

**Progetto HE ERC 2023 – ADG n. 101141690 PHOTOZYME**  
Enhancing the Potential of Enzymatic Catalysis with Light

***Protein Engineering in the Development of New Biocatalytic Radical Processes  
Triggered by Light***

The main aim of the PHOTOZYME project, funded by ERC 2023 – ADG n. 101141690, is to identify strategies to program entirely new mechanisms of catalysis into proteins. This approach will allow the development of enzyme families with functions beyond those found in nature, thus expanding the reactivity boundaries of biocatalysis. To achieve this goal, we will combine enzymatic catalysis with visible light photochemistry. The resulting photoenzymes will be powered by absorption of a photon at each catalytic cycle and will serve to develop new-to-nature asymmetric processes, including challenging transformations. This requires a deep knowledge of protein engineering and mutagenesis techniques. We are looking for candidate that, once an enzyme is identified as having at least some level of new-to-nature photoactivity for the intended reaction, will apply iterative cycles of mutagenesis and screening to substantially improve catalytic efficiency, stability, stereoselectivity, and expansion of substrate scope. To evolve the enzymes, we will apply Iterative Saturation Mutagenesis (ISM), an approach that uses a symbiosis of rational design and combinatorial randomisation. This strategy identifies predefined regions (hot sites) within the protein sequence that are considered crucial for improving a given catalytic property (e.g. stereoselectivity). An essential facility to speed up the screening of mutants is the High Throughput Experimentation (HTE) platform, which will allow a large number of photobiocatalytic reactions to be performed (96-well plates equipped with individual LEDs) and analysed in a very short period of time. Mechanistic Studies will further support the optimisation phase. The semi-rational enzyme engineering approach will be aided by high-quality computational models and docking experiments to properly choose the hot sites to be randomised, leading to high quality libraries.

For the research position, we seek candidates with strong expertise in protein engineering, mutagenesis, biocatalysis, and in utilizing HTE to optimize biocatalytic processes. Candidates should have a minimum of three years' research experience within an established team, preferably in an international setting. These competencies are essential for effectively advancing the entire PHOTOZYME project.

**Ingegneria delle Proteine nello Sviluppo di Nuovi Processi Radicali Biocatalitici Attivati dalla Luce**

Il principale obiettivo del progetto PHOTOZYME, finanziato dall'ERC 2023 – ADG n. 101141690, è identificare strategie per programmare nuovi meccanismi di catalisi nelle proteine. Questo approccio consentirà lo sviluppo di enzimi con funzioni oltre quelle presenti in natura, espandendo così i confini della reattività della biocatalisi. Per raggiungere questo obiettivo, combineremo la catalisi enzimatica con la fotochimica della luce visibile. I fotoenzimi risultanti saranno alimentati dall'assorbimento di un fotone ad ogni ciclo catalitico e serviranno per sviluppare processi asimmetrici nuovi per la natura. Questo richiede una profonda conoscenza dell'ingegneria delle proteine e delle tecniche di mutagenesi. Cerchiamo candidati che, una volta identificato un enzima con almeno un certo livello di fotoattività per la reazione prevista, applicheranno cicli iterativi di mutagenesi e screening per migliorare sostanzialmente l'efficienza catalitica, la stabilità, e la stereoselettività. Per evolvere gli enzimi, applicheremo la Iterative Saturation Mutagenesis (ISM), un approccio che utilizza una simbiosi di progettazione razionale e randomizzazione combinatoria. Questa strategia identifica regioni predefinite (hot sites) all'interno della sequenza proteica che sono considerate cruciali per migliorare una determinata proprietà catalitica (ad es. stereoselettività). Un'infrastruttura essenziale per accelerare lo screening dei mutanti è la piattaforma di High Throughput Experimentation (HTE), che permetterà di eseguire un gran numero di reazioni fotobiocatalitiche (piastre da 96 pozzetti

equipaggiate con LED individuali) e di analizzarle in un breve periodo di tempo. Studi Meccanicistici supporteranno ulteriormente la fase di ottimizzazione. L'approccio semi-razionale all'ingegneria degli enzimi sarà supportato da modelli computazionali e sperimentazioni di docking di alta qualità per scegliere correttamente i hot sites da randomizzare, portando alla creazione di librerie di alta qualità.

Per la posizione di ricerca, cerchiamo candidati con una forte esperienza in ingegneria delle proteine, mutagenesi, biocatalisi e nell'utilizzo di HTE per ottimizzare i processi biocatalitici. I candidati dovranno avere almeno tre anni di esperienza di ricerca all'interno di un team consolidato, preferibilmente in un contesto internazionale. Queste competenze sono essenziali per far avanzare efficacemente l'intero progetto PHOTOZYME.