_i > 99\%$ în reacțiile de adiție de amoniac, cu excepția cazului de * 1. În cazul **2i**: L-**1i** cu $ee = 97\%$ (*PcPAL* F137V); L-**1i** cu $ee = 93\%$ (*AtPAL* F136V); 2. în cazul **2l**: L-**1l** cu $ee = 82\%$ (*PcPAL* F137V); L-**1l** cu $ee = 83\%$ (*AtPAL* F136V); 3. în cazul **2f**: L-**1f** cu $ee = 97\%$ (*AtPAL* F136V); ** în timpul eliminărilor de amoniac de tip rezoluție cinetică în cazul enantioselectivității mari valorile maxime de conversie ale *rac*-fenilalaninelor sunt de 50%, conversiile depășind această valoare, susțin enantioselectivitatea scăzută a procesului.

III.3 Concluzii

În acest studiu, ne-am propus să dezvoltăm o strategie generală de proiectare rațională pentru crearea de PAL-uri adaptate substratului de diverse origini și domenii de substrat. Pentru a realiza acest lucru, am utilizat strategia mutațională dezvoltată pentru PAL din *Petroselinum crispum* pe *AtPAL* și *RtPAL*, care sunt PAL-uri bine caracterizate, cu diferite niveluri de identitate de secvență față de *PcPAL*. *RtPAL*, despre care se știe că are o activitate dublă PAL/TAL, a arătat o specificitate distinctă de substrat în comparație cu *wt-Pc/AtPAL*. Strategia mutațională aplicată pe *RtPAL*, care a inclus înlocuirea reziduiului Q138 lângă poziția 137 cu reziduuri hidrofobe, s-a dovedit că îmbunătățește semnificativ proprietățile catalitice ale H137V *RtPAL*, făcându-l o variantă „*PcPAL*-like”. Acest lucru susține ideea că pot fi făcute mutații suplimentare pe baza unor considerații raționale pentru a îmbunătăți în continuare proprietățile enzimei. În cadrul variantelor noi de PAL, variantele *AtPAL* (cu unele excepții) au depășit omologii *PcPAL* corespunzători în ceea ce privește conversia și eficiența catalitică, chiar dacă au un nivel ridicat de identitate de 81%.

Studiul demonstrează că abordările mutaționale pot fi utilizate pentru a îmbunătăți eficiența catalitică a variantelor de fenilalanin amoniac-liaze (PAL) față de substraturi nenaturale cu modele de substituție diferite. Rezultatele sugerează că această abordare este aplicabilă în PAL-uri de diferite origini și poate fi rafinată în continuare prin modificări raționale bazate pe alinierea de secvențe. În general, constatările contribuie la dezvoltarea unei strategii generale de proiectare rațională pentru clasele PAL (E.C. 4.3.1.24) și PAL/TAL (E.C. 4.3.1.25) și oferă o bază pentru cercetările viitoare în acest domeniu.

CAPITOLUL IV. Producție proiectată, scalabilă, de L-fenilalanine optic pure folosind fenilalanin amoniac-liaza din *Arabidopsis thaliana*

IV.1 Background (date din literatură)

IV.2 Rezultate și discuții

Bazându-ne pe rezultatele anterioare⁴², am evaluat eficiența catalitică îmbunătățită a variantelor *At*PAL L257V, L133A și I461V în comparație cu echivalenții lor din *Pc*PAL prin efectuarea aminării mai multor acizi cinamici monosubstituiți **2a-l**, în aceleași condiții optime raportate pentru adăziile de amoniac catalizate de *Pc*PAL⁴³ (**Figura IV.1**). Evaluarea noastră a inclus monitorizarea conversiilor staționare finale și a valorilor *ee* ale produșilor (**L-1a-l**), precum și a impactului concentrației substratului asupra valorilor de conversie, deoarece inhibiția substratului a fost observată anterior în unele variante de *Pc*PAL⁴³.

În încercarea noastră de a dezvolta un proces biocatalitic optimizat la scară preparativă pentru producerea de aminoacizi nenaturali enantiopuri de valoare industrială ridicată, am evaluat efectul mai multor parametri asupra timpului de reacție și a valorilor de conversie. Acești parametri includ mediul de reacție/sursa de amoniac, raportul biocatalizator: substrat, temperatura, concentrația substratului și tipul de biocatalizator utilizat. Scopul a fost identificarea condițiilor optime pentru realizarea unui proces de biotransformare extrem de îmbunătățit și sustenabil din punct de vedere al mediului.

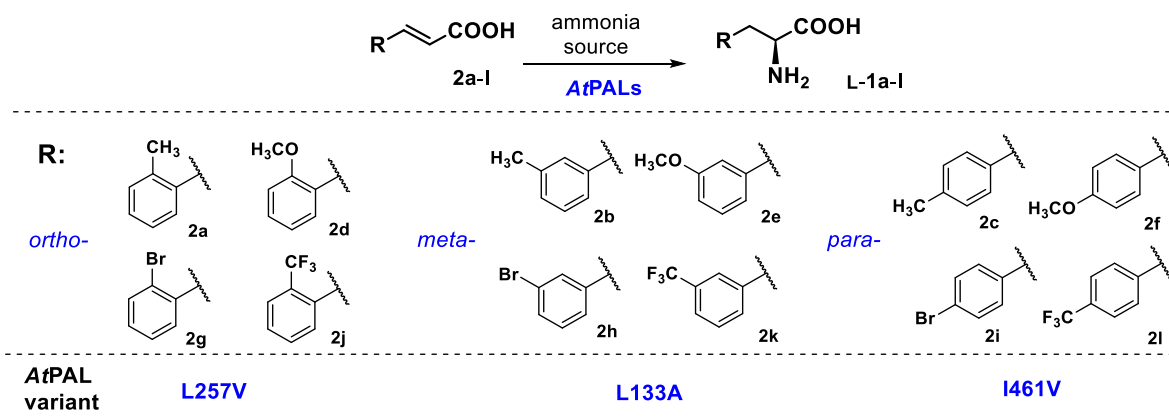


Figura IV.1. Reacțiile de adăziie a amoniacului catalizate de *At*PAL pe acizii cinamici **2a-l** substituiți în pozițiile *ortho*-, *meta*-, *para*- cu grupări electron-donoare și electron-acceptoare.

IV.2.1 Optimizarea reacțiilor de aminare mediate de *At*PAL

IV.2.1.1 Efectul concentrației de substrat

Efectul concentrației substratului asupra performanței catalitice a variantelor mutante *At*PAL modificate (L133A, L257V și I461V) a fost testat în adăziia de amoniac pe toți analogii acidului cinamic **2a-l** în limita solubilității acestora timp de 48 de ore. Profilurile de conversie în timp sunt prezentate în **Figurile IV.2-4**.

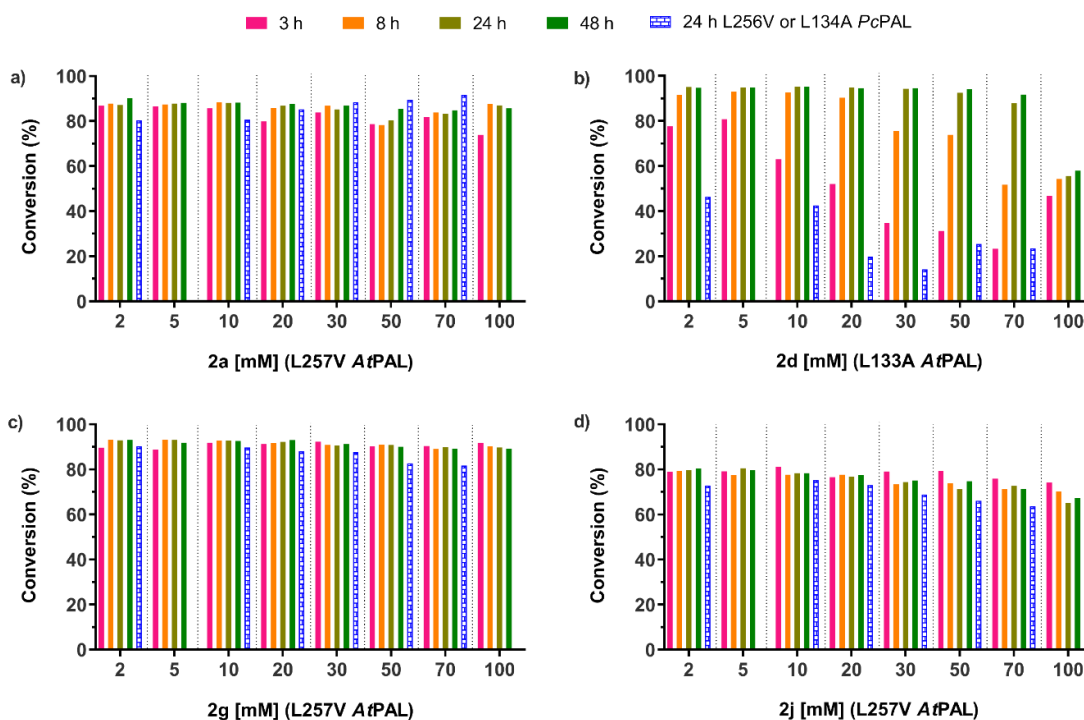


Figura IV.2. Profiluri de conversie în timp pentru reacțiile de adiție a amoniacului pe a) acidul *o*-CH₃-cinamic **2a** b) acidul *o*-OCH₃-cinamic **2d** c) acidul *o*-Br-cinamic **2g** și d) acidul *o*-CF₃-cinamic **2j** utilizând variantele AtfPAL corespunzătoare. Pentru comparație, valorile de conversie date de varianta corespunzătoare PcPAL L256V sau L134A după 24 de ore sunt marcate cu model de cărămidă albastră [hatched].

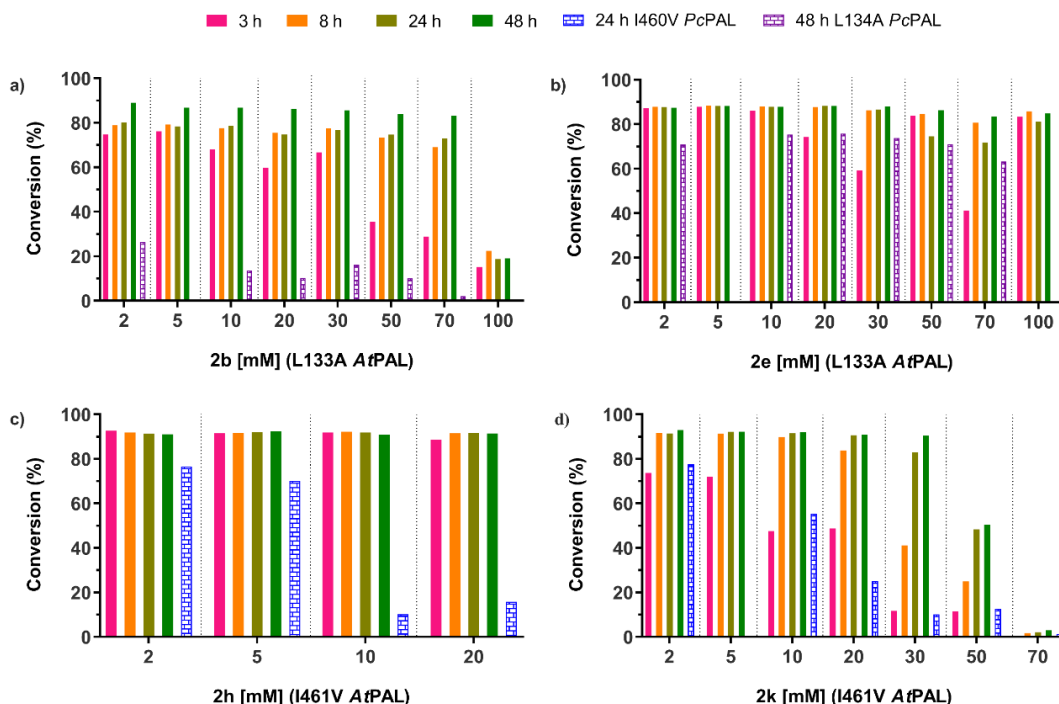


Figura IV.3. Profiluri de conversie în timp pentru reacțiile de adiție a amoniacului pe a) acidul *m*-CH₃-cinamic **2b** b) acidul *m*-OCH₃-cinamic **2e** c) acidul *m*-Br-cinamic **2h** și d) acidul *m*-CF₃-cinamic **2k** utilizând variantele AtfPAL corespunzătoare. Pentru comparație, valorile de conversie date de varianta corespunzătoare PcPAL sunt marcate cu model de cărămidă albastră [hatched] (valori înregistrate după 24 ore cu I460V) și mov [purple hatched] (valori înregistrate după 48 ore cu L134A).

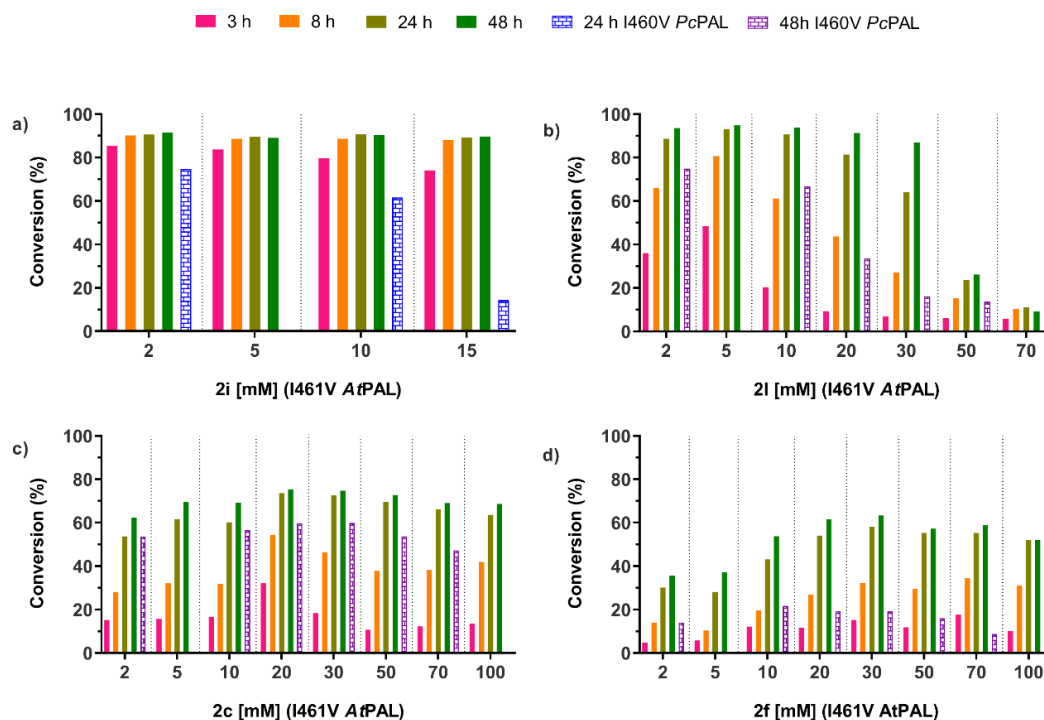


Figura IV.4. Profiluri de conversie în timp pentru reacțiile de adiție a amoniacului pe a) acidul *p*-CH₃-cinamic **2c** b) acidul *p*-OCH₃-cinamic **2f** c) acidul *p*-Br-cinamic **2i** și d) acidul *p*-CF₃-cinamic **2l** utilizând variantele AtPAL corespunzătoare. Pentru comparație, valorile de conversie date de varianta corespunzătoare PcPAL sunt marcate cu model de cărămidă albastră (valori înregistrate după 24 ore cu I460V) și mov (valori înregistrate după 48 ore cu I460V).

Studiul nostru anterior⁴³ a arătat că, pe măsură ce concentrațiile de substrat au crescut, progresia reacției catalizată de varianta PcPAL L256V, L134A sau I460V a fost încetinită semnificativ (cu unele excepții), implicând apariția inhibiției de substrat. Pe de altă parte, variantele corespunzătoare AtPAL L257V, L133A și I461V au prezentat performanțe robuste, atingând conversii staționare ridicate chiar și la concentrații de substrat apropiate de valoarea relevantă industrial de 100 mM (după cum este ilustrat în **Figurile IV.2** până la **IV.4**).

IV.2.1.1.1 AtPAL versus PcPAL

Reacțiile de adiție de amoniac efectuate cu mutații AtPAL au dus la conversii mari și au furnizat L-**1a-l** cu excese enantiomeric (*ee_L*) excelente la timpuri de reacție semnificativ mai scurți comparativ cu cei observați în cazul variantelor PcPAL în aceleași condiții optime. Concentrațiile optime de substrat au fost selectate pe baza celui mai scurt timp de reacție care a condus la cele mai mari valori de *ee_L* și de conversie (**Tabelul IV.1**).

Raportate anterior⁴³, reacțiile de adiție de amoniac pe **2b** și **2f** folosind variante mutante PcPAL au înregistrat conversii staționare scăzute de 26,4% și, respectiv, 19,1%, în timp ce utilizarea mutațiilor AtPAL a dus la conversii mult mai mari de 86,3% în cazul **2b** și 63,4% în cazul **2f**, după 48 de ore de reacție. În plus, variantele AtPAL L257V, L133A și I461V au arătat o capacitate operațională crescută la concentrații semnificativ mai mari de substrat în toate cazurile, comparativ cu omologii PcPAL corespunzători. Rezultatele obținute din reacțiile de hidroaminare a derivaților acidului cinamic **2a**, **2g**, **2j** și **2h** demonstrează capacitatea de a atinge o conversie staționară maximă

la concentrații mari de substrat de 100 mM (**Tabelul IV.1**). Acesta este un factor critic în ceea ce privește fezabilitatea industrială și evidențiază potențialul acestui sistem biocatalitic în aplicații practice.

Tabel IV.1. Valori de conversie și exces enantiomeric (ee_L) obținute în reacțiile de aminare a **2a-1** utilizând variante mutante de *At*PAL. Date comparative înregistrate cu variantele *Pc*PAL⁴³ sunt de asemenea prezentate.

Substrat	Substituent	Varianta <i>Pc</i> PAL	[S] (mM)	Timp (ore)	c (%)	ee_L (%)	Varianta <i>At</i> PAL	[S] (mM)	Timp (ore)	c (%)	ee_L (%)
2a	<i>o</i> -CH ₃	L256V	70	24	91.5	>99	L257V	100	8	87.6	>99
2b	<i>m</i> -CH ₃	L134A	2	48	26.4	>99	L133A	20	48	86.3	>99
2c	<i>p</i> -CH ₃	I460V	30	48	59.9	>99	I461V	30	24	72.6	>99
2d	<i>o</i> -OCH ₃	L134A	10	24	42.5	>99	L133A	50	24	92.5	>99
2e	<i>m</i> -OCH ₃	L134A	50	48	71.0	>99	L133A	100	3	83.3	>99
2f	<i>p</i> -OCH ₃	I460V	30	48	19.1	>99	I461V	30	48	63.4	>99
2g	<i>o</i> -Br	L256V	70	24	81.6	>99	L257V	100	3	91.7	>99
2h	<i>m</i> -Br	I460V	5	24	70.1	98.3	I461V	20	8	91.5	93.4
2i	<i>p</i> -Br	I460V	10	24	61.6	>99	I461V	15	6	88.1	>99
2j	<i>o</i> -CF ₃	L256V	20	24	73.0	>99	L257V	100	3	75.9	>99
2k	<i>m</i> -CF ₃	I460V	2	24	77.5	>99	I461V	10	8	89.9	>99
2l	<i>p</i> -CF ₃	I460V	2	48	42.2	>99	I461V	20	48	91.3	>99

Condiții de reacție pentru aminarea **2a-1**: testele au fost efectuate în tuburi de polipropilenă de 1,5 ml la 30 °C, 250 rpm, în 500 μL volum de reacție, utilizând 2-100 mM concentrație de substrat, un raport (OD₆₀₀: mM) de 1 și 6 M NH₄OH pH 10 (ajustat cu CO₂) ca mediu de reacție.

IV.2.1.1.2 Inhibiția de produs

După cum s-a raportat anterior⁴³, varianta I460V *Pc*PAL a dat valori scăzute de conversie staționară de 26,4% și 19,1% în timpul reacțiilor de adiție cu amoniac pe acidul *m*-metil-cinamic **2b** și, respectiv, acidul *p*-metoxi-cinamic **2f**, datorită inhibiției de produs. În comparație, varianta I461V *At*PAL a prezentat valori de conversie staționară semnificativ mai mari de 86,3% în cazul **2b** și 63,4% în cazul **2f**, după același timp de reacție de 48 de ore (**Figura IV.5**).

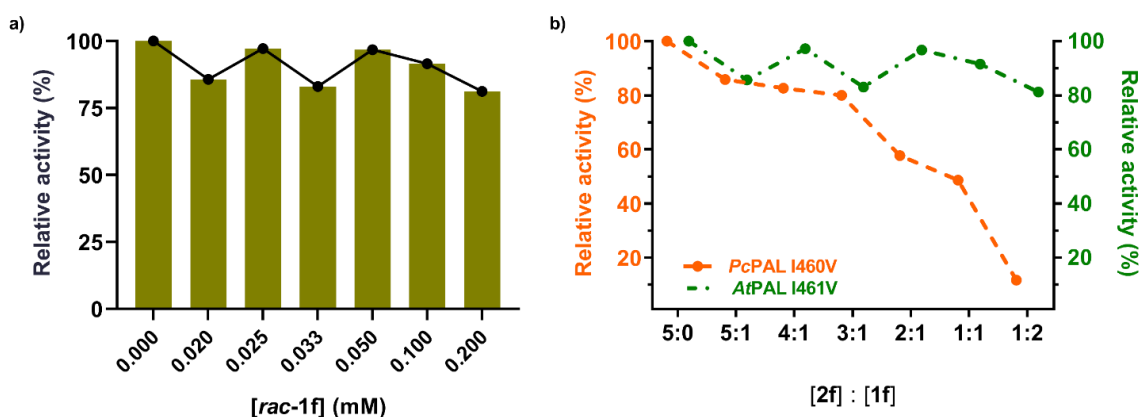


Figura IV.5. a) Influența creșterii concentrației de produs asupra activității relative a adiției de amoniac pe acidul *p*-CH₃O-cinamic **2f** utilizând enzima purificată I461V *At*PAL; b) Depleția comparativă a acidului *p*-CH₃O-cinamic **2f**, la diferite rapoarte substrat: produs, utilizând forme purificate ale variantelor I461V *At*PAL și I460V *Pc*PAL.

IV.2.1.2 Efectul formei biocatalizatorului

Pentru a compara performanța catalitică a celulelor întregi umede PAL cu enzimele izolate, biotransformările derivaților de acid cinamic *para*-substituiți **2c**, **2f**, **2i** și **2l** (aleși ca substraturi model) au fost efectuate folosind variantele I461V și F136V *At*PAL, respective echivalenții lor I460V și F137V *Pc*PAL, în ambele forme (**Figura IV.6**). Această abordare și-a propus să evalueze amploarea diferențelor în eficiența biotransformării dintre biocatalizatorii PAL ca celule întregi și enzime purificate.

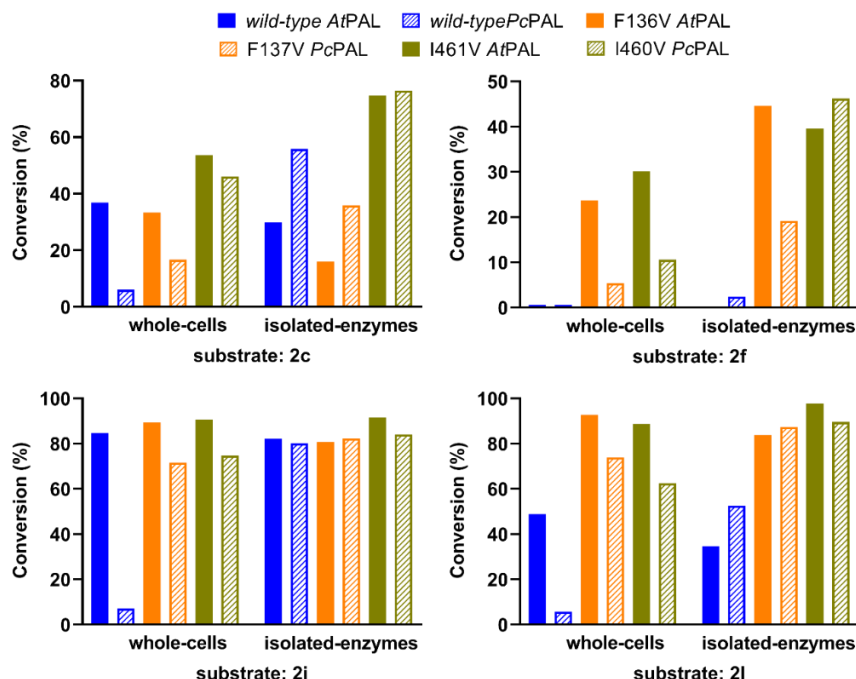


Figura IV.6. Valorile de conversie ale hidroaminării derivaților de acid cinamic *para*-substituiți **2c**, **2f**, **2i** și **2l** utilizând biocatalizatorii PAL ca celule întregi umede și enzime izolate.

Spre deosebire de *Pc*PAL, care a dat conversii semnificativ mai mari folosind enzime purificate decât celule întregi (**Figura IV.6**), *At*PAL nu a prezentat o tendință similară. Mai exact, doar forma purificată a variantei I461V a dus la conversii superioare, în special în cazul substraturilor purtătoare de grupari electron-donoare, **2f** și **2c**, unde s-a înregistrat o creștere de 1,3 și, respectiv, de 1,4 ori în comparație cu valorile de conversie furnizate folosind celule întregi. Biocatalizatorii PAL ca celule întregi liofilizate au fost de asemenea evaluați, iar celulele întregi umede ale variantei *At*PAL I461V au demonstrat o eficiență catalitică superioară prin conversie mai mare (91%) comparativ cu forma liofilizată (80,5%). (**Tabelul IV.2**). Pe baza costurilor de producție mai mici pentru biocatalizatorii PAL ca celule întregi și a valorilor competitive de conversie obținute, *At*PAL-urile sub formă de celule întregi au fost selectate ca forma de biocatalizator optimă pentru reacțiile la scară preparativă.

Tabel IV.2. Valori de conversie comparative obținute pentru **L-1h** în reacțiile de aminare utilizând celule întregi liofilizate sau umede *At*PAL I461.

I461V <i>At</i> PAL		Timp (ore)	c (%)
celule întregi umede	OD ₆₀₀ ~100		
		48	88,5
celule liofilizate	20 mg/mL	24	80,5
		48	80,0

Condiții de reacție: testele au fost efectuate în tuburi de polipropilenă de 1,5 ml la 30 °C, 250 rpm, în 500 μL volum de reacție, timp de 24-48 ore utilizând 100 mM concentrație de substrat (**2h**) și 6 M NH₄OH pH 10 (ajustat cu CO₂) ca mediu de reacție.

IV.2.1.3 Efectul densității celulare

Pentru a confirma că raportul biocatalizator: substrat optim pentru *PcPAL*⁴³, este, de asemenea, optim și pentru biotransformările mediate de *AtPAL*, am efectuat experimente suplimentare care au implicat varierea densităților de celule întregi (OD_{600} de ~ 1, 2, 4, 8 care corespund cu ~ 6, 12, 24 și, respectiv, 48 mg/mL celule umede), menținând în același timp o concentrație fixă de substrat de 2 mM pentru substraturile model **2j**, **2e** și **2i** (**Figura IV.7**).

În toate cazurile, creșterea densității celulare ($OD_{600} > 2$) nu a îmbunătățit semnificativ valorile de conversie, în timp ce utilizarea unui $OD_{600} \geq 4$ a dus la scăderea valorilor de exces enantiomeric pentru L-**1j** (de la >99% la 88,2%) și L- **1e** (de la >99% la 96,0%) (**Figura IV.7**). Prin urmare, rezultatele susțin că raportul optim biocatalizator: substrat utilizat pentru biotransformările mediate de *PcPAL* este optim și pentru reacțiile de aminare catalizate de *AtPAL*.

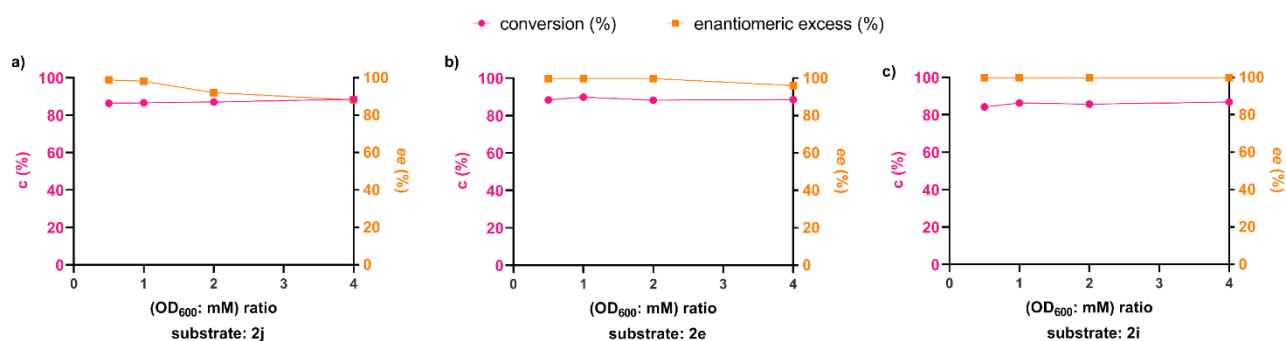


Figura IV.7. Valori de conversie și exces enantiomeric (ee_L) obținute la creșterea densității celulare la hidroaminarea a) acidului *o*-CF₃-cinamic **2j**, b) acidului *m*-OCH₃-cinamic **2e** și c) acidului *p*-Br-cinamic **2i**.

IV.2.1.4 Efectul sursei de amoniac/mediului de reacție

În rapoartele noastre anterioare⁴³, am demonstrat că conversiile reacțiilor de aminare pe bază de *PcPAL* sunt influențate semnificativ de mediul de reacție. În acest studiu, influența soluției tampon utilizat și ca sursă de amoniac, asupra conversiei și excesului enantiomeric al reacțiilor de hidroaminare catalizate de *AtPAL* a fost investigată folosind doi derivați ai acidului cinamic *para*-substituiți, acidul *p*-metil-cinamic **2c** și acid *p*-trifluormetil-cinamic **2l** ca substraturi model (**Figura IV.8**).

Adițiile de amoniac au fost efectuate la o concentrație fixă de substrat de 2 mM și utilizând *AtPAL* I461V cu celule întregi cu densități celulare de $OD_{600} \sim 2$ (~6 mg celule umede/mL), variind diferite concentrații de soluții tampon de amoniac (2, 4, 6 M NH₄OH pH 9,5 ajustat cu CO₂) și soluții tampon de carbamat de amoniu (2, 4, 6 M NH₄[H₂NCO₂] pH ~9,5 fără ajustare). S-au obținut conversii mai mari cu 6 M NH₄OH (66,3% pentru **2c** și 84,1% pentru **2l**) sau carbamat de amoniu 3-6 M pentru ambele substraturi (**Figura IV.8**). Mai mult, spre deosebire de varianta *PcPAL* I460V⁴³, celulele întregi de *AtPAL* I461V au prezentat o stabilitate operațională mai mare în prezența concentrațiilor mari de amoniac ($c > 74\%$ pentru **2c** și $c > 92\%$ pentru **2l**).

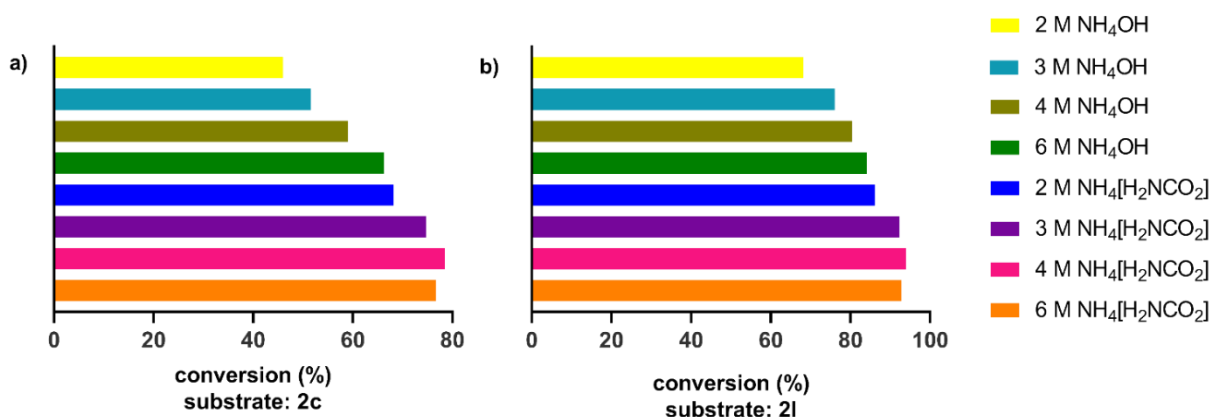


Figura IV.8. Valorile de conversie obținute în reacția de adiție a amoniacului pe a) acidul *p*-CH₃-cinamic **2c** and b) acidul *p*-CF₃-cinamic **2l**, utilizând soluții de NH₄OH și NH₄[H₂NCO₂] ca sursă de amoniac. În toate cazurile *ee*>99%.

IV.2.1.5 Efectul pH-ului

Am comparat utilizarea soluțiilor NH₄OH și NH₄[H₂NCO₂] în reacțiile de aminare a două substraturi model, și anume *m*-OCH₃-acid cinamic **2e** și *p*-Br-acid cinamic **2i**, pentru a selecta sursa optimă de amoniac. Mai exact, am examinat impactul pH-ului asupra valorilor de conversie (**Figura IV.9**), la o concentrație fixă de substrat de 2 mM, folosind celule întregi de *At*PAL I461V și L133A într-un raport biocatalizator: substrat de ~1.

Dintre concentrațiile de amoniac testate, 3 M NH₄[H₂NCO₂] s-a dovedit a fi concentrația optimă datorită pH-ului său neajustat de ~9,5, în timp ce 6 M NH₄OH a necesitat ajustarea cu CO₂ pentru a ajunge la un interval de pH de la 8,85 la 11,5. La valori de pH peste 10,0, am observat o scădere semnificativă a valorilor de conversie pentru ambele substraturi, în timp ce la un pH de ~9,5, am obținut valori maxime de conversie pentru ambele substraturi, indiferent de sursa de amoniac utilizată

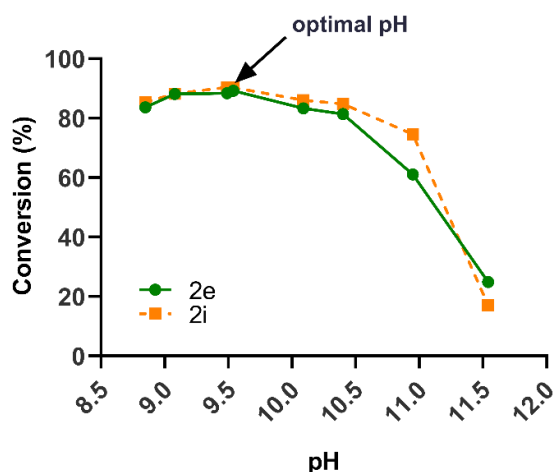


Figura IV.9. Valorile de conversie obținute în reacția de aminare mediată de celule întregi de *At*PAL I461V și L133A a acidului *m*-OCH₃-cinamic **2e** și a acidului *p*-Br-cinamic **2i** (valoarea pH-ului variază de la 8,85 la 11,5).

IV.2.1.6 Efectul temperaturii

Am explorat efectul temperaturii asupra valorilor de conversie ale biotransformărilor cu celule întregi folosind **2a**, **2b** și **2c** ca substraturi model. Reacțiile de adiție de amoniac au fost efectuate la diferite temperaturi (15-45 °C), la două concentrații de substrat (2 mM și 20 mM), așa este prezentat în **Figura IV.10**.

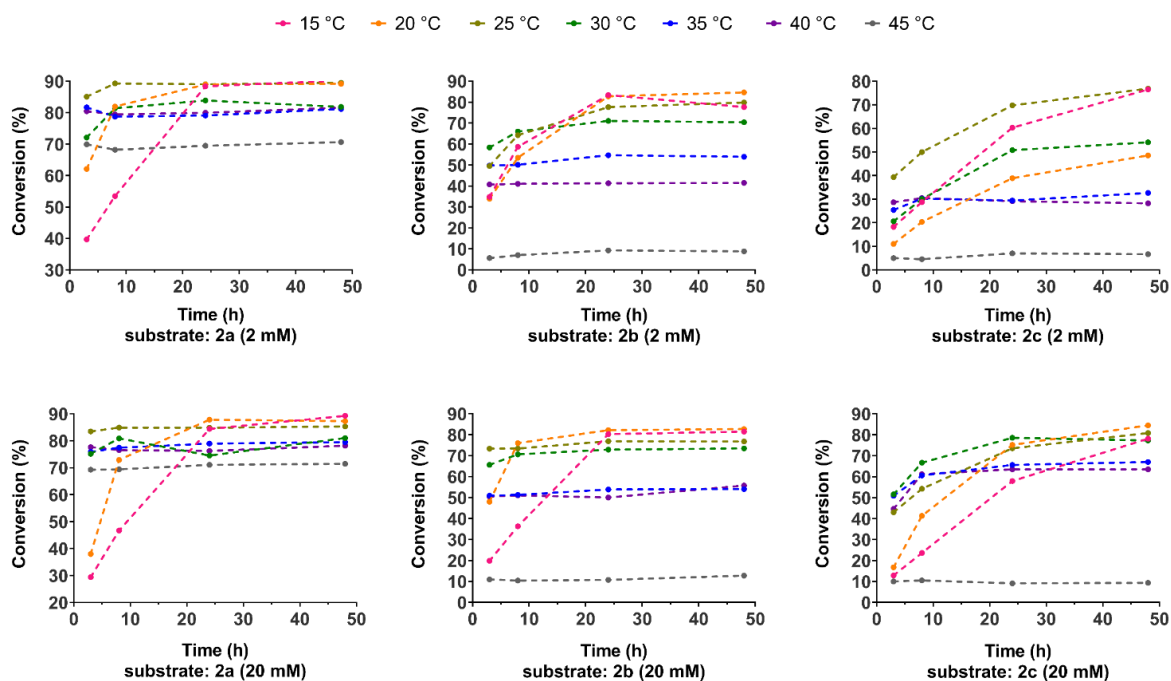


Figura IV.10. Influența temperaturii asupra valorilor de conversie ale reacțiilor de aminare mediate de *At*PAL ale acizilor metil-cinamici substituiți (*o*-, *m*-, *p*-) **2a**, **2b** și **2c** (concentrația de substrat este indicată în paranteze).

După cum este prezentat în **Figura IV.10**, o scădere a valorilor de conversie staționară a fost observată la temperaturi de 40 °C sau 45 °C pentru toate cele trei substraturi, ceea ce a cauzat inactivarea biocatalizatorilor sub formă de celule întregi. Deși celulele întregi *At*PAL au demonstrat eficiență și stabilitate chiar și la temperaturi mai scăzute, în funcție de substrat, intervalul de temperatură de 25-30 °C a fost ales datorită eficacității sale cu toate substraturile testate și a ușurinței de menținere.

IV.2.2 Utilizarea *At*PAL la scară preparativă

Biotransformările la scară preparativă au fost efectuate la scară de 1 gram utilizând celule întregi *At*PAL, în condiții optime de reacție.

Substraturile model **2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g** și **2i** au fost selectate pentru a produce analogi de L-fenilalanine enantiopuri importanți pentru industrie (**Figure IV.11**).

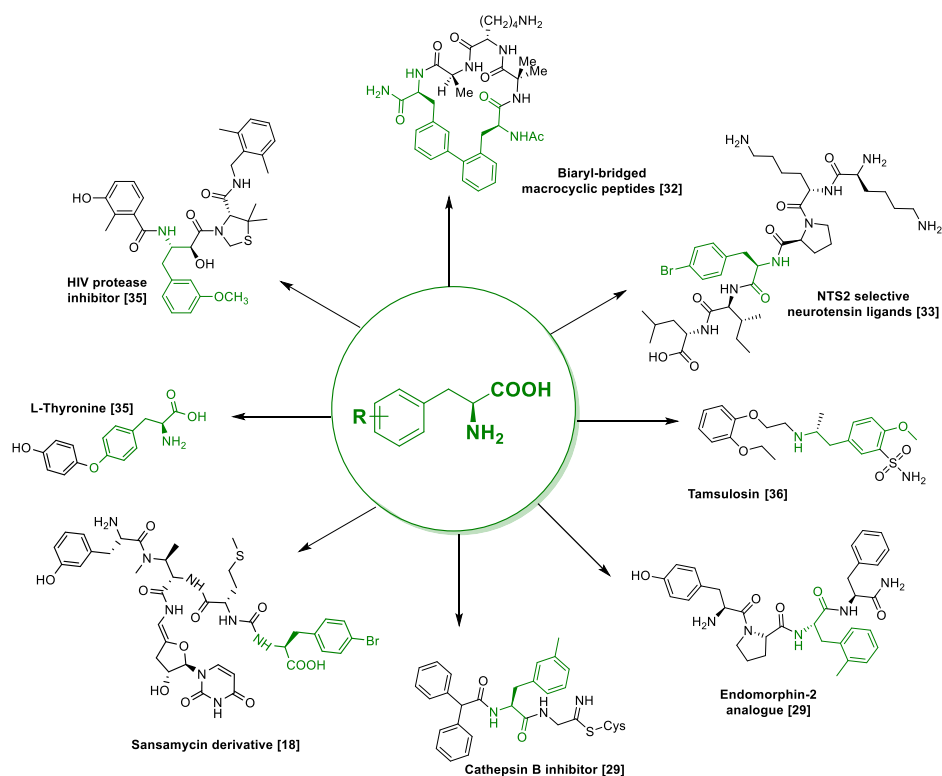


Figura IV.11. Producția la scară a analogilor de fenilalanină cu valoare sintetică ca building blocks pentru ingrediente farmaceutice active (API), utilizând variante mutante de *At*PAL celule întregi.

IV.2.2.1 Rezultatele la scară preparativă și procedurile bazate pe PAL raportate anterior

După optimizarea condițiilor de reacție, am efectuat reacțiile de adiție de amoniac pe derivații de acid cinamic **2a**, **2g**, **2b**, **2e**, **2f** și **2i** la o scară preparativă de 1 gram (**Tabelele IV.3** și **IV.4**). Producții de L-fenilalanină rezultați au prezentat purități optice ridicate și randamente competitive de reacție variind între 56-66% (**Tabelul IV.3**).

De remarcat în mod deosebit a fost randamentul de 66% obținut pentru L-*m*-OCH₃-Phe L-**1e**, care a depășit valorile raportate pentru reacțiile *Pc*PAL L134A⁴³ și *Pb*PAL³¹ efectuate la o concentrație mai mică de substrat de 30 mM (500 mg) și 50 mM (89 mg). În comparație cu reacția la scară semipreparativă (randament 36%, 89 mg substrat) mediată de mutantul *Pb*PAL F113Y⁴⁴, s-a observat o creștere cu 23% a randamentului de reacție (59%) la o scară preparativă de 1 g pentru L-*p*-OCH₃-Phe L-**1f** când s-au utilizat celule întregi umede de *At*PAL I461V (**Tabelul IV.4**).

În ciuda atingerii unor valori staționare de conversie ridicate în cazul L-**1a** și L-**1g** (88% și 95%), randamentele totale (66% și 64%) au fost limitate de randamentele de izolare a produsului, care au fost calculate având în vedere produsul derivat din valoarea de conversie ca cantitate maximă.

Tabel IV.3. Caracterizarea derivaților de L-fenilalanină obținuți în biotransformări la scară preparativă cu *At*PAL celule întregi.

Nr crt	Derivat de L-fenilalanină	Varianta <i>At</i> PAL	conversie[%]	$\eta_{\text{purificare}}^*$ [%]	$\eta_{\text{reacție}}^{\#}$ [%]	$[\alpha]_D^{25}$	Utilitate produs
1	L- <i>o</i> -CH ₃ -Phe (L- 1a)	L257V	88	75	66	-38	receptori μ -opioizi ⁴⁴ ; inhibitori de cathepsină B ⁴⁵
2	L- <i>o</i> -Br-Phe (L- 1g)	L257V	95	67	64	-37	peptide macrociclice ⁴⁶

3	L- <i>m</i> -CH ₃ -Phe (L- 1b)	L133A	78	83	65	-35	inhibitori de catepsină B ⁴⁵ ; inhibitori LAT1 ⁴⁷
4	L- <i>m</i> -OCH ₃ -Phe (L- 1e)	L133A	87	76	66	-187	inhibitori de protează HIV ³⁵ ; oxazolidinonă antidiabetică ³¹ inhibitor de caspază ⁴⁸
5	L- <i>p</i> -OCH ₃ -Phe (L- 1f)	I461V	72	82	59	-80	tamsulosină ⁴⁹ ; L-tironină ⁵⁰
6	L- <i>p</i> -Br-Phe (L- 1i)	I461V	81	69	56	-27	biarilalanine ³⁴ ; analogi de sansamicine ³⁶ ; antagoniști hexapeptidici ⁵¹

*Randament de purificare, considerând produsul derivat din valoarea de conversie ca cantitate maximă; # Randamentul reacției calculat din reacția la scară preparativă incluzând etapele de izolare și purificare a produsului; Măsurătorile rotațiilor optice au fost efectuate la temperatura camerei în MeOH cu o concentrație de substrat de 10 mg/mL.

Tabel IV.4. Producția la scară preparativă a L-**1a,g,b,e,f,i,l** și comparație cu rezultatele procedurilor PAL raportate anterior. Rezultatele acestei lucrări sunt marcate cu fundal gri.

Nr crt	Produs L-Phe	Scală (g)	Enzimă	[S] (mM)	$\eta_{\text{reacție}}$ *	ee_L (%)	Factor E #	R.t. (ore)	Sursă de amoniac
1	L- <i>o</i> -CH ₃ -Phe (L- 1a)	1	<i>At</i> PAL L257V	100	66	>99	32.3	4	3 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
2	L- <i>o</i> -Br-Phe (L- 1g)	1	<i>At</i> PAL L257V	50	64	>99	39.3	4	3 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
3	L- <i>m</i> -CH ₃ -Phe (L- 1b)	1	<i>At</i> PAL L133A	50	65	>99	50.2	22	3 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
4	L- <i>m</i> -OCH ₃ -Phe (L- 1e)	0.5 ⁴³	<i>Pc</i> PAL L134A	30	59	>99	79.9	42	6 M NH ₄ OH
		0.089 ³¹	<i>Pb</i> PAL	50	61	>99	n.r.	24	4 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
		1	<i>At</i> PAL L133A	100	66	>99	28.4	3	3 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
5	L- <i>p</i> -OCH ₃ -Phe (L- 1f)	1	<i>At</i> PAL I461V	30	59	>99	84.6	48	3 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
		0.089 ⁵²	<i>Pb</i> PAL F113Y	50	36	>99	n.r.	12-16	4 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
		0.5 ⁴³	<i>Pc</i> PAL I460V	10	82	>99	121.8	48	6 M NH ₄ OH
6	L- <i>p</i> -Br-Phe (L- 1i)	1	<i>At</i> PAL I461V	100	56	>99	33.9	24	3 M NH ₄ [H ₂ NCO ₂]
		0.022 ³⁴	<i>Av</i> PAL F107A	10	62	-	n.r.	24	5 M NH ₄ OH

* Randamentul reacției calculat din reacția la scară preparativă, inclusiv etapele de izolare și purificare ale produsului.

IV.2.2.2 Factorii E simplificați (sEF) și randamente spațiu-timp (STY)

Factorii E simplificați (sEF) au fost calculați pentru reacțiile de aminare pe bază de *At*PAL ale **2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g** și **2i** (Tabelul IV.5). Valorile obținute pentru acizii *m*-MeO-cinamic **2e** și *p*-Br-cinamic **2i** arată o scădere de 2,8 și, respectiv, de 3,6 ori a SEF-urilor comparativ cu cele observate în procese similare la scară preparativă bazate pe celule întregi umede *Pc*PAL pentru aceleași substraturi. În general, concentrațiile mai mici de substrat au condus la valori mai mari ale sEF, care este atribuită creșterii volumului de reacție care necesită utilizarea unor cantități mai mari de soluții tampon de carbamat de amoniu. De exemplu, cu acidul *p*-MeO-cinamic **2f** la pentru o concentrație

de substrat de 30 mM, s-a obținut o valoare sEF de 84,7, în timp ce cu acidul *m*-MeO-cinamic **2e** folosind o concentrație de substrat de 100 mM s-a obținut o valoare sEF de 28,4 (**Tabelul IV.5**).

Tabel IV.5. Factorii E simplificați (sEF) și randamentele spațiu-timp (STY) calculate pentru producția de derivați de L-fenilalanină folosind celule întregi umede *At*PAL. Aceste rezultate au fost comparate cu cele obținute prin reacțiile de adiție de amoniac catalizate cu *Pc*PAL raportate anterior⁴³ (colorate în portocaliu).

Producții din reacțiile de adiție cu amoniac la scară preparativă								
Materiale (kg)	L- <i>o</i> -CH ₃ -Phe (L-1a)	L- <i>o</i> -Br-Phe (L-1g)	L- <i>m</i> -CH ₃ -Phe (L-1b)	L- <i>m</i> -OCH ₃ -Phe (L-1e)	L- <i>p</i> -OCH ₃ -Phe (L-1f)	L- <i>p</i> -Br-Phe (L-1i)	L- <i>m</i> -OCH ₃ -Phe (L-1e)*	L- <i>p</i> -Br-Phe (L-1i)
Acid acrilic	1.44	1.50	1.37	1.39	1.66	2.03	1.71	1.24
L-aminoacid	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
[NH ₄][CO ₂ NH ₂]	20.77	30.90	10.14	18.26	72.72	20.9	67.23 [#]	114.80 [#]
Celule PAL	11.10	7.90	39.69	9.80	11.30	11.06	12	6.75
sEF	32.3	39.3	50.2	28.4	84.7	33.9	79.9	121.8
STY (g*L⁻¹*d⁻¹)	66.2	44.3	6.4	101.3	1.6	10.9	1.7	0.9

*Calculate din procedurile *Pc*PAL raportate anterior⁴³; [#]soluție tampon 6 M NH₄OH (pH 9.5 ajustat cu CO₂) ca mediu de reacție.

Valorile randamentului spațiu-timp (STY) au fost calculate pentru reacțiile de adiție de amoniac pe **2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g** și **2i** (**Tabelul IV.6**) catalizate de variantele *At*PAL mutante și au fost comparate cu alte tehnologii bazate pe PAL raportate anterior utilizate pentru sinteza diferiților derivați de L-fenilalanină, inclusiv acidul (*R*)-2-amino-3-(2-(benziloxi)-3-metoxifenil)propanoic²⁵, L-3-fluor-fenilalanina²⁷ și L-2-clor-fenilalanina^{24, 27}.

Tabel IV.6. Valorile de randament spațiu-timp ale unor tehnologii bazate pe PAL raportate în literatură.

Materiale	DSM ²⁴	Novartis ²⁵	Grupul lui N.J. Turner ²⁷
Material de start (g)	28.0	20.0	1.0
Conversie (%)	91.0	76.0	92.0
Produs (g)	18.0	16.1	1.0
Timp (ore)	8.5	96.0	6.0
Volum (mL)	1000.0	170.0	17.0
STY (g*L⁻¹*d⁻¹)	51.2²⁷	23.7	237.6

V.3 Concluzii

Acest studiu prezintă proceduri biocatalitice extrem de eficiente pentru sinteza analogilor de L-fenilalanină semnificativi din punct de vedere industrial prin utilizarea variantelor mutante ale fenilalanin amoniac-liazei derivate din *Arabidopsis thaliana*. Rezultatele noastre indică faptul că celulele întregi de variante mutante de *At*PAL utilizate ca și biocatalizatori sunt superioare față de echivalenții din *Pc*PAL studiați anterior în ceea ce privește inhibiția de substrat și produs, furnizând conversii și valori de exces enantiomeric mai mari și timpi de reacție mai scurți chiar și la concentrații mari de substrat (până la 100 mM).

Prin utilizarea diferitelor strategii de optimizare, cum ar fi mediul de reacție, creșterea concentrațiilor de substrat, scurtarea timpilor de reacție și obținerea de conversii staționare mai mari,

am dezvoltat un protocol scalabil pentru sintetizarea mai multor analogi ai L-fenilalaninei relevanți industrial, cum ar fi (*S*)-*o*-CH₃-fenilalanina, (*S*)-*o*-Br-fenilalanina, (*S*)-*m*-OCH₃-fenilalanina, (*S*)-*m*-CH₃-fenilalanina, (*S*)-*p*-OCH₃-fenilalanina și (*S*)-*p*-Br-fenilalanina.

Rezultatele din abordarea noastră depășesc performanța biotransformărilor raportate anterior folosind PAL și au ca rezultat un randament îmbunătățit spațiu-timp (STY) și un impact redus asupra mediului. Implementarea cu succes a procedurilor bazate pe PAL descrise în acest studiu ar putea contribui în mod substanțial la dezvoltarea proceselor de sinteză a ingredientelor farmaceutice active (API).

Concluzii generale

Variantele mutante ale fenilalanin amoniac-liazei din *Petroselinum crispum* (*PcPAL*) au fost utilizate ca și biocatalizatori pentru sinteza biocatalitică a analogilor de L- și D-fenilalanină cu valoare sintetică ridicată. Acești mutanți *PcPAL* au fost proiectați special pentru fenilalanine și acizi cinamici monosubstituiți. Studiul și-a propus să optimizeze performanța catalitică a variantelor *PcPAL* proiectate, prin investigarea reacțiilor de eliminare și adiție a amoniacului și examinând impactul variabilelor cheie, cum ar fi concentrația substratului, raportul biocatalizator: substrat, tamponul de reacție și timpul de reacție asupra conversiei și excesului enantiomeric. Rezultatele au demonstrat că o procedură biocatalitică eficientă la scară preparativă ar putea fi dezvoltată în condiții optime. Derivați valoroși de fenilalanină au fost sintetizați cu succes folosind această abordare, inclusiv (*S*)-*m*-OCH₃-fenilalanina (randament 40%, $ee_S > 99\%$), (*S*)-*m*-CF₃-fenilalanina (randament 26%, $ee_S > 99\%$), (*S*)-*p*-Br-fenilalanină (randament 82%, $ee_S > 99\%$), (*R*)-*m*-CF₃-fenilalanină (randament 34%, $ee_R = 93\%$) și (*R*)-*p*-CH₃-fenilalanină (randament 49%, $ee_R = 95\%$).

Am investigat transferabilitatea modelului de proiectare rațional pentru fenilalanin amoniac-liaze de diferite origini, inclusiv *Arabidopsis thaliana* (*AtPAL*) și *Rhodospiridium toruloides* (*RtPAL*), care posedă o identitate de secvență de 81% și, respectiv, 38%, cu *PcPAL*. Rezultatele noastre sugerează că, cu unele excepții, pozițiile resturilor de aminoacizi care modulează specificitatea substratului sunt conservate printre PAL-urile testate, permițând predicția mutațiilor care îmbunătățesc activitatea PAL către un substrat nenatural țintit. Prin urmare, studiul nostru susține utilizarea unei abordări generale pentru a modifica PAL-uri din diferite surse cu diferite domenii de substrat. Descoperirile noastre arată, de asemenea, că alți factori decât diferențele de situs catalitic pot influența activitatea PAL. De exemplu, variantele *AtPAL* L257V, L133A și I461V au prezentat o eficiență catalitică mai mare decât omologii lor *PcPAL*, în ciuda faptului că au situsuri catalitice identice.

Prin utilizarea variantelor mutante ale fenilalanin amoniac-liazei din *Arabidopsis thaliana* (*AtPAL*), am dezvoltat o procedură de sinteză preparativă extrem de eficientă pentru derivații de L-fenilalanină, cu randamente îmbunătățite de factor E și STY, care se aliniază cu principiile chimiei verzi. Biotransformările pe bază de *AtPAL* ale derivaților de acizi cinamici au produs diverși aminoacizi nenaturali care au potențial semnificativ ca building blocks pentru ingredientele farmaceutice active (API), inclusiv (*S*)-*o*-CH₃-fenilalanina, (*S*)-*o*-Br-fenilalanina, (*S*)-*m*-OCH₃-fenilalanina, (*S*)-*m*-CH₃-fenilalanina, (*S*)-*p*-OCH₃-fenilalanina și (*S*)-*p*-Br-fenilalanina.

Capitolul V. Secțiunea experimentală: Materiale și Metode

Bibliografie

1. Clemente-Jiménez, J. M.; Martínez-Rodríguez, S.; Rodríguez-Vico, F.; Heras-Vázquez, F. J., Optically pure alpha-amino acids production by the "Hydantoinase Process". *Recent Patents on Biotechnology* **2008**, 2 (1), 35-46.
2. Narancic, T.; Almahboub, S. A.; O'Connor, K. E., Unnatural amino acids: production and biotechnological potential. *World journal of Microbiology & Biotechnology* **2019**, 35 (4), 67.
3. Dougherty, D. A., Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, 4 (6), 645-652.
4. Axup, J. Y.; Bajjuri, K. M.; Ritland, M.; Hutchins, B. M.; Kim, C. H.; Kazane, S. A.; Halder, R.; Forsyth, J. S.; Santidrian, A. F.; Stafin, K.; Lu, Y.; Tran, H.; Seller, A. J.; Biroc, S. L.; Szydluk, A.; Pinkstaff, J. K.; Tian, F.; Sinha, S. C.; Felding-Habermann, B.; Smider, V. V.; Schultz, P. G., Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109 (40), 16101-16106.
5. Blaskovich, M. A. T., Unusual amino acids in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59 (24), 10807-10836.
6. Leuchtenberger, W.; Huthmacher, K.; Drauz, K., Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, 69 (1), 1-8.
7. May, O.; Verseck, S.; Bommarius, A.; Drauz, K., Development of dynamic kinetic resolution processes for biocatalytic production of natural and nonnatural L-amino acids. *Organic Process Research & Development* **2002**, 6 (4), 452-457.
8. Mollica, A.; Mirzaie, S.; Costante, R.; Carradori, S.; Macedonio, G.; Stefanucci, A.; Dvoracsko, S.; Novellino, E., Exploring the biological consequences of conformational changes in aspartame models containing constrained analogues of phenylalanine. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, 31 (6), 953-963.
9. Chattopadhyay, S.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R., Artificial sweeteners - a review. *Journal of Food Science and Technology* **2014**, 51 (4), 611-621.
10. Gillbro, J. M.; Olsson, M. J., The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science* **2011**, 33 (3), 210-221.
11. Kochhar, J. S.; Chan, S. Y.; Ong, P. S.; Kang, L., Clinical therapeutics for phenylketonuria. *Drug Delivery and Translational Research* **2012**, 2 (4), 223-237.
12. Thomas, J.; Levy, H.; Amato, S.; Vockley, J.; Zori, R.; Dimmock, D.; Harding, C. O.; Bilder, D. A.; Weng, H. H.; Olbertz, J.; Merilainen, M.; Jiang, J.; Larimore, K.; Gupta, S.; Gu, Z.; Northrup, H., Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: Results of a long-term phase 3 clinical trial program (PRISM). *Molecular Genetics and Metabolism* **2018**, 124 (1), 27-38.
13. Levy, H. L.; Sarkissian, C. N.; Scriver, C. R., Phenylalanine ammonia lyase (PAL): From discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* **2018**, 124 (4), 223-229.
14. Hodgins, D. S., Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *The Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246 (9), 2977-2985.
15. Calabrese, J. C.; Jordan, D. B.; Boodhoo, A.; Sariaslani, S.; Vannelli, T., Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: Multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry* **2004**, 43 (36), 11403-11416.

16. Ritter, H.; Schulz, G. E., Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell* **2004**, *16* (12), 3426-3436.
17. Baedeker, M.; Schulz, G. E., Overexpression of a designed 2.2 kb gene of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **1999**, *457* (1), 57-60.
18. Moffitt, M. C.; Louie, G. V.; Bowman, M. E.; Pence, J.; Noel, J. P.; Moore, B. S., Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization. *Biochemistry* **2007**, *46* (4), 1004-1012.
19. Rétey, J.; Paizs, C.; Tosa, M.; Laszlo Csaba, B.; Brem, J.; Irimie, F. D., 2-Amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propionic Acids and 5-Phenylfuran-2-ylacrylic acids are novel substrates of phenylalanine ammonia-lyase. *Heterocycles* **2010**, *82*, 1217.
20. Paizs, C.; Katona, A.; Rétey, J., The interaction of heteroaryl-acrylates and alanines with phenylalanine ammonia-lyase from parsley. *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12* (10), 2739-2744.
21. Bencze, L. C.; Filip, A.; Banoczi, G.; Tosa, M. I.; Irimie, F. D.; Gellert, A.; Poppe, L.; Paizs, C., Expanding the substrate scope of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum* towards styrylalanines. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (17), 3717-3727.
22. Filip, A.; Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Banoczi, G.; Tosa, M. I.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Paizs, C.; Bencze, L. C., Tailored mutants of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum* for the synthesis of bulky L- and D-arylalanines. *ChemCatChem* **2018**, *10* (12), 2627-2633.
23. Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Lang, P. A.; Filip, A.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Tosa, 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.
24. de Lange, B.; Hyett, D. J.; Maas, P. J. D.; Mink, D.; van Assema, F. B. J.; Sereinig, N.; de Vries, A. H. M.; de Vries, J. G., Asymmetric synthesis of (S)-2-indolinecarboxylic acid by combining biocatalysis and homogeneous catalysis. *ChemCatChem* **2011**, *3* (2), 289-292.
25. Hardegger, L. A.; Beney, P.; Bixel, D.; Fleury, C.; Gao, F.; Perrenoud, A. G.-G.; Gu, X.; Haber, J.; Hong, T.; Humair, R.; Kaegi, A.; Kibiger, M.; Kleinbeck, F.; Luu, V. T.; Padeste, L.; Rampf, F. A.; Ruch, T.; Schlama, T.; Sidler, E.; Udvarhelyi, A.; Wietfeld, B.; Yang, Y., Toward a scalable synthesis and process for EMA401, Part III: Using an engineered phenylalanine ammonia lyase enzyme to synthesize a non-natural phenylalanine derivative. *Organic Process Research & Development* **2020**, *24* (9), 1763-1771.
26. Rowles, I.; Groenendaal, B.; Binay, B.; Malone, K. J.; Willies, S. C.; Turner, N. J., Engineering of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula graminis* for the enhanced synthesis of unnatural L-amino acids. *Tetrahedron* **2016**, *72* (46), 7343-7347.
27. Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Siirola, E.; Pushpanath, A.; Schell, U.; Turner, N. J., Intensified biocatalytic production of enantiomerically pure halophenylalanines from acrylic acids using ammonium carbamate as the ammonia source. *Catalysis Science and Technology* **2016**, *6* (12), 4086-4089.
28. Hyun, M. W.; Yun, Y. H.; Kim, J. Y.; Kim, S. H., Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology* **2011**, *39* (4), 257-265.
29. Zhang, F.; Huang, N.; Zhou, L.; Cui, W.; Liu, Z.; Zhu, L.; Liu, Y.; Zhou, Z., Modulating the pH activity profiles of phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis* by modification of center-near surface residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2017**, *183* (3), 699-711.
30. Weise, N. J.; Parmeggiani, F.; Ahmed, S. T.; Turner, N. J., Discovery and investigation of mutase-like activity in a phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis*. *Top Catalysis* **2018**, *61* (3-4), 288-295.
31. Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Galman, J. L.; Dunstan, M. S.; Charnock, S. J.; Leys, D.; Turner, N. J., Zymophore identification enables the discovery of novel phenylalanine ammonia lyase enzymes. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 13691.
32. Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J., Engineered ammonia lyases for the production of challenging electron-rich l-phenylalanines. *ACS Catalysis* **2018**, *8* (4), 3129-3132.

33. 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.
34. Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J., Chemoenzymatic synthesis of optically pure L- and D-biarylalanines through biocatalytic asymmetric amination and palladium-catalyzed arylation. *ACS Catalysis* **2015**, *5* (9), 5410-5413.
35. Mimoto, T.; Terashima, K.; Nojima, S.; Takaku, H.; Nakayama, M.; Shintani, M.; Yamaoka, T.; Hayashi, H., Structure-activity and structure-metabolism relationships of HIV protease inhibitors containing the 3-hydroxy-2-methylbenzoyl-allophenylnorstatine structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (1), 281-93.
36. Zhang, N.; Liu, L.; Shan, G.; Cai, Q.; Lei, X.; Hong, B.; Wu, L.; Xie, Y.; Chen, R., Precursor-directed biosynthesis of new sansanmycin analogs bearing para-substituted-phenylalanines with high yields. *The Journal of Antibiotics* **2016**, *69* (10), 765-768.
37. 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.
38. 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.
39. Hwang, T. L.; Hung, C. H.; Hsu, C. Y.; Huang, Y. T.; Tsai, Y. C.; Hsieh, P. W., Design and synthesis of tryptophan containing dipeptide derivatives as formyl peptide receptor 1 antagonist. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11* (22), 3742-3755.
40. Lenstra, D. C.; Damen, E.; Leenders, R. G. G.; Blaauw, R. H.; Rutjes, F.; 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.
41. Lovelock, S. L.; Turner, N. J., Bacterial *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase: A biocatalyst with broad substrate specificity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2014**, *22* (20), 5555-5557.
42. Tork, S. D.; Moisa, M. E.; Cserepes, L.; Filip, A.; Nagy, L. C.; Irimie, F. D.; Bencze, L. C., Towards a general approach for tailoring the hydrophobic binding site of phenylalanine ammonia-lyases. *Scientific Reports* **2022**, *12* (1), 10606.
43. Tork, S. D.; Nagy, E. Z. A.; Cserepes, L.; Bordea, D. M.; Nagy, B.; Tosa, M. I.; Paizs, C.; Bencze, L. C., The production of L- and D-phenylalanines using engineered phenylalanine ammonia lyases from *Petroselinum crispum*. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 20123
44. Li, T.; Shiotani, K.; Miyazaki, A.; Tsuda, Y.; Ambo, A.; Sasaki, Y.; Jinsmaa, Y.; Marczak, E.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H.; Okada, Y., Bifunctional [2',6'-dimethyl-L-tyrosine]endomorphin-2 analogues substituted at position 3 with alkylated phenylalanine derivatives yield potent mixed mu-agonist/delta-antagonist and dual mu-agonist/delta-agonist opioid ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (12), 2753-2766.
45. Schmitz, J.; Gilberg, E.; Löser, R.; Bajorath, J.; Bartz, U.; Gütschow, M., Cathepsin B: Active site mapping with peptidic substrates and inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27* (1), 1-15.
46. Cawley, N. X.; Huang, J.; Peng Loh, Y.; Dhanvantari, S., Prohormone convertases. In *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier: **2014**.
47. Chien, H. C.; Colas, C.; Finke, K.; Springer, S.; Stoner, L.; Zur, A. A.; Venteicher, B.; Campbell, J.; Hall, C.; Flint, A.; Augustyn, E.; Hernandez, C.; Heeren, N.; Hansen, L.; Anthony, A.; Bauer, J.; Fotiadis, D.; Schlessinger, A.; Giacomini, K. M.; Thomas, A. A., Reevaluating the Substrate Specificity of the L-Type Amino Acid Transporter (LAT1). *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61* (16), 7358-7373.

48. Vickers, C. J.; González-Páez, G. E.; Wolan, D. W., Selective detection of caspase-3 versus caspase-7 using activity-based probes with key unnatural amino acids. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8* (7), 1558-1566.
49. Arava, V. R.; Amasa, S. R.; Goud Bhatthula, B. K.; Kompella, L. S.; Matta, V. P.; Subha, M. C. S., Asymmetric Synthesis of Unnatural Amino Acids and Tamsulosin Chiral Intermediate. *Synthetic Communications* **2013**, *43* (21), 2892-2897.
50. Carrel, T.; Eckstein, F.; Englberger, L.; Mury, R.; Mohacsi, P., Thyronin treatment in adult and pediatric heart surgery: clinical experience and review of the literature. *European Journal of Heart Failure* **2002**, *4* (5), 577-582.
51. Simeth, N. A.; Bause, M.; Dobmeier, M.; Kling, R. C.; Lachmann, D.; Hübner, H.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P.; König, B., NTS2-selective neurotensin mimetics with tetrahydrofuran amino acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (1), 350-359.
52. Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J., Engineered ammonia lyases for the production of challenging electron-rich l-phenylalanines. *ACS Catalysis* **2018**, *8* (4), 3129-3132.