

## RAPORT ȘTIINȚIFIC

### Inginerie Biocatalitica - Tehnologia reactoarelor cu nanoparticule magnetice selective (BE-SMART)

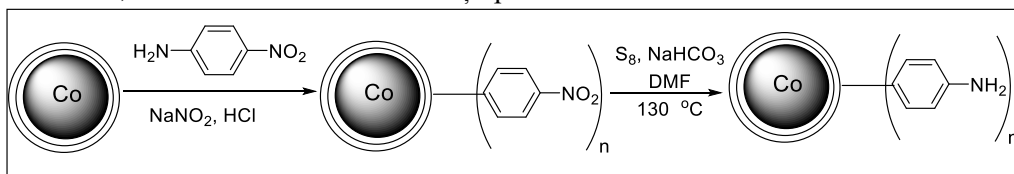
2020

**Rezumatul etapei** Au fost sintetizate MNPs funcționalizate pentru legarea covalentă a unor transaminaze noi, cu selectivitate controlată (*R* sau *S*-selective) cu scopul dezvoltării unor procese continue pentru sinteza unor amine chirale cu relevanță industrială.

#### ETAPA 1 - OBTINEREA NANOPARTICULELOR MAGNETICE (MNPs) FUNCȚIONALIZATE CA SUPORT PENTRU IMOBILIZAREA ENZIMELOR

I. Dezvoltarea unor strategii de imobilizare a transaminazelor. Sinteza și funcționalizarea suporturilor, cu activitate enzimatică controlată

În ultimii ani atenția a fost îndreptată spre utilizarea de nanoparticule magnetice stabile la aer, care păstrează avantajele materialelor magnetice pe bază de fier, dar pot fi incluse în matrici complexe, derivatizabile ulterior, pentru a permite legarea pe suprafață a unor molecule bioactive, inclusiv a enzimelor în scopul utilizării lor în procese de interes [A.H. Lu, E.I. Salabas, F. Schült, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222.] Utilizarea oxizilor unor metale în domeniul nanoparticulelor este astfel strâns legată de acoperirea acestor miezuri magnetice cu straturi protectoare funcționalizabile pe abză de carbon sau siliciu, respectiv alți oxizi metalici predispuși la hidroliză. Au fost astfel dezvoltate nanoparticule magnetice de cobalt acoperite cu carbon, stabile în aer și la temperaturi ridicate [R. Grass, E.K. Athanassiou, W.J. Stark, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4909.]. Straturile de carbon cu rol protector (confirmat prin analiza TEM) pot fi ulterior folosite pentru funcționalizare și legarea enzimelor, conform succesiunii de reacții prezentate în Schema 1.1.



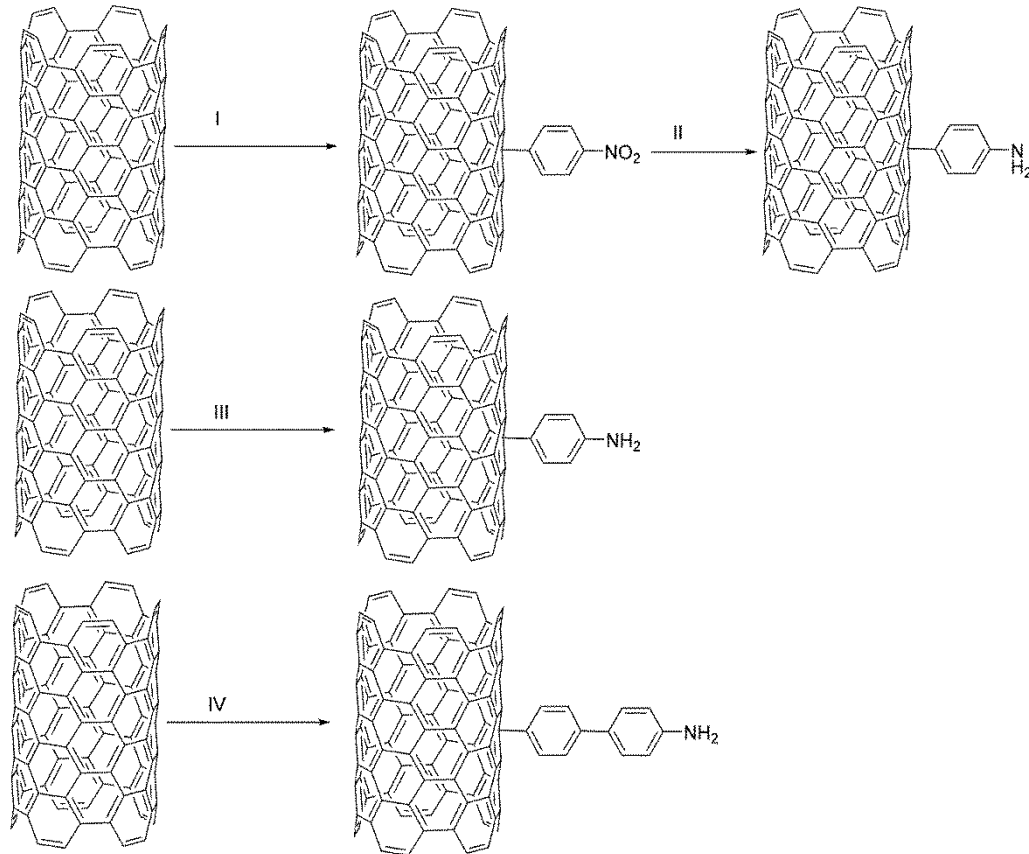
**Schema 1.1.** Derivatizarea MNPs de cobalt acoperite cu carbon cu săruri de diazoniu

Pentru introducerea de grupări epoxi, gruparea nitro poate fi apoi redusă sau se poate utiliza de la început compusul aromatic cu două grupări aminice pe nucleu, respectiv *p*-fenilendiamina sau chiar benzidina. Datorită prețului ridicat al nanoparticulelor pe bază de cobalt, protocolul de funcționalizare a suportului a fost optimizat utilizând ca și materie primă nanotuburi de carbon monostrat nefuncționalizate (SwCNT) conform Schemei I.2. În cazul utilizării fenilendiaminei și a benzidinei funcționalizarea SwCNT a fost realizată într-o singură etapă în timp ce la utilizarea 4-nitroanilinei a fost necesară etapa suplimentară de reducere cu sulf a grupării nitro la gruparea amino.

În prima etapă a funcționalizării cu 4-nitroanilină a SwCNT au fost suspendate 50 mg SwCNT, 7 mmoli de 4-nitroanilină (966 mg), 7 mmoli azotit de sodiu (NaNO<sub>2</sub>, 483 mg) în 10 mL acid acetic glacial. Reacția de diazotare-cuplare se perfectează sub agitare magnetică (800 rpm) timp de 10 minute la temperatura camerei. După 10 minute se adaugă 20 mL dimetilformamidă (DMF) iar după alte 15 minute se filtrează materialele solide și se spală succesiv cu DMF (5 mL) și acetat de etil (EtOAc, 5 mL). Peste filtrat se adaugă 20 mL DMF și se ultrasonează timp de 20 de minute. Suportul funcționalizat se spală apoi cu DMF (5 mL), EtOAc (5 mL) și metanol (MeOH, 10 mL). SwCNT funcționalizate cu grupări nitro se usucă la vid (10 mbari) la 42 °C timp de 2 ore. Etapa a doua a procesului, reducerea grupării nitro cu sulf: 30 mg SwCNT-NO<sub>2</sub>, 90 mg sulf și 90 mg bicarbonat de sodiu (NaHCO<sub>3</sub>) se suspendă în 10 mL DMF. Reacția de reducere se perfectează sub agitare magnetică (800 rpm) timp de 5 ore la 130 °C. După răcire lentă la temperatura camerei, solidul este filtrat și spălat cu DMF (5 mL), EtOAc (5 mL) și metanol (10 mL). SwCNT-NH<sub>2</sub> se usucă la vid (10 mbari) la 42 °C timp de 2 ore.

Funcționalizarea SwCNT cu fenilendiamină și benzidină se realizează similar într-o singură etapă, după cum urmează: 50 mg SwCNT, 7 mmoli fenilendiamină (757 mg), respectiv 7 mmoli benzidină (1.29 g), 7 mmoli NaNO<sub>2</sub> (483 mg) se adaugă în 10 mL acid acetic glacial. Reacțiile se perfectează sub agitare magnetică (800 rpm) la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi se adaugă 20 mL DMF și după 15 minute se filtrează solidul format, se spală succesiv cu DMF (5 mL) și EtOAc (5 mL). Peste suportul obținut se adaugă 20 mL DMF, se ultrasonează

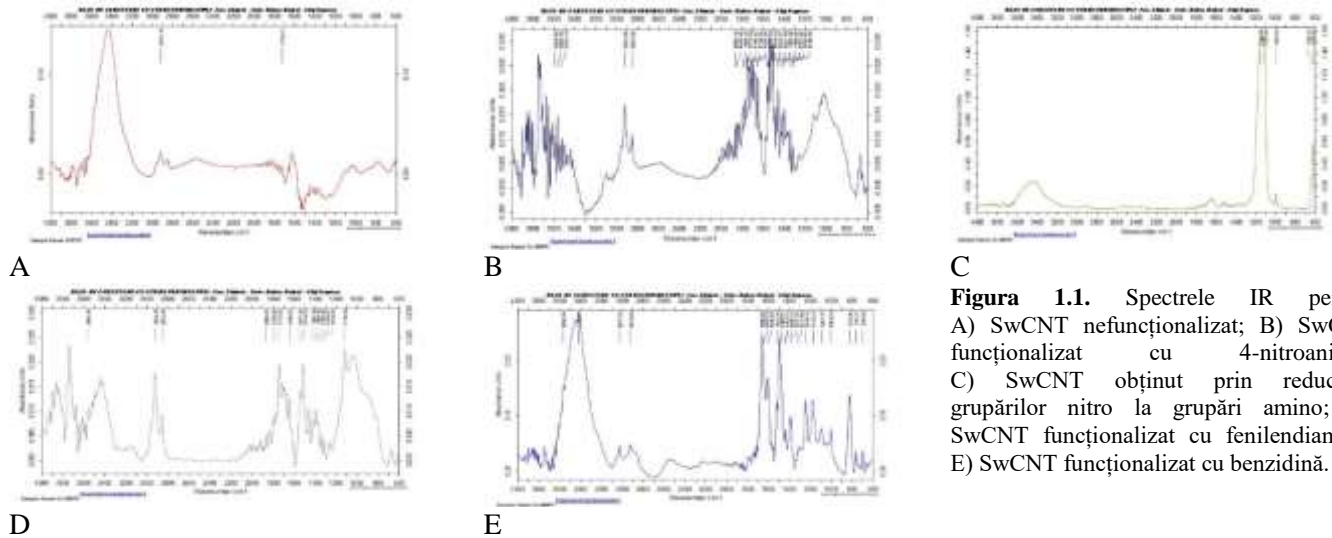
timp de 20 de minute, se filtrează și se spală cu DMF (5 mL), EtOAc (5 mL) și metanol (MeOH, 10 mL). Suporturile au fost uscate la vid (10 mbari) la 42 °C timp de 2 ore.



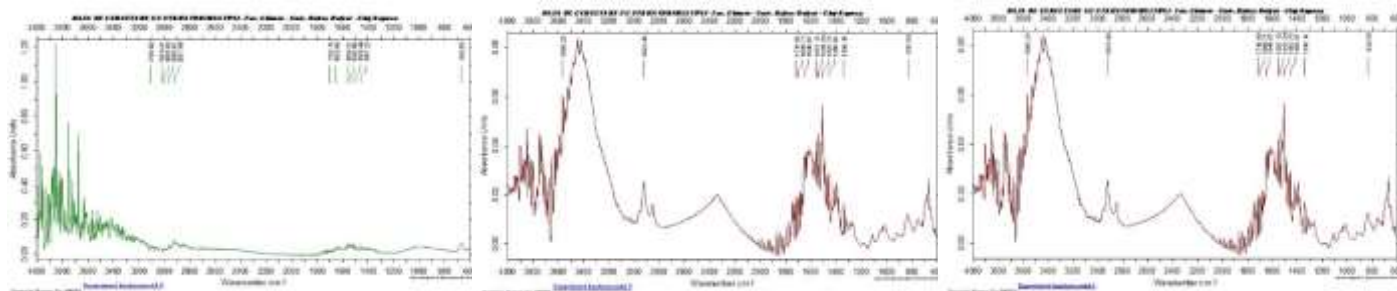
**Schema I.2.** Funcționalizarea SwCNT cu 4-nitroanilină, p-fenilendiamină și benzidină.

Suporturile astfel obținute au fost analizate prin spectroscopie IR (Figura I.1), respectiv prin analiză elementală. SwCNT funcționalizat cu fenilendiamină; E) SwCNT funcționalizat cu benzidină.

Pe baza rezultatelor obținute s-a trecut la funcționalizare Co-MNP facoperite cu carbon prin protocoale similare cu cele utilizate pentru funcționalizarea SwCNT pentru a obține CoMNP-NO<sub>2</sub> (utilizând 4-nitroanilina) și CoMNP-NH<sub>2</sub> (utilizând fenilendiamina), spectrele IR fiind prezentate în Figura I.2.



**Figura 1.1.** Spectrele IR pentru: A) SwCNT nefuncționalizat; B) SwCNT funcționalizat cu 4-nitroanilină; C) SwCNT obținut prin reducerea grupărilor nitro la grupări amino; D) SwCNT funcționalizat cu fenilendiamină; E) SwCNT funcționalizat cu benzidină.



**Figura 1.2.** Spectrele IR pentru funcționalizarea CoMNP: A) CoMNP nefuncționalizate; B) CoMNP funcționalizate cu 4-nitroanilină; C) CoMNP funcționalizate cu fenilendiamină.

Pentru a putea determina gradul de funcționalizare a nanoparticulelor, s-a realizat analiza elementală (Tabelul I. 1). Pe baza datelor obținute pentru conținutul în N s-a determinat gradul de acoperire cu grupări amino.

O altă metodă de funcționalizare a CoMNP utilizând derivați silanici (APTMOs-aminopropiltrimetoxisilan; *n*-PTMOs- *n*-propiltrimetoxisilan; TMOS- tetrametoxisilan). Pentru aceasta s-au cântărit 25 mg CoMNP nefuncționalizate peste care s-au adăugat 100  $\mu$ L *izo*-propanol, 50  $\mu$ L fluorură de sodiu 1 M și: a) 3 mmoli APTMOs (CoMNP-9), b) 2 mmoli APTMOs plus 1 mmol TMOS (CoMNP-10), c) 1.6 mmoli APTMOs plus 0.4 mmoli *n*-PTMOs plus 1 mmol TMOS (CoMNP-11). Amestecurile de reacție au fost agitate (1000 rpm) timp de 1 oră apoi au fost lăsate peste noapte la temperatura camerei. Solidul a fost filtrat și spălat cu 7 mL *izo*-propanol, 5 mL apă bidistilată, 5 mL *izo*-propanol și 2.5 mL *n*-hexan. După spălare suporturile obținute au fost uscate la vid (17 mbari) și temperatura de 42 °C timp de o oră. După 24 de ore suporturile obținute au fost mojarate pentru uniformizare. În cazul suporturilor obținute prin această metodă a fost determinat numărul de grupări amino de pe suprafața acestora în comparație cu SwCNT funcționalizate anterior (vezi Tabelul 2.2) utilizând o metodă colorimetrică.

**Tabel I.1.** Rezultate obținute la analiza suporturilor preparate.

Cod probă	Tip suport	Cantitate cântărită [mg]	Procent de azot [%]
CoMNP-1	CoMNP nefuncționalizate	3	0
CoMNP-2	CoMNP-NO <sub>2</sub>	2.5	0.005
CoMNP-3	CoMNP-NH <sub>2</sub> (fenilendiamină)	2.4	0.7
CoMNP-4	SwCNT nefuncționalizate	2	0.002
CoMNP-5	SwCNT-NO <sub>2</sub>	2	2.65
CoMNP-6	SwCNT-NH <sub>2</sub> (din reacția de reducere)	2.4	0.273
CoMNP-7	SwCNT-NH <sub>2</sub> (fenilendiamină)	2.4	2.4
CoMNP-8	SwCNT-NH <sub>2</sub> (benzidină)	2.5	3.6

Metoda colorimetrică presupune formarea unui complex (bază Schiff) între grupările amino de pe suprafața suporturilor funcționalizate și 4-nitrobenzaldehydă. Au fost cântărite suporturile pentru care determinările au fost efectuate, iar peste acestea a fost adăugată o soluție de 700  $\mu$ g/mL 4-nitrobenzaldehydă în soluție de cuplare (0.8 % acid acetic glacial în MeOH), iar reacțiile au fost perfectate sub basculare (100 rpm) timp de 2 ore. După cele 2 ore solidul a fost filtrat și spălat cu soluție de cuplare (3 x 1 mL) după care a fost adăugat 1 mL soluție de hidroliză (preparată prin amestecarea a 75 mL MeOH cu 75 mL apă bidistilată și cu 200  $\mu$ L acid acetic glacial), iar reacțiile au fost basculate (100 rpm) timp de 30 de minute apoi soluția de hidroliză se decantează și absorbanta a fost citită la 282 nm. Concentrația de 4-nitrobenzaldehydă a fost determinată pe baza unei curbe de calibrare trasată în

prealabil. Cunoșcând numărul de moli de 4-nitrobenzaldehydă legați de suport și cunoșcând suprafața specifică a suporturilor, 15 m<sup>2</sup>/g în cazul CoMNP și 250 m<sup>2</sup>/g în cazul SwCNT a putut fi determinat numărul de grupări amino de pe suprafața suporturilor.

**Tabelul 1. 2.** Gradul de acoperire cu grupări amino al suporturilor derivatizate

Cod suport	Cantitate suport [mg]	Densitatea grupărilor amino [moleculă/nm <sup>2</sup> ]
CoMNP-9	4.1	1.46
CoMNP-10	6.1	0.88
CoMNP-11	4.3	0.36
CoMNP-6	5.4	0.06
CoMNP-7	2	0.16
CoMNP-8	4.1	0.11

## 2021

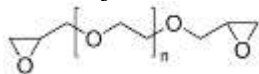
**Rezumat:** Activitățile anului 2021 au urmărit dezvoltarea în continuare de suporturi pentru imobilizarea transaminazelor, obținerea și imobilizarea acestor tranaminaze precum și utilizarea lor în procese de rezoluție cinetică a unor amine relevante.

## ETAPA 2 - METODE DE IMOBILIZARE SELECTIVA A ENZIMELOR PE MNPS PENTRU DEZVOLTAREA DE SISTEME DE MICROFLUIDICA

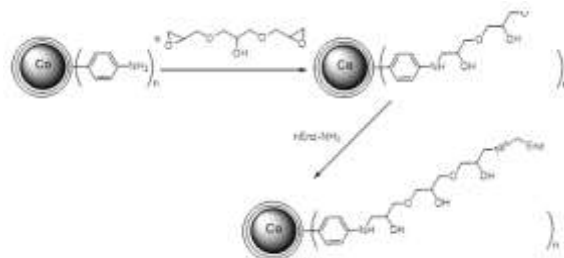
### Act 2.1 - Derivatizarea cu grupari epoxi a nanoparticulelor magnetice functionalizate

Introducerea grupărilor epoxi prin reacția cu grupările aminice disponibile pe suprafața MNPs este facilă și cantitativă la utilizarea diglicidileterilor cu diverse structuri, care posedă grupări de lungimi și hidrofobicități diferite, conform reacției din Schema II.1.1.

Pentru a vedea modul în care natura suportului influențează activitatea lipazei enzimei legată covalent pe nanoparticulele functionalizate, au fost testați mai multe tipuri de glicidileteri cu structura de mai jos.



**Schema II.1.1.** Epoxidarea MNPs de cobalt acoperite cu carbon activate

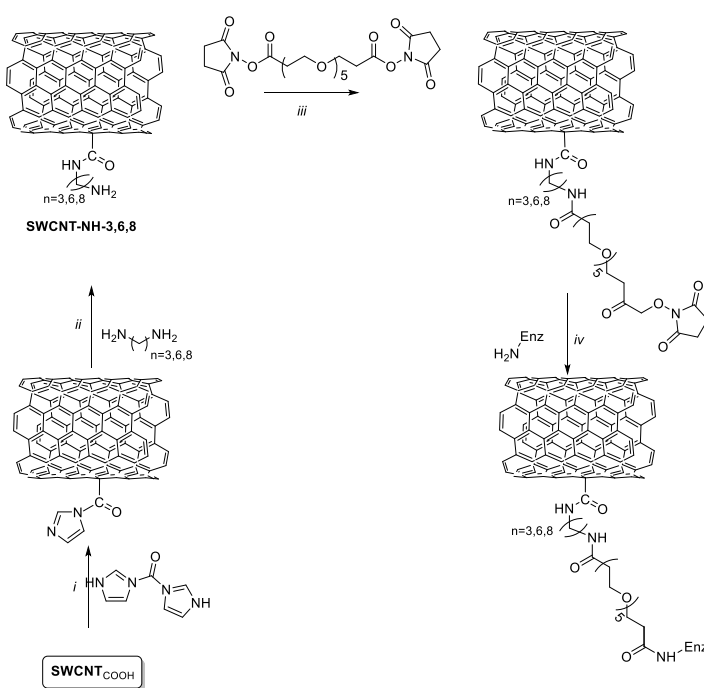


La 40 mg nanosuport se adaugă o soluție de glicerol diglicidil eter (128 mg) în etanol (5 mL). Amestecul se agită 4 ore la 1350 rpm la temperatura camerei. Nanomaterialul se separă prin centrifugare și se spală cu etanol și apă distilată (3 x 10 mL). Peste materialul separat se adaugă 20 mg de TA (în 5 mL soluție tampon) iar amestecul de se agită la 1350 rpm la temperatura camerei timp de 4 ore. După separare se spală cu apă distilată (3 x 10 mL). Cantitatea de enzimă imobilizată se estimează din diferența concentrației enzimei înainte și după imobilizare, determinată spectrofotometric prin metoda Bradford

### Imobilizarea pe SwCNT<sub>COOH</sub> prin intermediul bis-succinimidil-polietilenglicolului (BS(PEG)<sub>5</sub>)

Au fost activate SwCNT<sub>COOH</sub> cu carbonildiimidazol prin agitare la 1350 rpm peste noapte, cu sonicare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotub (Schema II.1.2 etapa i). La nanomaterialul activat separat prin filtrare s-a adăugat propan-1,3-diamină (hexan-1,6-diamină respectiv octan-1,8-diamină) în apă distilată (schema 5 etapa ii). După cuplarea cu alchildiimină proba a fost filtrată și spălată cu apă. În soluția care conține enzima de interes (10 mg) s-a adăugat nanotubul activat (20 mg), (BS(PEG)<sub>5</sub>) (6 mg) și Tween-80 (7.8 μL). Amestecul de reacția s-a agitat timp de o oră la temperatura camerei. Biocatalizatorul rezultat a fost filtrat și spălat cu apă. Cantitatea de enzimă imobilizată s-a determinat din diferența concentrației enzimei înainte și după imobilizare, ambele măsurate spectrofotometric prin metoda Bradford (randament de imobilizare 99.7 %).

**Schema II.1.2.** Imobilizarea TA pe SwCNT<sub>COOH</sub> prin intermediul bis-succinimidil-polietilen-glicolului (BS(PEG)<sub>5</sub>)



## Act 2.2 - Imobilizarea unor transaminaze noi (ArS-, PsS-, ArR-si SiR-TA) pe MNPs functionalizate si derivatizate

### I. Studii computaționale

#### I.1. Generarea modelului omolog pentru PspTA

S-a folosit server-ul SWISS-MODEL (Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 296-303) pentru a prezice structura tridimensională care corespunde secvenței de aminoacizi a PspTA. Pentru generarea modelului omolog s-a utilizat ca templat structura aminotransferazei izolată din *Halomonas elongata* (cod PDB: 6GWI\_1), între secvența acestei enzime (cod UniProt: E1V913) și cea de interes, identitatea fiind de 67%. Deși în bazele de date se găsesc structuri ce corespund unor proteine cu identitate de secvență cu PspTA mai mare, 80,73% pentru codul UniProt W5IS25 (cod PDB: 5TI8), respectiv 77% pentru codul UniProt A0A1X0Z7H5 (cod PDB: 6HX9), acestea au fost considerate template-uri de calitate mai slabă decât 6GWI\_1. Această distincție s-a făcut în baza parametrului QSQE (Quaternary Structure Quality Estimate), folosit la evaluarea

Modelul omolog obținut pentru PspTA se prezintă ca homodimer, una dintre subunități conținând, în situsul activ, cofactorul PLP, legat covalent de lizina din poziția 286. Pentru a obține un model aplicabil studiilor de docking pentru cetone și/sau aldehide, legătura Lys286-PLP a fost scindată cu ajutorul programului PyMOL. Orientarea Lys286 a fost modificată în sensul minimizării conflictelor sterice cu resturile înconjurătoare de aminoacizi, în timp ce cofactorul a fost trecut în forma PMP (cea care realizează transferul grupării amino către aminoacceptor), gruparea -NH<sub>2</sub> fiind orientată către capătul canalului de acces înspre situs. Modelul astfel obținut, acum în forma enzimă:PMP, a fost supus minimizării energetice folosind server-ul YASARA (Krieger, E.; Joo, K.; Lee, J.; Lee, J.; Raman, S.; Thompson, J.; Tyka, M.; Baker, D.; Karplus, K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, **2009**, *77* (SUPPL. 9), 114-122) pentru a rafina/corecta modificările grosiere, operate manual, de modificare a conformației Lys286 și a structurii/orientării cofactorului. Varianta finală a modelului omolog (redată în **Figura II.1**), obținută în urma minimizării energiei, conține, în situsul activ, PMP la aceleași coordonate la care se regăsea inițial PLP, orientat corespunzător pentru transferul grupării amino către aldehide/cetone. De asemenea operația de minimizare energetică nu conduce la modificări semnificative a orientării Lys286. În mod analog s-a procedat în vederea obținerii unui model omolog pentru CvTA: pe baza structurii primare au fost identificate mai multe posibile template-uri, dintre acestea, pe baza QSQE și GMQE a fost selectat templat-ul potrivit, modelul obținut a fost modificat pentru a îngloba cofactorul PMP, iar, în final, energia globală a complexului enzimă:cofactor a fost minimizată.

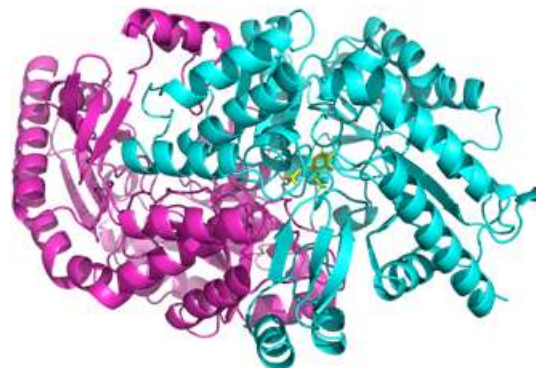
#### I.2. Optimizarea geometriei aldehydelor/cetonelor

Premergător calculelor propriu-zise de docking, geometriile substraturilor au fost optimizate în baza teoriei funcționalelor de densitate. Calculele au fost efectuate folosind programul Gaussian 09 *Gaussian 09 (Revision E.01)*, Gaussian Inc., Wallingford CT: 2009), aplicând funcționala B3LYP și setul de bază 6-31G (d,p).

#### I.3. Calculele de docking

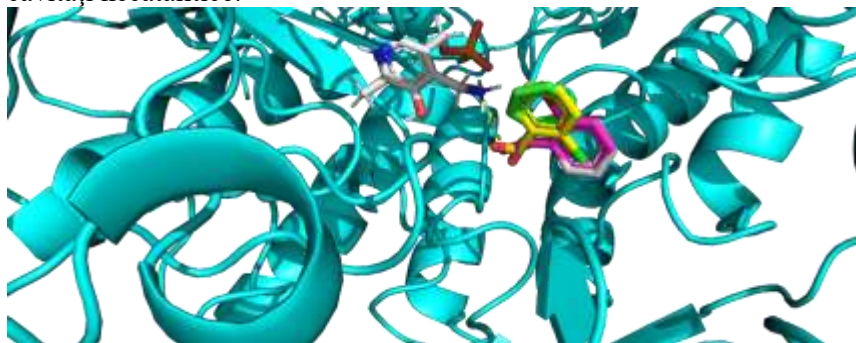
Calculele de docking au fost realizate cu ajutorul programului AutodockVina (Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, **2010**, *31* (2), 455-461). Structura receptorului (modelul omolog al PspTA discutat la punctul I.1.) a fost considerată rigidă, în timp structurile substraturilor (obținute la

templat-ului, cu valori de 0,95 pentru 6GWI\_1, 0,79 pentru 6TI8, respectiv 0,71 pentru 6HX9, și pe baza scorului GMQE (Global Model Quality Estimate), valoarea cea mai mare obținându-se pentru modelul realizat pe baza 6GWI\_1, de 0,90.



**Figura II.1.** Modelul omolog obținut pentru PspTA (cei doi monomeri colorați în mov, respectiv albastru, iar cofactorul redat cu galben)

punctul I.2.) au fost folosite în calculele de docking ca flexibile (fiind permisă torsiunea legăturilor simple). Spațiul de căutare pe modelul omolog a fost astfel ales pentru a cuprinde atât întregul situs activ, cât și volumul canalului de acces al substratului, fiind un paralelipiped cu dimensiunile 40Å X 26Å X 40Å (x,y,z) și centrul de coordonate x= -3,444, y=0 și z= -5,611. Alți parametri, precum diferența energetică dintre cea mai favorizată orientare și cea mai puțin favorizată, au fost standard. De asemenea, pentru a verifica dacă pe suprafața enzimei există cavități care pot acomoda substraturile (intrând astfel în competiție cu acomodarea substratului în situs), s-au realizat și studii de docking în care spațiul de căutare cuprinde întreaga enzimă, având dimensiunile 62Å X 70Å X 96Å (x,y,z) și centrul cu coordonatele x= -12,286, y=9,525 și z=11,563. S-a constatat că în ambele cazuri toate posibilele amplasări ale substratului în model se regăsesc în situs, deci aldehidele/cetonele studiate nu pot fi accommodate în cavități necatalitice.



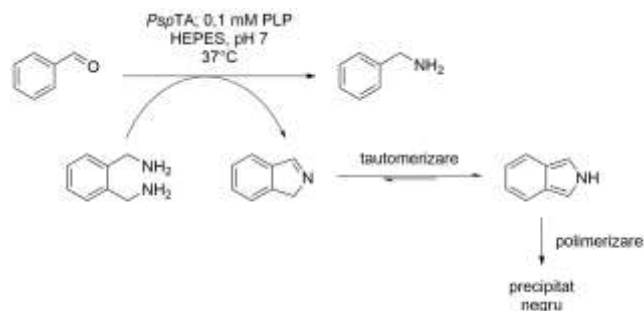
**Figura II.2.** Orientarea benzaldehidei (verde), 2-clorobenzaldehidei (galben), 2-bromobenzaldehidei (mov) și a 2-metilbenzalhidei (gri) față de PMP (alb). Deși pozițiile nucleelor aromatice nu sunt identice pentru toate cele 4 substraturi, orientarea grupării aldehydice este similară, atomul de oxigen din aceasta fiind, în toate cazurile, la 3,1 Å de gruparea -NH<sub>2</sub> a cofactorului

Rezultatele studiilor computaționale sunt în bună concordanță cu cele obținute experimental. Substraturi precum benzaldehida, 2-metilbenzaldehida, 2-metoxibenzaldehida, 2-clorobenzaldehida, 2-bromobenzaldehida, 4-hidroxibenzaldehida, 4-nitrobenzaldehida, 4-metoxibenzaldehida, sau 1-fenoxipropan-2-ona, care reacțiile la scară analitică arată ca sunt acceptate de *PspTA* ca aminoacceptori, pot fi, conform calculelor computaționale efectuate pe modelul omolog (punctul I.1.), acomodate în interiorul situsului, cu o orientare care permite transferul grupării amino de la PMP la substrat. Cu toate acestea, desi acetofenona are o orientare favorabilă, nu este acceptată ca substrat, fapt ce nu poate fi pus pe seama impedimentelor sterice/volumului situsului. **Figura II. 2** redă comparativ orientarea activă a mai multor substraturi *orto* substituie față de PMP, în situsul *PspTA*.

## II. Implementarea unui protocol de analiză rapid și sensibil (assay de tip high-throughput)

Pentru un screening rapid și eficient al activității colecției de mutații a fost implementat un assay colorimetric, la baza căruia stă *o*-xilendiamina, ca aminodonor. În urma reacției, produsul rezultat din aminodonor polimerizează rapid, formând un precipitat negru.

Într-o primă instanță a fost testată capacitatea *o*-xilendiaminei de a funcționa ca aminodonor în reacția de transaminare catalizată de *PspTA*. Lucrându-se într-un volum de 1 mL, cu o concentrație de 5 mM de benzaldehidă (aminoacceptor transformat cu ușurință de enzimă), 1,1 echivalenți de *o*-xilendiamină și 0,1 mM PLP, în HEPES, pH 7, s-a constatat că după o incubare de 30 min la 37°C începe formarea unui precipitat negru, ceea ce indică faptul că *PspTA* acceptă diamina ca aminodonor.



**Schema II.1.** Schema reacției de transaminare între benzaldehidă și *o*-xilendiamină și formarea precipitatului colorat

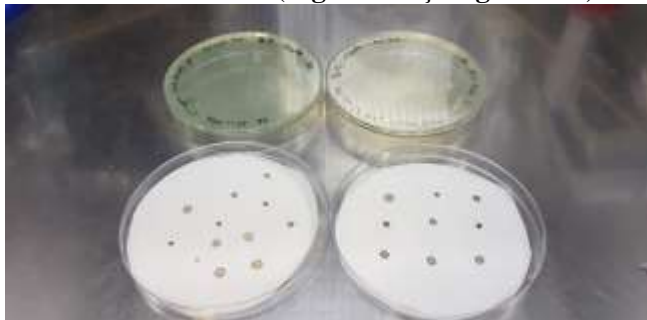
S-a investigat și confirmat aplicabilitatea metodei și în cazurile în care rolul de biocatalizator este jucat de lizat celular brut, lizat clarificat sau culturi celulare, în toate cazurile apariția polimerului sub formă de precipitate negru fiind rapidă și ușor detectabilă chiar și la concentrații mici (**Schema II.1**). S-a lucrat la un volum total de 200 μL, 20

$\mu\text{L}$  de biocatalizator (fie lizat, fie suspensie celulară). 1,25 mM concentrație de aminoacceptor, 1,25 mM concentrație de aminodonor în tampon HEPES cu pH 7, placa fiind incubată timp de 30-35 de minute la 37°C.

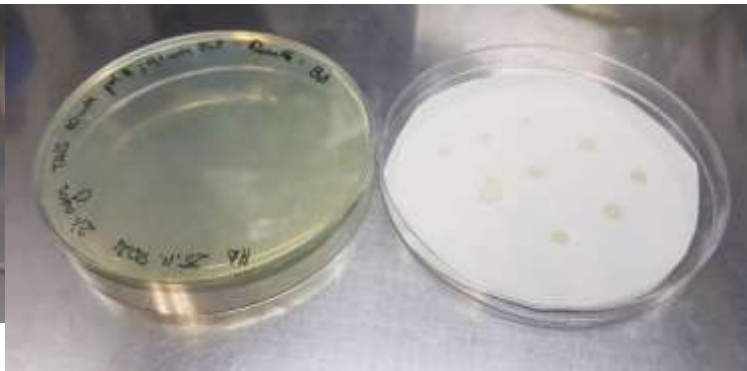


**Figura II.3.** Implementarea assay-ului în plăci (A, B - lizat; C, D - suspensie celulară; 1 - control negativ doar cu biocatalizator, 2 - control negativ cu biocatalizator și aminodonor, 3 - control negativ cu biocatalizator și aminoacceptor, 4 - reacția dintre *o*-xilendiamină și benzaldehidă, 5 - control negativ cu biocatalizator, aminodonor și 0,1 mM PLP, 6 - reacția dintre *o*-xilendiamină și 4-metoxibenzaldehidă). Se poate observa lipsa culorii în toate probele de control, cu excepția celor care conțin PLP în exces (culoarea fiind dată de PLP). În cele două reacții se poate observa o ușoară tentă de mov - la concentrații mai mari de substraturi ori la o cantitate mai mare de biocatalizator, culoarea devine mai intensă.

Nu în ultimul rând, metoda a fost adaptată și unui screening de colonii în fază solidă. Pentru acesta s-a procedat în felul următor: pe o membrană de nitroceluloză așezată deasupra mediului LB-agar suplimentat cu cloramfenicol și carbenicilină (sau doar cu cloramfenicol în cazul controlului negativ, reprezentat de celule Rosetta BL21(DE3)pLysS) se cresc colonii celulare timp de 8 ore la 37°C; membrana se transferă pe un mediu LB-agar suplimentat cu 0,1 mM IPTG, pentru inducție, iar cultura se incubează pentru alte 8 ore la 37°C; membrana se transferă pe o placă care conține 2% (v/v) agar, 10 mM TRIS pH 8, 0,1 mM PLP și se incubează peste noapte, la 4°C; membrana se așează pe o hârtie de filtru îmbibată cu o soluție 10 mM feniletilamină HEPES, pH 7, timp de 30 de minute la temperatura camerei (pentru depleția piruvatului și evitarea rezultatelor fals-pozitive); membrana se spală cu tamponul HEPES pH 7; membrana se așează pe o hartie de filtru îmbibată cu o soluție care conține 10 mM *o*-xilendiamină, 10 mM benzaldehidă (sau alt aminoacceptor de interes) în HEPES pH 7, timp de 2-3 ore, la temperatura camerei. În cazul coloniilor active, după aproximativ o oră se observă o modificare a culorii ce devine tot mai intensă. În cazul coloniilor inative (în acest caz de Rosetta BL21(DE3)pLysS) nu se observă nicio modificare de culoare. (**Figura II.4** și **Figura II.5**)



**Figura II.4.** Modificarea culorii coloniilor care exprimă *PspTA* la 60 de minute de la începerea assay-ului



**Figura II.5.** Coloniile celulare în care reacția nu are loc își păstrează neschimbată culoarea caracteristică

## Obținerea de noi transaminaze cu selectivitate inversă

### 1. Identificarea genelor de interes pentru noi transaminaze (*S*)- și (*R*)-selective

Genele transaminazelor au fost identificate în baza de date NCBI prin căutări *blastp* cu fragmente de secvență specifice (conservate). Căutarea genelor a fost efectuată separat pentru transaminaza (*S*)-selectivă și pentru transaminaza (*R*)-selectivă. Pentru analiza secvențelor și compararea cu alte secvențe de transaminaze (*S*)- și (*R*)-selective a fost utilizat soft-ul UniProt Align. Secvențele de screening au fost utilizate din motivele foarte conservate ale buzunarelor de legare a cofactorului (PLP) al secvențelor. Transaminaza din *Pseudomonas*

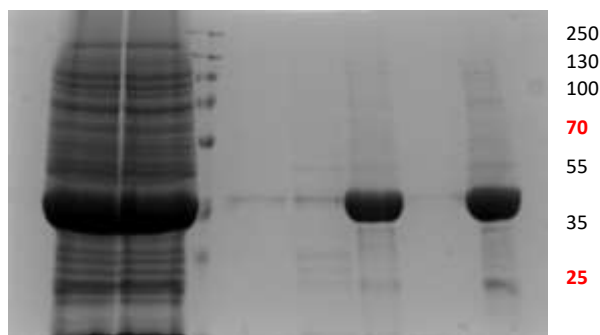
*psychrotolerans* (A0A147GU00, *Psp*-TA) a fost identificată ca transaminază (S)-selectivă prin screeningul secvențelor transaminazelor deja cunoscute: *Chromobacterium violaceum* (Q7NWX4, *Cv*-TA); *Vibrio fluvialis* (F2XBU9, *Vf*-TA); *Halomonas elongata* (E1V913, *He*-TA); *Halolamina sediminis* (A0A1J0VCU3, *Hs*-TA). Transaminaza din *Shinorhizobium* sp. a fost identificată ca transaminază (R)-selectivă prin screeningul secvențelor transaminazelor deja cunoscute: *Arrobacter* sp. (F7J696, *Ar*-TA); *Capronia semiimmersa* TA (cunoscută ca și *Phialophora americana*; A0A0D2DZI3, *Cs*-TA) și *Thermomyces stellatus* TA (pdb: 6XWB\_A, *Ts*-TA). Identitatea secvenței de aminoacizi a *Psp*-TA cu *Cv*-TA, *Vf*-TA, *He*-TA și *Hs*-TA a fost de 55,3%, 36,2%, 64,4% și 61,3%. Identitatea secvenței de aminoacizi a *Sr*-TA cu *Cs*-TA, *Ar*-TA și *Ts*-TA a fost de 40%, 54,9% și 62,2%. Regiunile foarte conservate care permit identificarea transaminazelor noi sunt: lizina care leagă cofactorul (PLP) (288K în *Cv*-TA și 178K în *Ts*-TA) și aminoacizii care leagă gruparea fosfat a cofactorului (121S, 321T în *Cv*-TA și 77R și 282T în *Ts*-TA). Există de asemenea părți ale secvenței care interacționează cu gruparea heteroaromatică a cofactorului PLP (259-262 DEVI în *Cv*-TA și 185F, 211-216 EGSGFN în *Ts*-TA)

## 2. Clonarea genelor noilor transaminaze

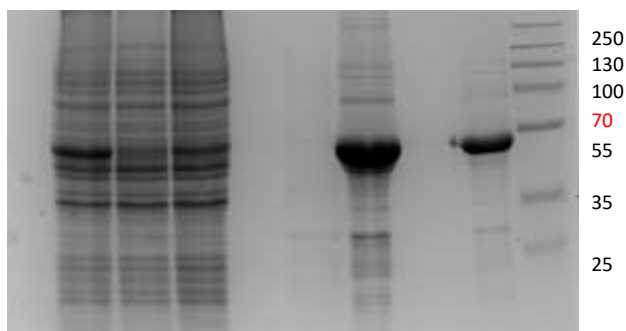
Au fost comandate mbele gene ale transaminazelor (*Sinorhizobium* sp. și *Pseudomonas psychrotolerans*) codon optimizate pentru exprimare în *E. coli*. Genele sintetice au fost produse de Genscript (New Jersey, SUA) în vectori pMA-T și pMA-RQ. Pentru a putea purifica cu ușurință prin cromatografie de afinitate Ni-NTA genele au fost subclonate în vectorul pET-19b folosind situsurile de restricție *Nde*I și *Bam*HI, după care au fost transformate în celulele competente de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS.

## 3. Exprimarea și purificarea transaminazelor

Pentru etapa de exprimare câte o colonie a fost transformată și crescută peste noapte la 37 °C în 5 mL de Luria-Bertani (LB), mediu care conține antibioticele corespunzătoare (carbenicilină și cloranfenicol). 0,5 L de mediu LB a fost inoculat cu 1% (v/v) din precultură de noapte și incubat la 37 °C până când densitatea optică la 600 nm ( $OD_{600}$ ) a ajuns la 0.6-0.7, după care temperatura a fost redusă la 25 °C și s-a realizat inducția cu 0.4 mM izopropil  $\beta$ -d-1-tiogalactopiranozidă (IPTG). După 12 ore de inducție la 20 °C celulele au fost centrifugate la 4 °C, la 5000 rpm timp de 20 minute. După aceea, celulele au fost resuspendate în 50 mL soluție tampon de liză (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7.5) suplimentat cu ARNază, lizozim, TCEP 0,1 mM (tris (2-carboxietil) fosfină), inhibitor de protează fără EDTA și 0,1 mM PLP. Membranele celulare au fost distruse prin ultrasonare, timp de 20 minute la 4 °C. Resturile celulare au fost separate prin centrifugare la rece la 12000 rpm, timp de 30 minute. Proteina a fost purificată prin cromatografie de afinitate pe rășină Ni-NTA. În prima etapă supernatantul a fost trecut direct pe coloana de Ni-NTA. Coloana a fost apoi spălată cu soluție tampon LS (low salt), (50 mM HEPES, 30 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,5) pentru a îndepărta proteinele legate nespecific. Transaminaza cu eticheta His N-terminală a fost eluată de pe coloană cu soluție de imidazol 350 mM (în HEPES 50 mM, PLP 0,1 mM). Toate etapele de purificare a proteinei au fost efectuate la 4 °C. Soluția eluată care conține proteina de interes a fost dializată în soluție tampon de fosfat 50 mM (pH 7.5). Pentru a analiza exprimarea (probele: înainte de inducție, după inducție, înainte de lizare, resturile celulare și supernatantul după sonicare) și purificarea enzimei s-a folosit electroforeza în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE). (Figura II.6-II.7). Concentrația proteinei purificate a fost determinată prin metoda Bradford.



**Figura II.6.** Analiza etapelor de purificare cu Ni-NTA a proteinei *Sr*-TA. 1: supernatant, 2: rămas după trecerea prin coloană, 3: markeri moleculari, 4: 5 mM Imidazol, 5: 10 mM Imidazol, 6: *Sr*-TA eluată cu 350 mM imidazol, 7: 1M Imidazol, 8: *Sr*-TA după dializă



**Figura II.7.** Analiza etapelor de purificare cu Ni-NTA a proteinei *Psp*-TA. 1: after induction, 2: supernatant, 3: după trecerea prin coloană, 4: 5 mM Imidazol, 5: 10 mM Imidazol, 6: *Psp*-TA eluată cu 350 mM imidazol, 7: 1M Imidazol, 8: *Psp*-TA după dializă, 9: markeri moleculari

## 4. Caracterizarea transaminazelor (S)- și (R)-selective noi



## 1. pH-ul optim al enzimelor *Psp*-TA și *Sr*-TA

Activitatea enzimatică a enzimelor *Psp*-TA și *Sr*-TA a fost determinată spectrofotometric la 30 °C în soluție tampon 50 mM prin monitorizarea formării de acetofenonă la 245 nm, timp de 300 s. Activitatea enzimatică a fost monitorizată între pH 6.2-12 (Fig. II.8). Amestecul de reacție care conține soluție tampon 50 mM [fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH (6.2, 6.5, 7.0, 7.5); HEPES pH (8.0, 8.5); TRIS - pH (9.0); Na-pirofosfat pH (9.5, 10, 10.5); fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)- pH (11, 11.5, 12)], 0.1 mM PLP, 5 mM *rac*- $\alpha$ -metilbenzilamină și 5 mM piruvat a fost incubat la 30 °C timp de 5 min. Reacția a fost pornită prin adăugarea a 10  $\mu$ L de *Psp*-TA sau *Sr*-TA purificată (20  $\mu$ g/mL) într-un volum final de 0.2 mL. Activitatea relativă (%) a fost calculată utilizând activitatea maximă ca martor de referință (100%). În cazul enzimei *Psp*-TA pH-ul optim a fost găsit între 8,5 și 11,0, un interval de pH mai larg în comparație cu alte TA raportate. La pH > 11,0 activitatea enzimatică scade, la pH 12,0 enzima a păstrat încă cca. 70% din activitatea sa inițială (Fig. II.9).

Măsurătorile de stabilitate termică indică faptul că enzima *Psp*-TA își păstrează stabilitatea termică între pH 6.2-10.0, în timp ce la valori mai mari ale pH-ului activitatea sa scade treptat.

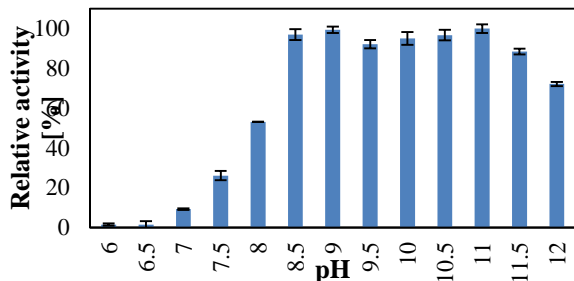


Figura II.8. Profilul de pH enzimei *Psp*-T

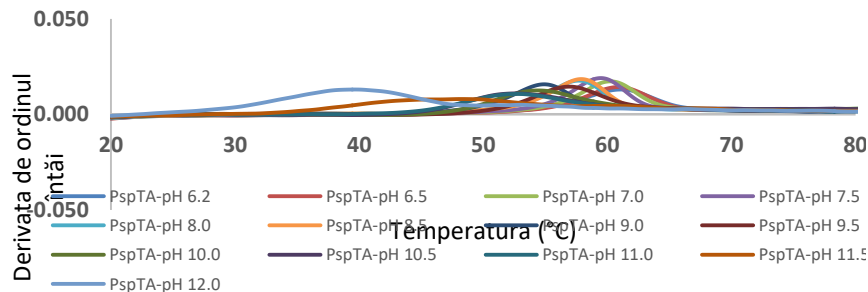


Figura II.9. Stabilitatea termică a enzimei *Psp*-TA

În cazul *Sr*-TA se poate observa un interval mult mai îngust de pH, cu activitatea maximă la pH 7,5; la valori mai mari ale pH-ului activitatea enzimatică scade brusc, probabil din cauza denaturării proteinei (Fig. II.10). Măsurătorile de stabilitate termică indică faptul că enzima *Sr*-TA are stabilitate termică scăzută, temperatura maximă de topire ( $T_m$ ) este la 49 °C la pH 6,0 (Fig. II.11).

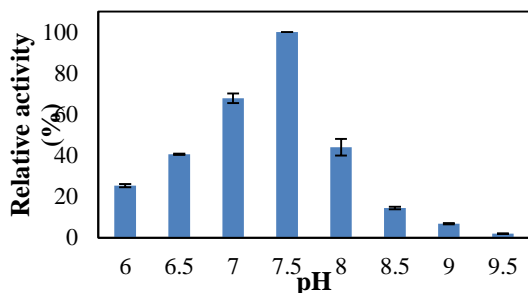


Figura II.10. Profilul de pH al enzimei *Sr*-TA

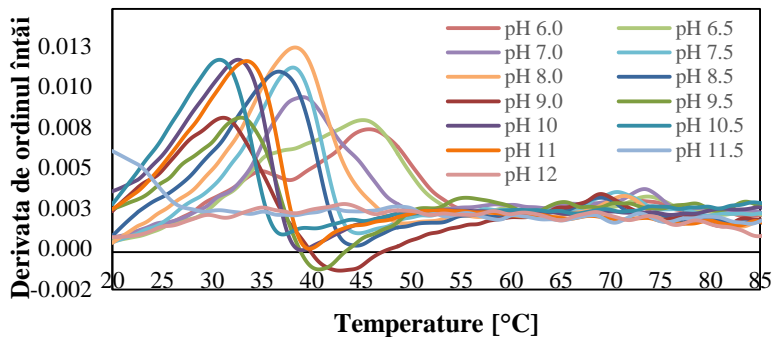


Figura II.11. Stabilitatea termică a enzimei *Sr*-T

## 2. Influența co-solventului (DMSO) asupra stabilității termice

Deoarece s-a demonstrat posibilitatea de a îmbunătăți considerabil solubilizarea substraturilor nemiscibile cu apă prin utilizarea de co-solvenți, a fost testat efectul DMSO-ului ca și co-solvent asupra stabilității și activității enzimelor noi. Pentru acesta la soluțiile de enzimă purificată s-au adăugat diferite cantități de DMSO (de la 5 % până la 50 % v/v) și amestecurile au fost incubate timp de 2, 4, 6, 8 și 22 de ore, după care a fost determinată activitatea enzimatică, folosind amestecul de reacție care conține 10 mM *rac*-1-feniletilamina (*rac*-2a), 10 mM piruvat, 0,1 mM PLP în 50 mM soluție tampon HEPES (pH 7,0). Aceste experimente au fost efectuate la temperatura optimă pentru fiecare TA. Conversiile au fost determinate după 10, 30, 60 de minute de reacție, cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC).

În cazul *Psp*-TA adăugarea a 5-50% DMSO ca și co-solvent a determinat destabilizarea proteinei, stabilitatea termică a *Psp*-TA în absența DMSO fiind cea mai mare ( $T_m = 57$  °C) în timp ce crește concentrația de DMSO, stabilitatea termică a enzimei scade treptat (Fig. II.12). În mod interesant, în cazul *Sr*-TA utilizarea DMSO îmbunătățește ușor stabilitatea termică a proteinei. 5% de DMSO determină o îmbunătățire de 5 °C, în timp ce  $T_m$

prezintă un maxim la 54 °C în prezența a 30 % DMSO, cu aprox. 8 °C mai mare decât în absența DMSO ( $T_m = 46$  °C) (Fig. II.13).

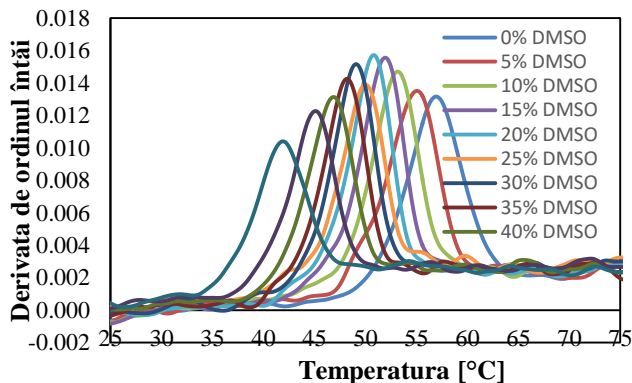


Figura II.12. Stabilitate termică a enzimei *Psp*-TA la diferite rapoarte volumetrice ale DMSO, la pH 7,0.

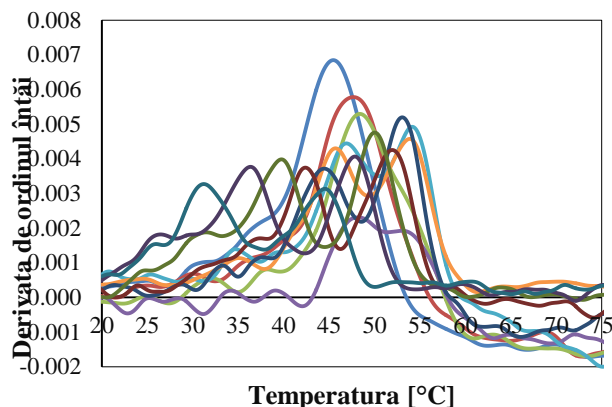


Figura II.13. Stabilitate termică a enzimei *Sr*-TA la diferite rapoarte volumetrice ale DMSO, la pH 7,0.

### 3. Efectul temperaturii asupra activității enzimatic

Efectul temperaturii asupra activității enzimatic a *Psp*-TA și *Sr*-TA a fost testat în intervalul 20-55 °C în cazul *Psp*-TA și 20-40 °C în cazul *Sr*-TA. Ca și substrat a fost folosit substratul model, *rac*-1-feniletilamina (*rac*-2a) în soluție tampon HEPES (50 mM, pH 7,0). Conversiile au fost determinate cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC). Mai întâi a fost monitorizat efectul direct al temperaturii asupra conversiei, apoi stabilitatea enzimei (menținerea activității) la incubare/funcționare la diferite intervale de timp și la diferite temperaturi, care reflectă stabilitatea operațională a biocatalizatorului.

Conversia în cazul enzimei *Psp*-TA a crescut odată cu creșterea temperaturii între 20 și 55 °C, reacția a fost completă după 30 min la 55 °C respectiv după 1 oră la 45 respectiv 50 °C, chiar și la 20 °C conversia a fost de 30 % (Fig. II.14). La pre-incubare timp de 6 ore la diferite temperaturi, *Psp*-TA și-a menținut activitatea până la temperatura de 45 °C, atingând o conversie de 49,3 %, în timp ce în cazul pre-incubării la 55 °C conversia a scăzut brusc ( $c_{55\ 6h} = 13,2\%$  după 1 oră de reacție), indicând o scădere a stabilității la o temperatură ridicată (55 °C) (Fig. II.15).

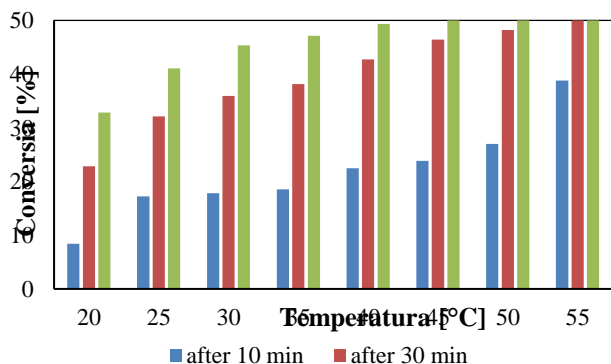


Figura II.14. Efectul temperaturii asupra activității *Psp*-TA (fără pre-incubarea enzimei), folosind 10 mM *rac*-2a și 10 mM piruvat ca și co-substrat

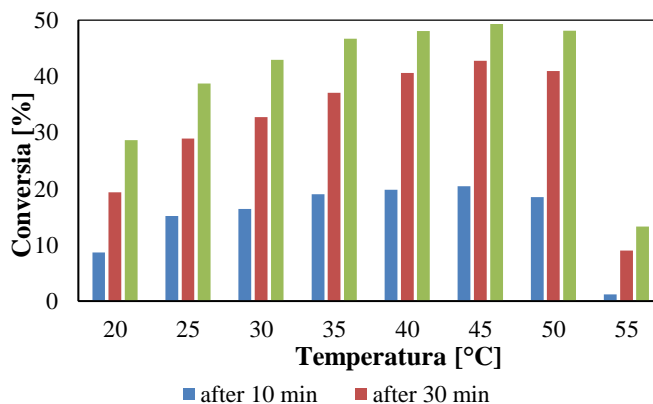
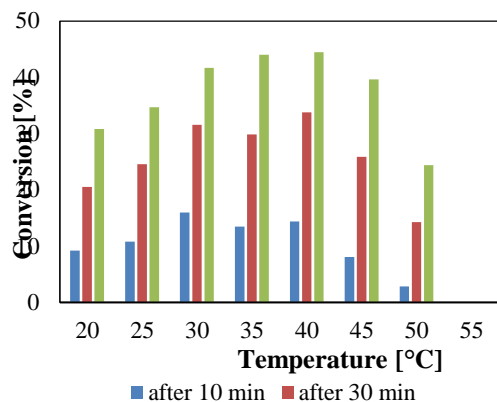
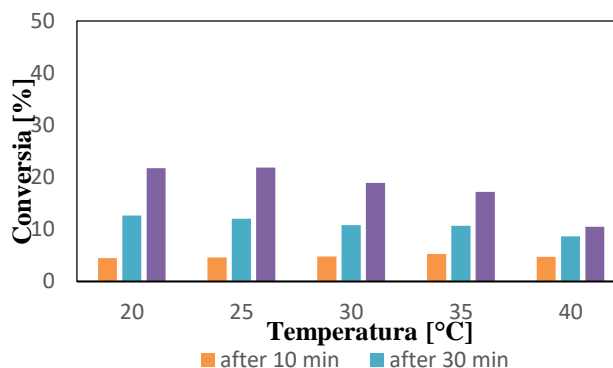


Figura II.15. Efectul temperaturii asupra activității *Psp*-TA (6 ore de pre-incubarea a enzimei), folosind 10 mM *rac*-2a și 10 mM piruvat ca și co-substrat

La pre-incubarea enzimei (timp de 22 ore) la o temperatură din intervalul menționat anterior (20-55 °C) s-a detectat o activitate maximă 40 °C ( $c_{40, 22h} = 44,5\%$ , după 1 oră de reacție). Enzima incubată la 55 °C și-a pierdut total activitatea enzimatică, chiar și după 10 minute de reacție. (Fig. II.16).

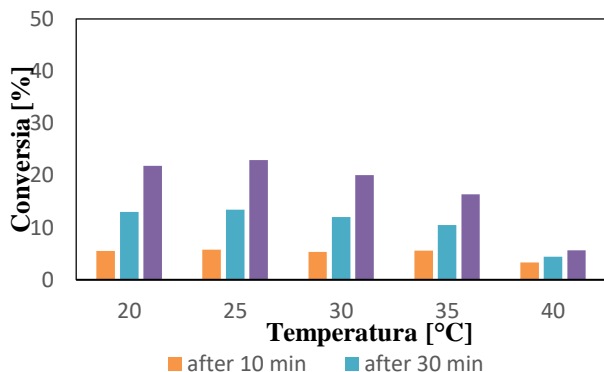


**Figura II.16.** Efectul temperaturii asupra activității *Psp*-TA (22 ore de pre-incubare a enzimei), folosind 10 mM *rac*-2a și 10 mM piruvat ca și co-substrat

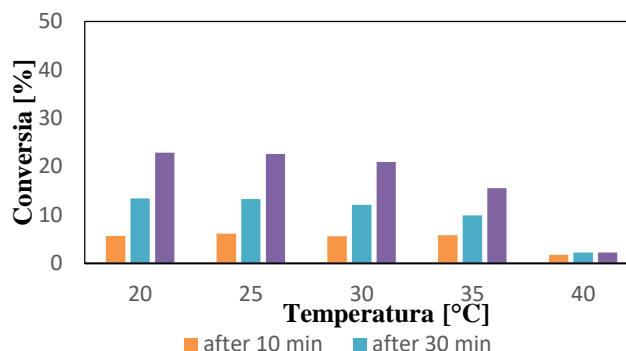


**Figura II.22.** Efectul temperaturii asupra activității *Sr*-TA (fără pre-incubarea enzimei), folosind 10 mM *rac*-2a și 10 mM piruvat ca și co-substrat

În cazul *Sr*-TA folosind același sistem ca și în cazul enzimei *Psp*-TA, fără pre-incubare, s-a observat o scădere a activității, concomitent cu creșterea temperaturilor de reacție. De exemplu s-a observat o scădere de aproximativ două ori a valorilor conversiei la 40 °C (21,7 %) față de 20 °C (10,4 %) după 1 oră de reacție (**Fig. II.23**). În cazul pre-incubării de 6 ore la temperaturi mai scăzute, 20 – 25 °C, pre-incubarea nu a afectat activitatea enzimatică, în timp ce la temperaturi mai mari (40 °C), cele 6 ore de pre-incubare a determinat o scădere a activității de aprox. 4 ori (5,6 %) comparative cu enzima neincubată la 40 °C. La pre-incubarea de 22 de ore a fost detectată o scădere a activității de 10 ori (2,2 %) față de conversia obținută fără pre-incubarea enzimei (22,8 %) (**Fig. II.22, II.24**).



**Figura II.23** Efectul temperaturii asupra activității *Sr*-TA (6 ore de pre-incubare a enzimei), folosind 10 mM *rac*-2a și 10 mM piruvat ca și co-substrat

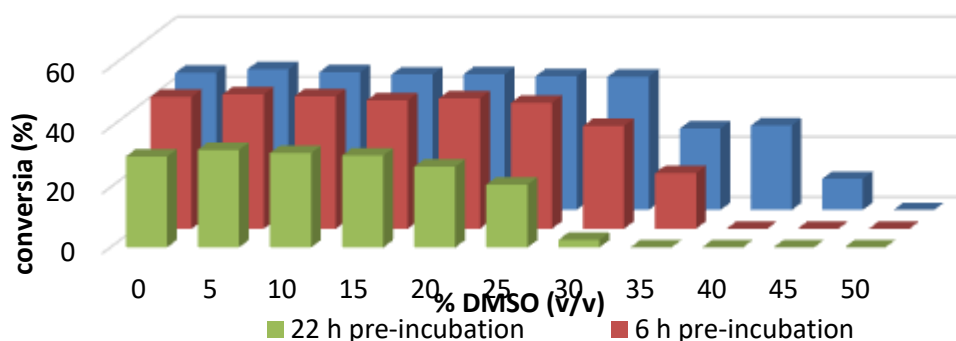


**Figura II.24.** Efectul temperaturii asupra activității *Sr*-TA (22 ore de incubare a enzimei), folosind 10 mM *rac*-2a și 10 mM piruvat ca și co-substrat

Prin urmare, aceste experimente au permis determinarea temperaturii optime de reacție (cu menținerea activității enzimatică pe parcursul biotransformărilor) pentru substraturile de interes, în funcție de timpul de reacție ale acestora.

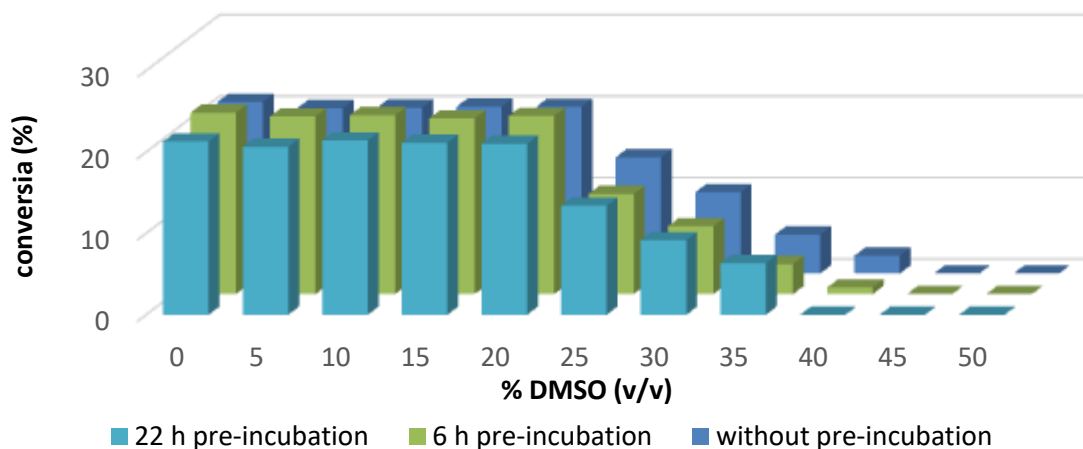
#### 4. Efectul co-solventului (DMSO) asupra activității enzimatică

A fost studiat și efectul co-solventului pentru a verifica limita de DMSO în reacțiile catalizate de transaminaze, folosind tot *rac*-1-feniletilamina (*rac*-1a) ca și substrat model. *Psp*-TA fără pre-incubare cu DMSO și-a păstrat activitatea enzimatică până la 30 % DMSO (v/v) în amestecul de reacție, ceea ce a permis atingerea unei conversii complete după doar 1 oră de reacție în rezoluția cinetică enzimatică (EKR) (**Fig. II 18**). În cazul pre-incubării timp de 6 ore (**Fig. II.25**) 25 % DMSO este limita superioară, la care enzima a furnizat conversia maximă teoretică de 50 %. Cu 22 de ore de pre-incubare a enzimei cu DMSO, conversia maximă obținută a fost de 44,4% în prezența de 5% DMSO, după 1 oră de reacție (**Fig. II.25**), conținutul mai mare de DMSO a scăzut semnificativ conversia. În toate cazurile s-au obținut valori mari ale excesului enantiomeric (>99 %), ceea ce indică faptul că selectivitatea biocatalizatorului nu a este afectată.



**Figura II.25.** Conversii obținute în rezoluție cinetică EKR mediată de *Psp*-TA după 1 oră de reacție

*Sr*-TA fără pre-incubare, după 1 oră de reacție, a produs aceeași cantitate de acetofenonă fără DMSO ca și cu 20 % DMSO. Activitatea nu a fost afectată nici după un timp de incubare mai îndelungat (6 și 22 ore); chiar și după 22 de ore de pre-incubare cu 20 % DMSO, cantitatea de acetofenonă formată a fost 20 % (**Fig. 2.26**). Această toleranță la DMSO a biocatalizatorilor poate fi promițătoare și este deosebit de utilă pentru transformarea substraturilor mai puțin solubile în sisteme apoase.



**Figura II.26.** Conversiile EKR catalizate de *Sr*-TA după 1 oră de reacție și pre-incubare

### Caracterizarea cinetică a noilor transaminaze (*Sr*-TA și *Psp*-TA) în comparație cu *Cv*-TA (W60C)

Pentru studiul cinetic ale noilor transaminaze au fost folosiți trei tipuri de amino donori (4-Cl-feniletilamină, 4-Br-feniletilamină și 3,4-dimetoxi-feniletilamină) (*rac*-**2b**, **2c**, **2e**) și un singur compus amino acceptor (piruvat de sodiu). Vitezele inițiale de reacție au fost determinate prin monitorizarea produșilor formați la lungimea de undă corespunzătoare fiecăruia cu ajutorul spectrofotometrului Tecan SPARK 10M. Măsurătorile spectrofotometrice au fost efectuate în microplăcă de UV cu 96 godeuri (Microtiter, ThermoFischer) la 30 °C.

Pentru determinarea  $K_M$  și  $k_{cat}$ , amestecul de reacție a fost alcătuit din diferite concentrații de substrat în soluție tampon HEPES 50 mM (pH 8,5 pentru *Psp*-TA și pH 7,5 pentru *Sr*-TA), 0,1 mM PLP, 5 % (v/v) DMSO și 100 μg/mL de enzimă purificată (*Sr*-TA sau *Psp*-TA) și concentrație fixă (0,6 mM) de co-substrat (piruvat de sodiu) într-un volum total de 200 μL. Măsurătorile au fost efectuate timp de 10 minute în triplicat pentru fiecare substrat.





Studiul de inhibiție cu piruvat s-a realizat cu amestecuri de reacție ce conțin piruvat în soluție tampon HEPES 50 mM (pH 8,5 pentru *Psp*-TA și pH 7,5 pentru *Sr*-TA) în diferite concentrații, 0,1 mM PLP, 5 % (v/v) DMSO și 100 μg/mL de enzimă purificată (*Sr*-TA sau *Psp*-TA) și concentrație fixă (0,6 mM) de substrat, (4-Cl-feniletilamină) într-un volum total de 200 μL.

Amestecul de reacție pentru studiul inhibiției de produs a conținut soluție tampon HEPES 50 mM (pH 8,5 pentru *Psp*-TA și pH 7,5 pentru *Sr*-TA), 0,1 mM PLP, 5% DMSO și 100 μg/mL de enzimă purificată (*Sr*-TA sau

*Psp*-TA) și o concentrație fixă de substrat (*rac*-**2b**, **2c** sau **2e**) (0,6 mM) și piruvat (0,6 mM) și o concentrație variabilă de acetofenonă (**1b**, **1c**, **1e**) într-un volum total de 200 μL.

Valorile  $V_{\max}$  și  $K_M$  au fost obținute din ajustarea regresiei neliniare a curbelor Michaelis-Menten cu *GraphPad Prisma* 8.4.2.

**Tabel II.1.** Determinarea datelor cinetice pentru *Psp*-TA și *Sr*-TA în comparație cu *Cv*-TA W60C utilizând substraturile *rac*-**2a**, **-2b**, **-2c**, **-2e**

Substrat		<i>Psp</i> -TA			<i>Sr</i> -TA			<i>Cv</i> -TA		
		$K_M$ (μM)	$v_{\max}$ (μM/s)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$v_{\max}$ (μM/s)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$v_{\max}$ (μM/s)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )
<i>rac</i> - <b>2a</b>		448	0.212	0.085	531	0.047	0.017	32	0.014	0.007
<i>rac</i> - <b>2b</b>		161	0.041	0.016	126	0.058	0.021	128	0.028	0.014
<i>rac</i> - <b>2c</b>		952	0.541	0.217	341	0.237	0.085	40	0.047	0.024
<i>rac</i> - <b>2e</b>		899	0.453	0.182	175	0.057	0.020	38	0.044	0.022

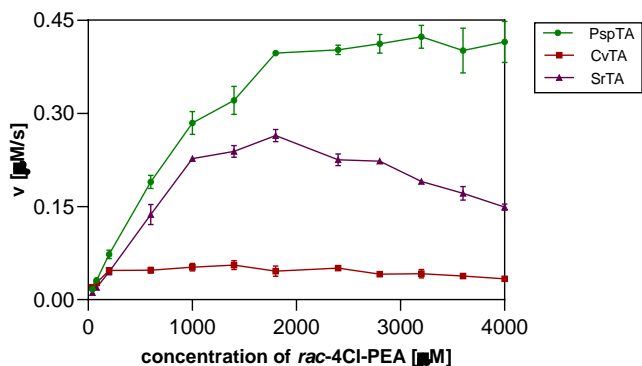
Parametrii cinetici la o concentrație fixă de piruvat (0,6 mM).

**Tabel II.2.** Determinarea datelor cinetice pentru *Psp*-TA și *Sr*-TA în comparație cu *Cv*-TA prin utilizarea piruvatului ca și co-substrat.

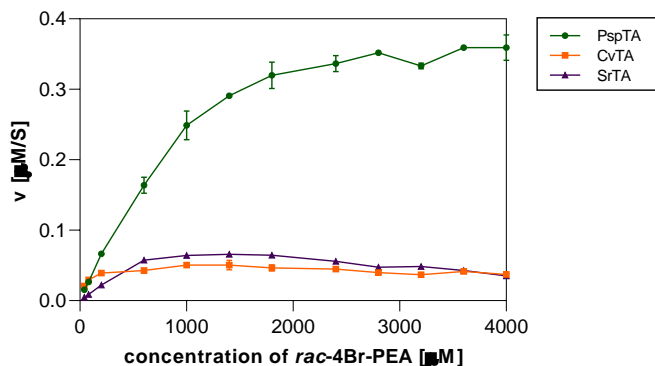
	piruvat		
	$K_M$ (μM)	$v_{\max}$ (μM/s)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )
<i>Psp</i> -TA	43	0.195	0.078
<i>Sr</i> -TA	121	0.202	0.072
<i>Cv</i> -TA	399	0.067	0.034

Parametrii cinetici la o concentrație fixă de *rac*-4Cl-PEA (0,6 mM).

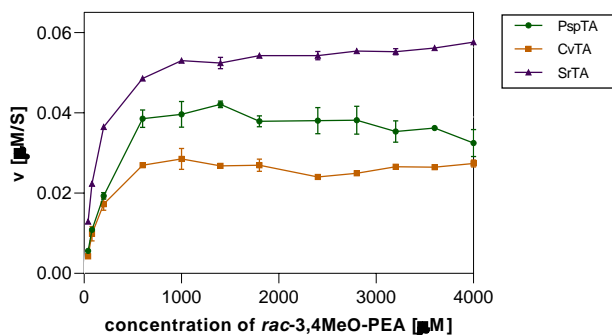
Curbele Michaelis-Menten sugerează apariția inhibiției de substrat în cazul transaminării catalizată de *Sr*-TA a *rac*-**2b** la o concentrație mai mare de 1,8 mM, în timp ce la reacțiile catalizate de *Psp*-TA și *Cv*-TA nu a fost observată inhibiția de substrat (**Fig. II.27**). În mod similar, *Sr*-TA este inhibată de *rac*-**2c** la concentrații ale substratului care depășesc 1,8 mM, în timp ce *Psp*-TA și *Cv*-TA nu au fost inhibate de *rac*-**2c** (**Fig. II.28**). Inhibarea substratului apare și în cazul transaminării catalizate de *Psp*-TA a *rac*-**1e**, fenomen care nu a fost detectat în cazul *Sr*-TA și *Cv*-TA (**Fig. II.29**).



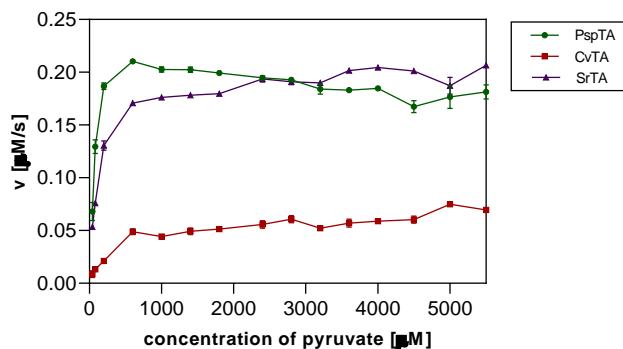
**Figura II.27.** Inhibiția de substrat a *Psp*-, *Sr*- și *Cv*-TAS în reacția de transaminare a *rac*-**2b**



**Figura II.28.** Inhibiția de substrat a *Psp*-, *Sr*- și *Cv*-TAS în reacția de transaminare a *rac*-**2c**



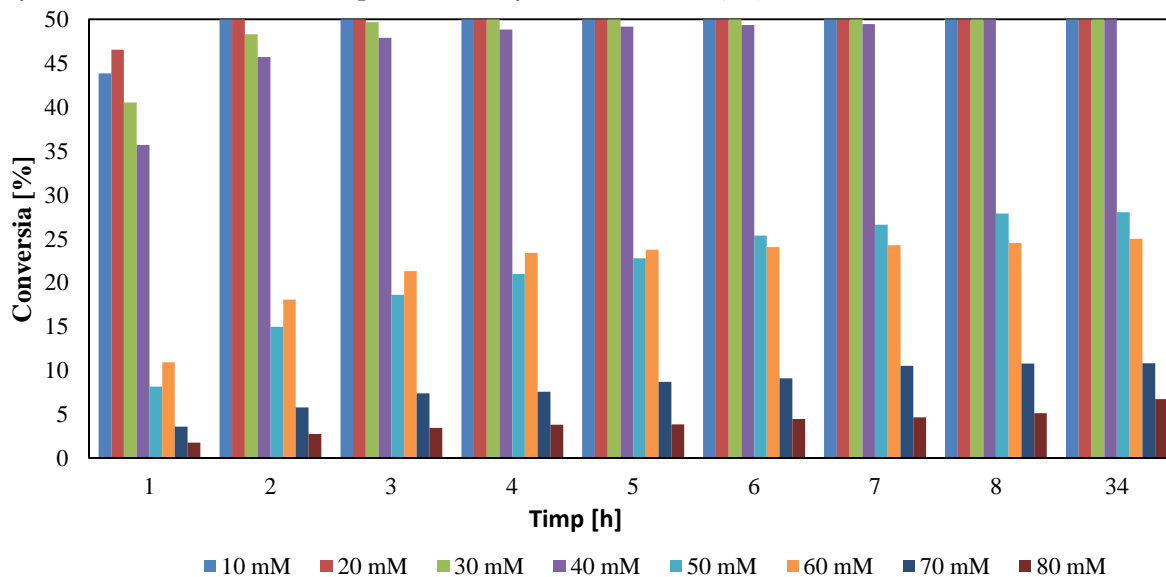
**Figura II.29.** Inhibiția de substrat a *Psp*-, *Sr*- și *Cv*-TAS în reacția de transaminare a *rac-2e*



**Figura II.30.** Inhibiția co-substratului în reacția de transaminare a *rac-4Cl*-feniletilamină și piruvat catalizate de *Psp*-, *Sr*- și *Cv*-TA

La investigarea inhibiției provocată de co-substrat acceptorului (piruvat), inhibiția a fost observată doar în cazul transaminazei din *Pseudomonas psychrotolerans*, unde inhibiția piruvatului (**Fig. II.30**) este mult mai severă decât de către *rac-2b*, sugerând că este necesar un control strict al concentrației de piruvat în amestecul de reacție pentru activitatea optimă a enzimei.

Pe lângă studiul de inhibiție a co-substratului, am verificat și efectul concentrației de substrat asupra activității enzimice prin determinarea conversiei cu ajutorul HPLC. Astfel, concentrația de *rac-2a*, selectată ca și substrat model, a fost variată de la 10 la 80 mM, realizând reacțiile în condiții optime. Până la o concentrație de 40 mM *rac-2a*, *Psp*-TA transformă complet enantiomerul (*S*), după 8 ore, cu o conversie maximă de 50 %. La concentrații >40 mM ale substratului apare o inhibiție semnificativă (**Fig. II.31**).



**Figura II.31.** Efectul concentrației substratului asupra activității *Psp*-TA

În cazul *Sr*-TA, concentrația substratului a fost variată de la 10 la 30 mM. Conversia maximă obținută a fost 46,6 % după 20 de ore la concentrația a *rac-2a* de 10 mM; la concentrații mai mari ale substratului, 20 mM și 30 mM, conversiile au scăzut semnificativ, 22,5 % respectiv 8 % (**Fig II.32**).

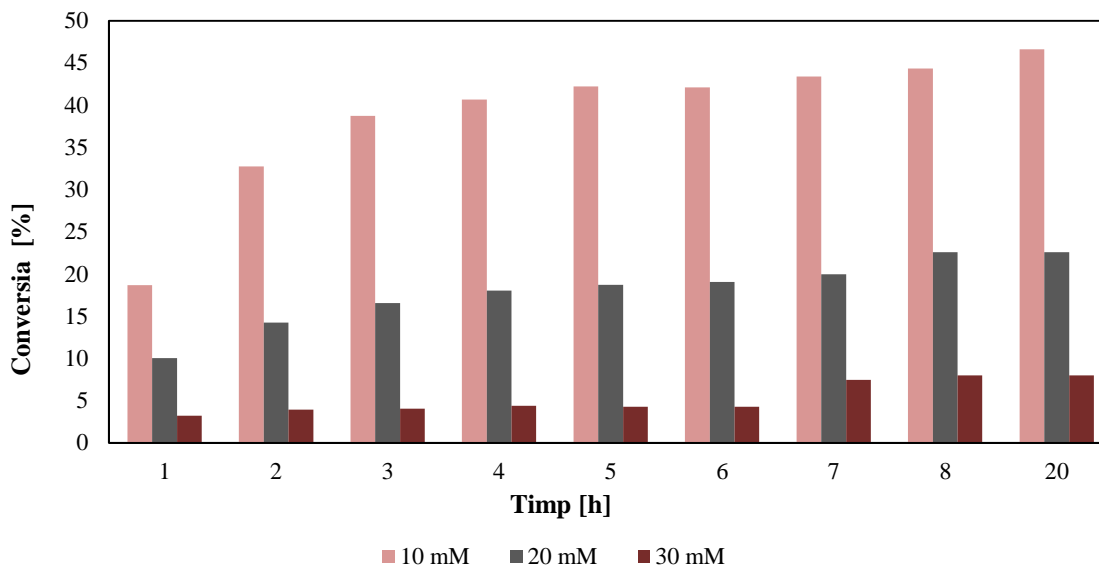


Figura II.32. Efectul concentrației substratului asupra activității Sr-TA

### Inhibiția de produs

Deoarece la concentrații mari cetona generată poate avea un efect de inhibiție destul de important, s-a investigat spectrofotometric dacă are loc inhibiție de produs în cadrul biotransformărilor selectate.

În cazul transaminazei din *Shinorizobium* sp. cea mai severă inhibiție a fost observată la 4-Cl- și 4-Br-acetofenonă, activitatea a Sr-TA scăzând la ~ 45 %, la 0,6 mM de 4-Cl-acetofenonă respectiv de 4-Br-acetofenonă (Fig. II.33-34). Cu toate acestea, la aceeași concentrație a 3,4-MeO-acetofenonă efectul inhibitor a fost de doar ~ 10 % (Fig. II.35).

*Psp*-TA este inhibată de 4-Br-acetofenonă (Fig. II 27), activitatea reziduală a fost ~33 % la concentrații de 0,6 mM, în cazul 3,4-MeO-acetofenonă activitatea reziduală a fost de ~50 % (Fig. 28). Enzima *Psp*-TA este mai puțin afectată de 4-Cl-acetofenonă, activitatea reziduală a fost ~ 75% la o concentrație de 0,5 mM (Fig. II.33).

*Cv*-TA prezintă, de asemenea, inhibiție de produs destul de puternică cu toți trei produșii cetonic, activitatea reziduală este de 59 % la 0,5 mM de 4-Cl-acetofenonă (Fig. 2.33), 36 % la 0,5 mM de 4-Br-acetofenonă (Fig. II.34) și 30 % la 0,5 mM de 3,4-MeO-acetofenonă (Fig. II.35).

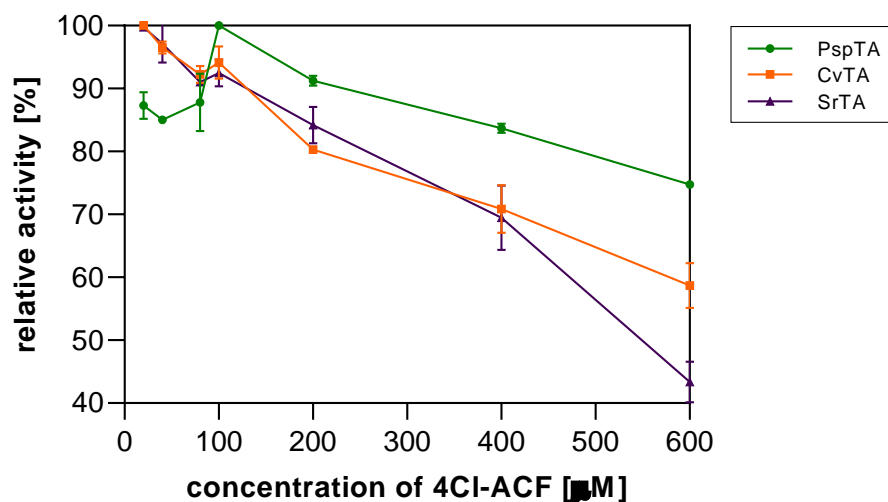


Figura II.33. Inhibiția 4Cl-acetofenonei

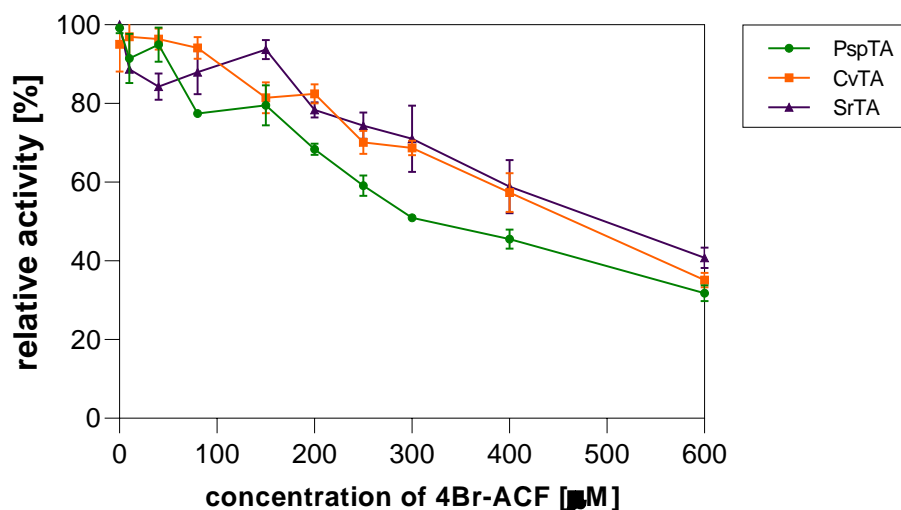


Figura II.34. Inhibiția 4Br-acetofenonei

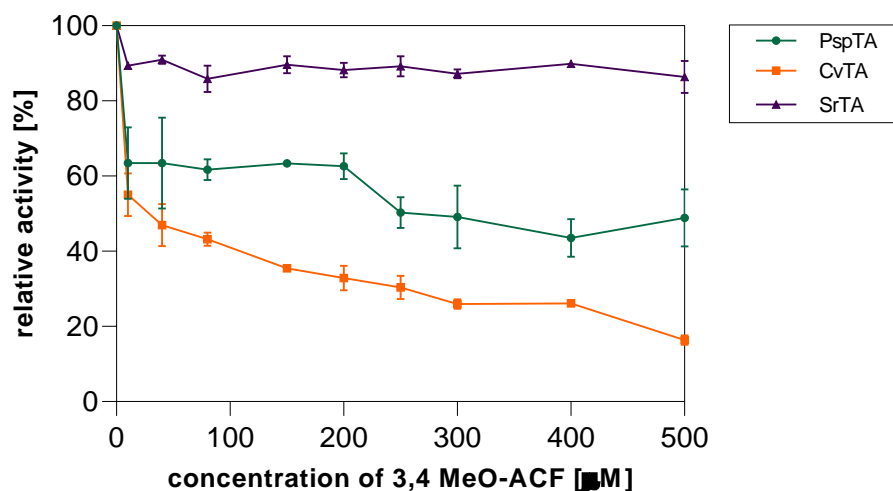


Figura II.35. Inhibiția 3,4MeO-acetofenonei

## Imobilizarea noilor transaminaze cu activitate enzimatică controlată

### 1. Imobilizarea transaminazelor prin încapsulare în sol-gel

Amestecul format din 12,5 ml soluție de enzimă purificată Psp-TA ( $C=2$  mg/ml), 100  $\mu$ L NaF 1M, 200  $\mu$ L alcool izopropilic și 200  $\mu$ L de diferiți aditivi (soluții apoase 4%) a fost agitat la 600 rpm într-un tub Falcon de 15 ml, timp de 2 ore la temperatura camerei. După finalizarea omogenizării, s-au adăugat 3 mmoli de precursori silanici (OTEOS: *n*-PTMOS: TMOS, raport molar 1,6:0,4:1).

Gelurile rezultate au fost maturate timp de 24 de ore la temperatura camerei iar după aceea spălate cu câte 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic și 2,5 ml *n*-hexan. Apele de spălare au fost colectate și au fost folosite pentru a determina cantitatea de enzimă rămasă neimobilizată.

Pentru a determina eficiența imobilizării a fost utilizată metoda BCA de dozare a proteinelor. Gelurile obținute au fost uscate timp de 24 de ore la temperatura camerei, apoi zdrobite într-un mojar și depozitate la 4 °C în sticlute.



**Tabel II.7.** Biocatalizatori obținuți prin încapsulare în sol-gel într-un amestec ternar de precursori silanici: OTEOS: *n*-PTMOS: TMOS<sup>a</sup>.

Nr.	Cod sol-gel	Aditiv <sup>b</sup>	[μg enzime/mg preparat] <sup>c</sup>
1	SG-1	β-ciclodextrină	7
2	SG-2	Alcool polivinilic	8.1
3	SG-3	Glicerol	7.9

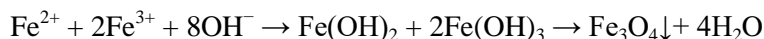
<sup>a</sup>Raportul molar utilizat al precursorilor silanici OTEOS: *n*-PTMOS: TMOS = 1.6:0.4:1;

<sup>b</sup>200 μL, 4% soluții apoase; <sup>c</sup>Încărcarea enzimatică a fost determinată prin raportarea cantității de transaminază din biocatalizator (cantitatea inițială de enzimă care a fost imobilizată deoarece nu s-au găsit urme de enzimă nelegată în apele de spălare) față de cantitatea totală de biocatalizator obținut.

## 2. Sinteza nanoparticulelor de magnetită prin coprecipitare (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

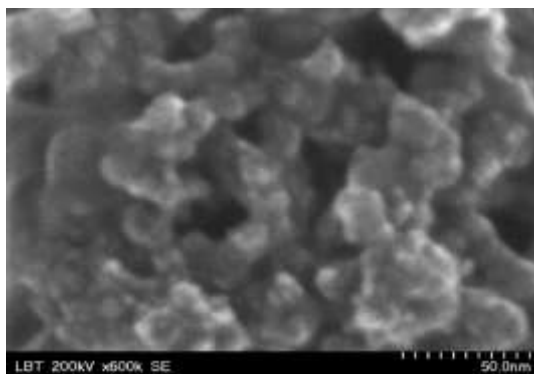
Pentru sinteza nanoparticulelor de magnetită a fost folosită metoda de coprecipitare. Metoda este una dintre cele mai utilizate metode de sinteză în fază apoasă datorită simplității și eficienței sale.

În general, se realizează prin alcalinizarea precursorilor de metal. Cea mai cunoscută metodă este folosirea sărurilor feroase și ferice la un raport stoechiometric de 1:2 la temperatura ambiantă în prezența unui flux continuu de gaz inert.



La o soluție de 100 ml amoniac 25% la temperatura de 80 °C în atmosferă de argon a fost adăugat 100 ml soluție de FeCl<sub>2</sub> și FeCl<sub>3</sub> (20 mmoli Fe<sup>2+</sup> și 40 mmoli Fe<sup>3+</sup>) timp de 2 ore. După o oră de agitare sub argon, la 80 °C a fost adăugat 50 mmoli de acid succinic. Amestecul de reacție a fost agitat timp de 24 de ore la temperatura camerei.

Amestecul de 50 mg magnetită, 1 mL diclormetan și 6,5 mg carbonildiimidazol a fost sonicat timp de 2-3 minute și a fost agitat timp de 4 ore (400 rpm). Pasul următor a fost filtrarea și spălarea cu diclormetan. Reziduiul a fost resuspendat în diclormetan și a fost adăugat 5 μL glicerol-diglicidil-eter și a fost agitat timp de 24 de ore. Se filtrează, se spală cu apă și apoi magnetita funcționizată se liofilizează.

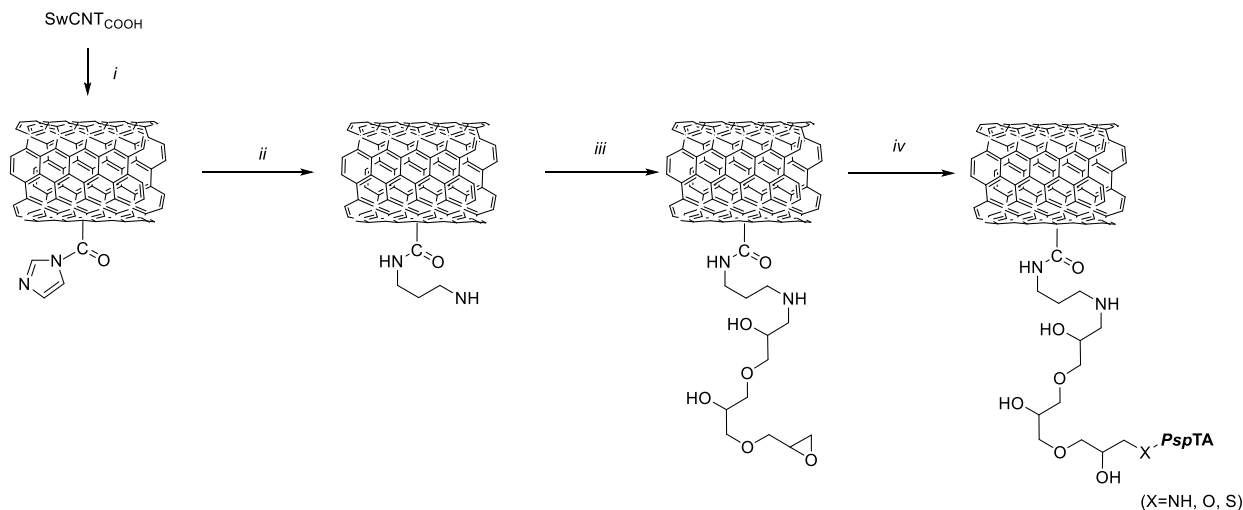


**Figura II.36.** Imaginea SEM a magnetitei acoperite cu PEG

## 3. Imobilizarea covalentă a transaminazei Psp pe SwCNTCOOH prin linker de tip GDE

SwCNTCOOH s-a incubat cu *N,N'*-carbonildiimidazol sub agitare la 1350 rpm peste noapte, cu sonicare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotuburi.

După activarea cu CDI proba a fost filtrată pe un filtru membrană.



**Schema II.2.** Imobilizarea transaminazei *Psp* pe  $\text{SWCNT}_{\text{COOH}}$  prin linker de tip GDE. Reacțanți și solvenți: i) CDI în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; ii)  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  în apă; iii) glicerol diglicidil eter în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; iv) *Psp*-TA în HEPES (50 mM, pH 7).

La nanotuburile de carbon activate s-a adăugat propan-1,3-diamină în apă distilată (schema 1 etapa ii). După cuplarea cu propan-1,3-diamină amestecul a fost filtrat și spălat cu apă. O soluție de glicerol diglicidil eter s-a adăugat peste nanotubul cuplat cu diamină (Schema 1 etapa iii).

După incubare proba a fost filtrată și spălată cu  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La nanotubul activat s-a adăugat *Psp*-TA în soluție tampon HEPES (Schema 2 etapa iv). După imobilizare, biocatalizatorul rezultat a fost filtrat și spălat cu apă. Cantitatea de *Psp*-TA imobilizat s-a determinat din diferența concentrației enzimei înainte și după imobilizare, care a fost măsurată spectrofotometric prin metoda Bradford (randament de imobilizare 95 %).

### Proceduri analitice pentru determinarea conversiilor

Pentru determinarea conversiilor în reacțiile de rezoluție cinetică, au fost luate probe din amestecurile de reacție și au fost injectate în HPLC (Agilent 1100). Coloană: Daicel CROWNPAK® CR-I(+). Procedura: 50  $\mu\text{L}$  de probă a fost luată în 50  $\mu\text{L}$  de MeOH, probele au fost filtrate în 0,22  $\mu\text{m}$  prin filtre cu membrană de nailon (15000 rpm, 2 minute) și 150  $\mu\text{L}$   $\text{HClO}_4$  (pH 1,5) a fost adăugat în probă pentru acidifiere înainte de injectare.

### Act 2.3 - Caracterizarea noilor transaminaze imobilizate

Pentru confirmarea legării enzimelor pe nanotuburile de carbon monostrat, respective a includerii acestora în sol-geluri, a fost determinate activitatea enzimatică a noilor preparate enzimaticice în peocesul de rezoluție cinetică enzimatică a substratului model, 1-fenil-etilamina racemică după următorul protocol:

În amestecul de reacție care conține *rac*-1-feniletilamină 40 mM, piruvat 40 mM, cofactor (PLP) 0,1 mM în soluție tampon HEPES 50 mM (pH 7,0) termostatate la temperature optima a fiecărei enzime s-a adăugat 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de enzimă purificată sau prin adăugarea preparatul care conține cu cantitatea identică de enzimă. La intervale de timp de 15 min au fost prelevate câte 50  $\mu\text{L}$  de probă în 50  $\mu\text{L}$  de MeOH, probele au fost filtrate prin filtre cu membrană de nailon de 0,22  $\mu\text{m}$  (15000 rpm, 2 minute) și în soluția obținută s-a adăugat câte 150  $\mu\text{L}$  soluție  $\text{HClO}_4$  (pH 1,5) pentru acidifiere înainte de injectare. Separarea s-a realizat pe o coloană Daicel CROWNPAK® CR-I(+).

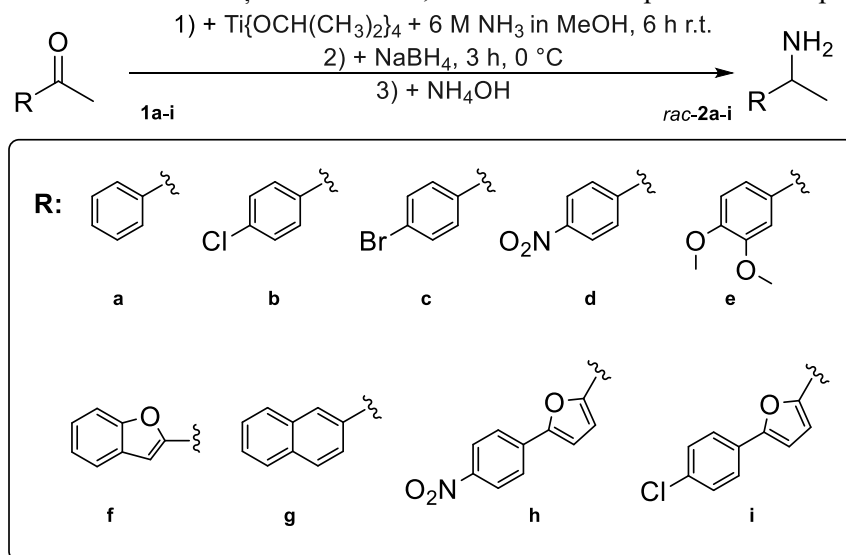
**Tablel II.8.** Activitatea relativă a celor două transaminaze noi imobilizate

Biocatalizator	Conversia %	Activitate relativă (imobilizat/solubil)
<i>Sr</i> -TA solubilă	22	-
<i>Psp</i> -TA solubilă	27	-
<i>Sr</i> -TA-SwCNT	12	0.68
<i>Psp</i> -TA- SwCNT	10	0,7
<i>Sr</i> -TA-solgel	15	0.65
<i>Psp</i> -TA-solgel	14	0.63

**Act 2.4** - Testarea noilor transaminaze mobilizate in sinteza stereoselectivă a ambilor enantiomeri ai unor amine relevante

**Sinteza chimică a aminelor racemice relevante**

Se dizolvă una din aldehidele **1a-i** (10 mmol) în soluție de NH<sub>3</sub> (7 M) în MeOH (30 mmol NH<sub>3</sub> în condiții anhidre sub argon. La această soluție se adaugă sub agitare 20 mmol de Ti{OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>}<sub>4</sub>. Amestecul se agită la temperatura camerei 6 h după care masa de reacție se răcește la 0 °C și se adaugă în porții mici NaBH<sub>4</sub> (20 mmoli). După 3 h se adaugă amestecului o soluție de amoniac 2 M (20-25 mL) Precipitatul format se filtrează și se spală cu acetat de etil. Fazele organice reunite se spală cu HCl 1 M (3×30 mL), apoi faza apoasă se extrage cu EtOAc. pH-ul fazei apoase este ajustat la pH 10 cu o soluție NaOH 2 M. Amina este extrasă cu EtOAc (3×50 mL). Faza organică se spală cu saramură (50 mL) și apoi se usucă pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. După filtrare soluția este concentrată la vid. Aminele (*rac-2a-i*) au fost utilizate ca atare în reacțiile enzimaticе, fără a fi necesară purificarea lor prealabilă (**Schema 2.3**).



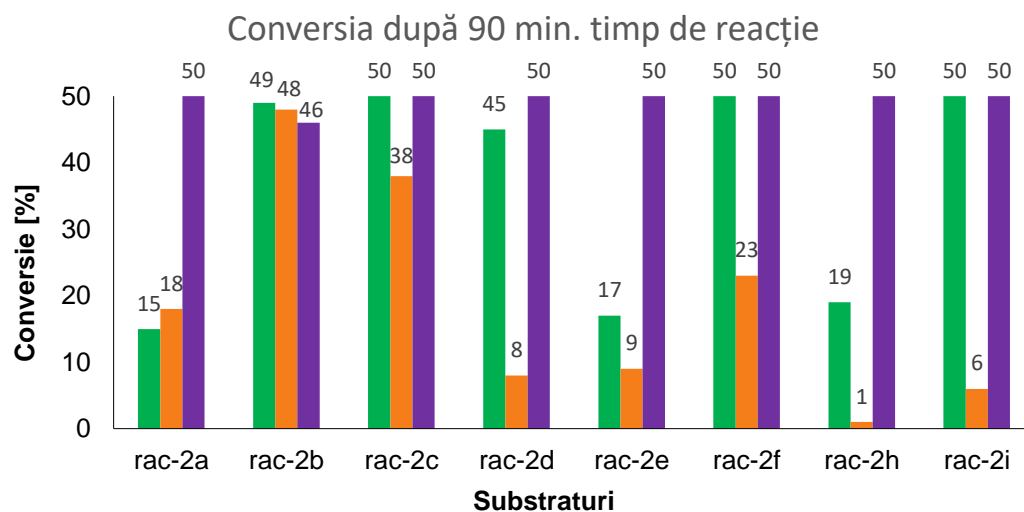
**Schema II.3.** Sinteza aminelor racemice din cetonele corespunzătoare

Pentru a monitoriza reacțiile enzimaticе s-a dezvoltat o metodă analitică HPLC pe o coloană chirală Crownpak-(+). Condițiile de separare și timpii de retenție ai compușilor sunt prezentați în **Tabelul II.9**.

**Tabelul II.9.** Separarea enantiomerilor aminelor racemice și a cetonele corespunzătoare.

Substrat	Eluent HClO <sub>4</sub> (pH1.5):ACN (V/V)	Debit (mL/min)	t (C°)	Timp de analiză (min)	Timp de rețenie t <sub>R</sub> (min)		
					Cetone	Amine	
						(S)	(R)
<i>rac-2a</i>	80:20	0.4	20	20	11.81	9.57	17.38
<i>rac-2b</i>	75:25	0.4	20	20	11.81	7.84	17.06
<i>rac-2c</i>	75:25	0.4	25	20	14.2	10.1	16.52
<i>rac-2d</i>	75:25	0.4	15	14	9.43	7.04	10.62
<i>rac-2e</i>	70:30	0.4	15	9	4.77	5.18	6.83
<i>rac-2f</i>	75:25	0.4	25	25	10.15	16.5	23.29
<i>rac-2g</i>	75:25	0.4	25	25	11,2	17,4	22,5
<i>rac-2h</i>	50:50	0.2	20	28	10.24	12.23	24.75
<i>rac-2i</i>	50:50	0.3	20	28	7.74	11	24.94

Deoarece transaminazele immobilizate pe SwCNT s-au dovedit a fi cele mai active dintre toate preparatele enzimaticе, s-a investigat transformarea seriei de amine racemice cu *Psp*-TA-SwCNT (violet) și *Sr*-TA-SwCNT (verde). Pentru a dovedi performanța catalitică a preparatelor noi în analiza comparativă prezentată în **Figura II.37** au fost incluse și testele realizate cu *Cv*-TA-SwCNT W60C, o enzimă des utilizată în sinteza aminelor la scară preparativă.



**Figura II.37.** Rezoluția cinetică a aminelor racemice relevante *rac-2a-f* cu *Psp*-TA-SwCNT (violet), *Sr*-TA-SwCNT (verde), comparative cu *Cv*-TA-SwCNT W60C (portocaliu)

### Act 2.5 - Publicarea rezultatelor in reviste de specialitate

O parte a rezultatelor au fost prezentate recent la o conferință internațională (organizată online) sub forma unei prezentări orale.

Studiul de dezvoltare a noilor transaminaze immobilizate și aplicațiile acestora în EKR a unor amine cu relevanță industrială este în curs de publicare într-o revistă de specialitate. Manuscrisul este redactat și la ora actuală se lucrează la îmbunătățirea aspectului grafic al acestuia înainte de a-l înainta spre analiză colectivului editorial al revistei *Reaction Chemistry & Engineering*, până la sfârșitul acestei luni.

### CONCLUZIE

1. Toate obiectivele etapei au fost atinse. Rezultatele obținute vor sta la baza realizării activităților din etapa următoare, în conformitate cu Planul de realizare a proiectului, respectiv dezvoltarea de procese la scară pilot care să utilizeze acești biocatalizatori). Ne propunem ca în perioada imediat următoare să realizăm deja studii de optimizare a funcționării transaminazelor immobilizate în condițiile specifice care vor fi utilizate dar considerăm că dispunem deja de suficiente informații pentru a putea finaliza cu succes și etapa următoare.
2. În conformitate cu cererea de finanțare și cu contractul încheiat, a fost efectuată și **achiziția unui instrument: un liofilizator de ultimă generație**, necesar pentru uscarea preparatelor enzimaticе obținute, respectiv ale unor materiale necesare desfășurării activității de cercetare, în cuantum de 90000 lei (conform Devizului antecalcul) din prețul total de 98413 lei.
3. Echipea de cercetare a proiectului a fost întregită în cursul acestui an prin includerea unor tineri cercetători, angajați prin organizarea unor concursuri, cu respectarea bugetului aprobat la contractare.

Director proiect,  
Prof. Dr. Ing. László POPPE

*László Poppe*